



**VARIABILIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN DOS  
ESPECIES FORRAJERAS DEL BOSQUE SECO TROPICAL  
TOLIMENSE Y ACTIVIDAD NEMATOCIDA *in vitro***

Trabajo de grado opción investigación  
presentado como requisito parcial  
para la obtención del título de Zootecnista

LEYDI JHOANA HERNÁNDEZ MORALES

**PROGRAMA DE ZOOTECNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA  
2019**



**VARIABILIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN DOS  
ESPECIES FORRAJERAS DEL BOSQUE SECO TROPICAL  
TOLIMENSE Y ACTIVIDAD NEMATICAIDA *in vitro***

Néstor Jaime Romero Jola  
Natalia Escobar Escobar  
**Directores**

**PROGRAMA DE ZOOTECNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA**

**2019**

**Nota de Aceptación**

---

---

---

---

---

---

---

**Firma de Evaluadores**

**Nombre:** \_\_\_\_\_

**Nombre:** \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente quiero agradecer a Dios por su amor y su misericordia, por la oportunidad tan grande que me regalo de poder culminar mis estudios, también quiero agradecer a mi esposo por su comprensión, amor y apoyo incondicional durante este proceso.

Mi gratitud de todo corazón a mis directores el doctor Néstor Jaime Romero Jola y la doctora Natalia Escobar Escobar, por su dedicación y entrega, por compartir sus conocimientos durante todo el proceso investigativo, por la confianza, el respeto que me brindaron, gracias por sus aportes los cuales me permitirán ser una mejor profesional, muchas gracias por sus votos de confianza.

Agradecer de ante mano a Andres Cubides, por su ayuda y colaboración durante el desarrollo de las pruebas en el laboratorio realizadas en la Corporación Colombiana de investigaciñon agropecuaria- centro de investigación Tibaitata (Mosquera- Cundinamarca) y a todas las personas que de alguna formar me ayudaron en cada uno de los procesos de mi trabajo.

Por ultimo quiero agradecer al semillero “Área Verde” por la oportunidad que me brindaron de compartir y aprender, también agradezco a la Universidad del Tolima por la oportunidad de trabajar en este proyecto y a la Universidad de Cundinamarca por la oportunidad de formación como Zootecnista.

## **Tabla de contenido**

	<b>Pág.</b>
Resumen.....	1
Abstract.....	2
<b>1. Introducción.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Planteamiento del problema.....</b>	<b>5</b>
<b>3. Justificación.....</b>	<b>7</b>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>9</b>
<b>5. Marco referencial.....</b>	<b>10</b>
<b>5.1 Especies forrajeras.....</b>	<b>10</b>
<b>5.2 Metabolitos Secundarios.....</b>	<b>11</b>
<b>5.3 Factores que afectan el contenido de metabolitos .....</b>	<b>12</b>
<b>5.4 Factores climáticos.....</b>	<b>13</b>
<b>5.5 Técnicas o métodos de análisis de Metabolitos Secundarios.....</b>	<b>14</b>
<b>5.6 Actividad nematicida de las especies forrajeras.....</b>	<b>14</b>
<b>6. Marco Legal.....</b>	<b>16</b>
<b>7. Materiales y métodos.....</b>	<b>17</b>
<b>7.1 Zona de estudio.....</b>	<b>17</b>
<b>7.2 Colecta de material vegetal, clasificación taxonómica y registro de datos climáticos.....</b>	<b>18</b>
<b>7.3 Análisis químico para la determinación del contenido bromatológico y de metabolitos secundarios.....</b>	<b>19</b>
<b>7.4 Obtención de extractos etanólicos.....</b>	<b>21</b>
<b>7.5 Evaluación de la actividad nematicida en <i>Panagrellus redivivus</i>.....</b>	<b>23</b>
<b>7.5.1 Preparación de extractos.....</b>	<b>23</b>
<b>7.5.2 Montaje del bioensayo con <i>Panagrellus redivivus</i> .....</b>	<b>24</b>
<b>8. Análisis estadístico.....</b>	<b>26</b>
<b>9. Financiación .....</b>	<b>26</b>
<b>10. Resultados y discusión.....</b>	<b>27</b>
<b>10.1 Parámetros nutricionales y variación del contenido de metabolitos secundarios.....</b>	<b>27</b>
<b>10.2 Efecto de variables climáticas sobre el contenido de metabolitos secundarios... </b>	<b>38</b>

<b>10.3</b> Comparación del efecto nematicida de los extractos etanólicos sobre el nematodo de vida libre <i>Panagrellus redivivus</i> .....	41
<b>11.</b> Conclusiones.....	42
<b>12.</b> Recomendaciones.....	43
<b>13.</b> Referencias.....	44
<b>14.</b> Anexos.....	57

**Lista de figuras**

<b>Figura 1.</b> Factores externos e internos que afectan la producción de Metabolito secundarios.....	11
<b>Figura 2.</b> Ubicación geográfica del departamento del Tolima.....	17
<b>Figura 3.</b> Vista satelital de la granja El Recreo de la Universidad del Tolima (UT).....	18
<b>Figura 4.</b> Centro de investigación Animal, Universidad del Tolima.....	18
<b>Figura 5.</b> Proceso para tomas de muestras.....	19
<b>Figura 6.</b> Procedimiento para el secado de las muestras.....	20
<b>Figura 7.</b> Equipo de espectroscopia Scanco (NIRS™ DS2500 F).....	21
<b>Figura 8.</b> Proceso de filtrado por gravedad.....	22
<b>Figura 9.</b> Envasado del extracto.....	22
<b>Figura 10.</b> Pesaje y traspaso de las muestras.....	23
<b>Figura 11.</b> Dimetil sulfoxido DMSO (Sigma Aldrich 99,5%) al 1%.....	24
<b>Figura 12.</b> Ubicación de las muestras en pozos.....	24
<b>Figura 13.</b> Lectura de los pozos bajo el microscopio.....	25
<b>Figura 14.</b> Comparación del promedio porcentual de Materia Seca por planta y por edad.....	28
<b>Figura 15.</b> Comparación del promedio porcentual de Proteína Cruda por planta y por edad.....	29
<b>Figura 16.</b> Comparación del promedio porcentual de Cenizas por planta y por edad.....	30
<b>Figura 17.</b> Comparación del promedio porcentual de Extracto Etéreo por planta y por edad.....	30
<b>Figura 18.</b> Comparación del promedio porcentual de Fibra Detergente Ácida por planta y por edad.....	31
<b>Figura 19.</b> Comparación del promedio porcentual de Fibra Detergente Neutra por planta y por edad.....	32
<b>Figura 20.</b> Comparación del promedio porcentual de Digestibilidad de la Materia Seca,	

Energía Bruta y Energía Digerible por edad y por planta.....	33
<b>Figura 21.</b> Comparación del promedio porcentual de Carbohidratos no Fibrosos por edad y por planta.....	34
<b>Figura 22.</b> Comparación del promedio porcentual de Taninos totales por edad y por planta.....	35
<b>Figura 23.</b> Comparación del promedio porcentual de Taninos condensados por edad y por planta.....	36
<b>Figura 24.</b> Comparación del promedio porcentual de Fenoles totales por edad y por planta.....	37
<b>Figura 25.</b> Comparación del promedio porcentual de Alcaloides totales por edad y por planta.....	37
<b>Figura 26.</b> Variación del contenido de Taninos totales.....	38
<b>Figura 27.</b> Variación del contenido de Taninos condensados.....	39
<b>Figura 28.</b> Variación del contenido de Fenoles totales.....	40
<b>Figura 29.</b> Variación del contenido de Alcaloides totales.....	40
<b>Figura 30.</b> Mortalidad del nematodo de vida libre <i>Panagrellus redivivus</i> .....	41

**Lista de anexos**

	<b>Pág.</b>
<b>Anexo 1.</b> Biomoléculas.....	57
<b>Anexo 2.</b> Soportes de investigaciones realizadas a las variables encontradas.....	58
<b>Anexo 3.</b> Determinación de pruebas para análisis estadístico, para determinar la normalidad de las variables .....	58
<b>Anexo 4.</b> Modelo factorial para la variable Materia Seca.....	59
<b>Anexo 5.</b> Modelo factorial para la variable Proteína Cruda.....	59
<b>Anexo 6.</b> Modelo factorial para la variable Cenizas.....	60
<b>Anexo 7.</b> Modelo factorial para la variable Extracto Etéreo.....	60
<b>Anexo 8.</b> Prueba no paramétrica para la comparación de Fibra Detergente Neutra por edad y por planta .....	61
<b>Anexo 9.</b> Prueba para la comparación de Fibra Detergente Ácida por edad y por planta.....	61
<b>Anexo 10.</b> Modelo factorial para la variable Digestibilidad Materia Seca .....	62
<b>Anexo 11.</b> Modelo factorial para la variable Energía Bruta.....	62
<b>Anexo 12.</b> Modelo factorial para la variable Energía Digerible.....	63
<b>Anexo 13.</b> Prueba para Carbohidratos no Fibrosos.....	63
<b>Anexo 14.</b> Prueba para Taninos Totales.....	64
<b>Anexo 15.</b> Pruebas para Taninos Condensados.....	65
<b>Anexo 16.</b> Prueba para Fenoles Totales.....	66
<b>Anexo 17.</b> Prueba para Alcaloides Totales.....	66
<b>Anexo 18.</b> Prueba de normalidad para las variables climáticas y la relación entre metabolitos secundarios.....	67
<b>Anexo 19.</b> Pruebas no paramétrica para la época y las variables de metabolitos.....	67
<b>Anexo 20.</b> Matriz de correlación Pearson, para la época y el contenido de Taninos Totales.....	68
<b>Anexo 21.</b> Matriz de correlación Pearson, para la época y el contenido de Taninos condensados.....	69
<b>Anexo 22.</b> Matriz de correlación Pearson, para la época y el contenido de Fenoles Totales.....	70

<b>Anexo 23.</b> Matriz de correlación Pearson, para la variable época y el contenido de Alcaloides Totales, en relación a las variables climatologías.....	71
<b>Anexo 24.</b> Prueba de normalidad: Mortalidad.....	71
<b>Anexo 25.</b> Prueba para concentraciones inhibitorias: CI50.....	72
<b>Anexo 26.</b> Prueba para concentraciones inhibitorias: CI59.....	72

## **Abreviaturas**

**MS:** Materia seca

**PC:** Proteína cruda

**Cn:** Cenizas

**E.E:** Extracto Etéreo

**DMS:** Digestibilidad Materia Seca

**FDN:** Fibra detergente neutra

**FDA:** Fibra detergente ácida

**EB:** Energía Bruta

**ED:** Energía digestible

**CNF:** Carbohidratos no fibrosos

**Tt:** Taninos totales

**Tc:** Taninos condensados

**Ft:** Fenoles totales

**Alct:** Alcaloides totales

**THS:** Taninos Hidrosolubles

## Resumen

**Introducción:** La ovinocultura en nuestro país ha presentado un creciente interés dado que ofrece sustento a la economía rural, proporcionando alimento y aporte económico, sin embargo bajo las actuales circunstancias debe enfrentar problemas asociados al parasitismo gastrointestinal y aprovechamiento de nutrientes. **Objetivos:** Analizar la variación temporal de metabolitos secundarios, presentes en *Gliricidia sepium* (*G. sepium*), *Leucaena leucocephala* (*L. leucocephala*) y el efecto nematocida *in vitro* de sus extractos. **Metodología:** El componente de campo se realizó en la granja El Recreo de la Universidad del Tolima (UT) y en los laboratorios de Salud Animal y de Análisis Químico de Forrajes de AGROSAVIA-Tibaitatá, se recolectaron muestras *G. sepium* y *L. leucocephala* a los 0, 42 y 91 días posteriores a la poda, para el análisis bromatológico y la evaluación de los metabolitos secundarios: Taninos totales (Tt) Taninos condensados (Tc), Fenoles totales (Ft) y Alcaloides totales (Alct), se usó la técnica de NIRS (NIRS™ DS2500 F) y para evaluar el efecto antihelmíntico se usó la técnica de viabilidad larval *in vitro* con *Panagrellus redivivus*. **Resultados:** Al comparar el porcentaje de PC entre cortes *G. sepium* presentó el valor más alto (27,45%) a los 91 días de corte, y *L. leucocephala* al día 42 con 30,03%, entre plantas *L. leucocephala* obtuvo el mayor promedio. Para los parámetros MS, PC, EE, FDN y FDA *L. leucocephala* presentó los más altos valores promedio entre cortes el día 42 con 28,68%, 30,0%, 2,62%, 2,62% y 19,87% respectivamente, los cuales estuvieron por encima de los observados con *G. sepium*. Al comparar el contenido de metabolitos secundario entre cortes *L. leucocephala* presentó los más altos promedios el día 91 en Ft, Tt y *G. sepium* obtuvo los más altos promedios el día 42 en Tc y Alct. No se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) de los parámetros bromatológicos y de metabolitos secundarios entre cortes ni entre plantas; en la transición de temporada seca a húmedo se presentaron los mayores contenido de Ft, Tt, Tc y Alct, además se encontró que los extractos vegetales de *G. sepium* tiene mayor efectividad en la mortalidad de las larvas de *Panagrellus redivivus*. **Conclusión:** Al analizar el contenido de metabolitos secundarios con los parámetros bromatológicos en las dos especies con potencial forrajero estudiadas, se encontró que son similares en cuanto a sus valores nutricionales, con relación al contenido de metabolitos secundarios (Tt y Ft) *G. sepium* presento niveles bajos, *L. leucocephala* presentó porcentajes de Tc y Alct más bajos el día 42, lo que indica que estas especies en el día 42 se pueden aprovechar nutricionalmente y pueden tener efecto biológico en los parásitos que afecta a las producciones ovinas. Al comparar los periodos climáticos, se encontró que en la transición de temporada seco a húmedo, el contenido de metabolitos secundarios (Tc, Tt, Ft y Alct) es mayor que en las otras épocas; mediante el uso del modelo biológico *Panagrellus redivivus* se encontró que el extracto *G. sepium* presentó un porcentaje de mortalidad 31,47 a una concentración 22,4 mg/ml, a diferencia de *L. leucocephala* la cual presentó un porcentaje de mortalidad 11,30% a una concentración 43,35 mg/ml. **Palabras claves:** Bioprospección, ovinos, actividad antihelmíntica, leguminosas arbóreas.

## Abstract

**Introduction:** The ovinocultura in our country has presented a growing interest since it offers sustenance to the rural economy, providing food and economic contribution, however under the current circumstances it must face problems associated with gastrointestinal parasitism and nutrient utilization.

**Objectives:** To analyze the temporal variation of secondary metabolites, present in *Gliricidia sepium* (*G. sepium*), *Leucaena leucocephala* (*L. leucocephala*) and the effect nematicides in vitro of its extracts.

**Methodology:** The field component was carried out in the El Recreo farm of the University of Tolima (UT) and in the Animal Health and Forage Chemical Analysis laboratories of AGROSAVIA-Tibaitata, samples were collected *G. sepium* and *L. leucocephala* at 0 , 42 and 91 days after pruning, for the bromatological analysis and evaluation of secondary metabolites: Total tannins (Tt) Condensed tannins (Tc), Total phenols (Ft) and Total alkaloids (Alct), the technique of NIRS (NIRSTM DS2500 F) and to evaluate the anthelmintic effect the larval viability technique was used *in vitro* with *Panagrellus redivivus*.

**Results:** When comparing the percentage of PC between cuts, *G. sepium* presented the highest value (27.45%) at 91 days of cutting, and *L. leucocephala* at day 42 with 30.03%, among plants *L. leucocephala* obtained the highest average. For the parameters DS, CP, EE, NDF and ADF *L. leucocephala* presented the highest average values between cuts on day 42 with 28.68%, 30.0%, 2.62%, 2.62% and 19.87 % respectively, which were above those observed with *G. sepium*. When comparing the secondary metabolite content between sections *L. leucocephala* presented the highest averages on day 91 in Ft, Tt and *G. sepium* obtained the highest averages on day 42 in Tc and Alct. No significant differences ( $P < 0.01$ ) were found in bromatological parameters and secondary metabolites between cuts or between plants; In the transition from dry to wet season, the highest content of Ft, Tt, Tc and Alct were presented, in addition it was found that plant extracts of *G. sepium* have greater effectiveness in the mortality of the larvae of *Panagrellus redivivus*.

**Conclusion:** When analyzing the content of secondary metabolites with the bromatological parameters in the two species with forage potential studied, it was found that they are similar in terms of their nutritional values, in relation to the content of secondary metabolites (Tt and Ft) *G. sepium* presented low levels *L. leucocephala* had lower percentages of Tc and Alct on day 42, which indicates that these species on day 42 can be harnessed nutritionally and can have a biological effect on the parasites that affect sheep production. When comparing the climatic periods, it was found that in the transition from dry to wet season, the content of secondary metabolites (Tc, Tt, Ft and Alct) is higher than in the other periods; Through the use of the biological model *Panagrellus redivivus*, it was found that the *G. sepium* extract presented a 31.47 mortality percentage at a concentration of 22.4 mg / ml, unlike *L. leucocephala* which presented a mortality percentage 11.30 % at a concentration 43.35 mg / ml.

**Keywords:** Bioprospecting, sheep, anthelmintic activity, tree legumes.

## 1. Introducción

Las gramíneas y las leguminosas desempeñan una función importante en la alimentación animal, dada su calidad nutricional y su producción de biomasa, lo que permite su aprovechamiento en la perspectiva de sustituir o reducir el uso de alimentos concentrados (Herrera *et al.*, 2017); dentro de estas especies vegetales se destacan dos especies: *G. sepium*, la cual presenta características atractivas para los agrosistemas tropicales, pues en épocas de sequía conserva altos contenidos de proteína (Santacoloma & Granados, 2012) y *L. leucocephala* que al ser incluida en la dieta de pequeños rumiantes, provee proteína y sustancias que favorecen la degradación de la fibra y sirven como activadores del crecimiento de muchas bacterias ruminales (Barros *et al.*, 2016). Los diversos contenidos de metabolitos secundarios encontrados en *G. sepium* y *L. leucocephala*, han demostrado que tienen efecto nematocida sobre parásitos gastrointestinales (Rodolfo *et al.*, 2018), los cuales afectan directamente a pequeños rumiantes, generando pérdidas económicas (Cepeda, 2017), debido a su alta capacidad patógena al producir anemia, pérdida de peso y mortalidad en corderos y vientres.

Las especies forrajeras son vulnerables ante cualquier cambio ambiental abrupto, para sobrellevar cualquier situación de estrés, las plantas alteran o modifican su fisiología, desarrollando mecanismos para superarlo (Mohammed W, 2017), esto les ha permitido desarrollar diversas estrategias para su protección, una de ellas es la producción de metabolitos secundarios (Taninos condensados e hidrolizables, flavonoides, terpenoides, alcaloides, etc), los cuales actúan como defensa contra depredadores y patógenos (Valares *et al.*, 2016); la variación de metabolitos secundarios, está asociada a la estación climática (periodos secos o lluviosos), edad de rebrote, entre otros factores (Herrera *et al.*, 2017); la aceptabilidad de las especies forrajeras está directamente relacionada a la presencia de dichos metabolitos (de Deus *et al.*, 2013) y su calidad está correlacionada con los cambios drásticos en la concentración de los nutrientes, según la época de crecimiento o maduración de la planta (Torp, 2010), esto refleja la necesidad de manejar eficientemente los recursos forrajeros, comúnmente utilizados en los sistemas de producción de pequeños rumiantes en el trópico.

La ovinocultura ha ganado un importante terreno en nuestro país en los últimos años, dado que ofrece sustento a la economía rural, proporcionando alimento y permitiendo la implementación de producciones sostenibles (Alvarado *et al.*, 2017), dicha producción es afectada por el

endoparasitismo por nematodos, entre las especies que más afectan a los pequeños rumiantes, se halla: *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus spp*, *Oesophagostomun spp*, *Strongyloides spp*, *Trichuris spp*, *Skjabinema ovis* y *Moniezia expanza* (Cepeda, 2017), los cuales representan las pérdidas económicas y productivas más significativas en los sistemas pecuarios de Colombia (Salas *et al.*, 2016), por esta razón es importante hacer control de los parásitos gastrointestinales, con el fin de disminuir dichas mermas en la industria ovina.

La finalidad de este proyecto, es analizar la variación de metabolitos secundarios presentes en *G.sepium* y *L. leucocephala* y el efecto nematicida *in vitro* de sus extractos, que ameritan esfuerzos desde el escenario investigativo.

Línea de investigación: Medios de vida y manejo sostenible de sistemas agropecuarios.

## 2. Planteamiento del problema

El endoparasitismo por nematodos representa las causas económicas más significativas en los sistemas pecuarios de Colombia, estos parásitos alteran el bienestar animal y los parámetros productivos como ganancia de peso, desarrollo corporal y reproductivo, en especial en sistemas donde se maneja el pastoreo (Salas *et al.*, 2016). En nuestro país se presenta una baja nutrición en las producciones ovinas, por suministro de dietas deficientes de nutrientes esenciales y el mal manejo de las praderas (Bernal H, 2014), esto se ve reflejado en las rotaciones cortas y sin días de descanso aptos para el crecimiento de las especies forrajeras, que le provean nutrientes digeribles al animal (Cepeda, 2017); este déficit nutricional afecta el buen funcionamiento inmunitario (Ceñ *et al.*, 2016) haciéndolo más susceptible al ataque de nematodos gastrointestinales, situación que limita las producciones ovinas del país, lo que genera pérdidas en la producción, debido a la capacidad que tienen los nematodos de afectar la utilización de los nutrientes, provocar mortalidad y reducir la eficiencia productiva (Molefe *et al.*, 2012).

Adicionalmente el uso indiscriminado de nematicidas, ha ocasionado el desarrollo de resistencia a productos de síntesis química (Mcrae *et al.*, 2015) afectando la productividad de los animales, lo que ocasiona pérdidas económicas para el productor, representadas en insumos, servicios veterinarios, reducción de la eficiencia productiva descarte y pérdida de animales (Biffa *et al.*, 2006). Los metabolitos secundarios son compuestos producidos por las plantas en respuesta a condiciones medioambientales como plagas y enfermedades, depredadores, tipo de suelo, época de invierno o verano, etc (Iason, 2018; Pavarini *et al.*, 2012), dentro de este grupo de compuestos se han identificado taninos, flavonoides, fenoles, saponinas, terpenoides, antraquinonas, alcaloides, etc, de los cuales varios presentan actividad antihelmíntica (Hoste *et al.*, 2006; de Deus *et al.*, 2013) (Anexo 1).

Algunos estudios han comprobado la variabilidad de estos metabolitos y su asociación a factores ambientales (Turtola, 2005), resultado que hace pertinente el estudio sobre la variación de metabolitos secundarios alrededor de la época de aprovechamiento de forrajes y su relación con variables ambientales y nutricionales en condiciones del trópico, así como la evaluación del efecto nematicida *in vitro* en la perspectiva de generar alternativas sostenibles basadas en el uso de recursos locales.

El propósito de esta investigación es comparar el contenido bromatológico y la variación temporal de taninos, fenoles, alcaloides, en tres momentos de corte de las especies forrajeras *G. sepium* y *L. leucocephala*, analizando su relación con variables climáticas y actividad nematocida *in vitro* con *Panagrellus redivivus*.

### 3. Justificación

La producción ovina en Colombia ha sido considerada una actividad secundaria, que cuenta con características que hacen que este sistema sea rentable a un corto plazo, por ser una especie rústica, con alta fertilidad, prolificidad y longevidad (Simanca *et al.*, 2017). La nutrición que se le proporciona a los rumiantes en el trópico es de pastoreo intensivo o extensivo de leguminosas y gramíneas (Candelaria-Martínez, 2017) por esta razón, es necesario conocer la composición de estas especies y su aporte en la alimentación (Aguirre *et al.*, 2016), si además se considera que el aporte de nutrientes tiene un papel fundamental, en el mantenimiento del status inmunitario y su consecuente efecto sobre la defensa frente a agentes patógenos como los parásitos gastrointestinales (Toscan *et al.*, 2012). El parasitismo gastrointestinal, es uno de los principales problemas sanitarios de mayor importancia, que tiene una relación económica negativa en la industria ovina, el primer caso de multiresistencia de nematodos gastrointestinales de ovinos en Colombia, se reportó en Cundinamarca y Valle del Cauca (Cepeda, 2017); los ovinos comparten parasitosis mixta, las razas criollas son menos susceptibles al ataque de estos parásitos gracias a las características innatas, que impiden la colonización de las larvas (Cepeda, 2017), entre las especies que más afecta a los pequeños rumiantes son *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus spp*, *Oesophagostomum spp*, *Strongyloides spp*, *Trichuris spp*, *Skjabinema ovis* y *Moniezia expanza* (Chaweewan *et al.*, 2015).

Algunos estudios reportan residualidad de medicamentos confirmando la presencia de nematicidas en productos y subproductos tales como: leche, canal, lana. (Mateos, 2016); a su vez (Grueiro, 2002), reporto el riesgo que los agentes antiparasitarios pueden tener en los parásitos de vida libre, así como en otros organismos presentes en el medio ambiente, estas investigaciones han llevado a la exploración de alternativas de control parasitario (Salas *et al.*, 2016), dentro de las que sobresale, el uso de compuestos de origen vegetal para el control de parásitos (Pérez *et al.*, 2014); estudios han identificado que algunas plantas forrajeras presentan metabolitos secundarios, además de tener función nematicida (Bauri *et al.*, 2015), estos compuestos se biosintetizan a través de vías metabólicas y cumplen varias funciones ecológicas dentro de las especies forrajeras, facilitando resistencia a factores bióticos y abióticos; los metabolitos varían según la especie, etapa de desarrollo de la planta, variaciones climáticas,

patógenos, depredadores, entre otros factores que conducen a la variabilidad en su contenido (Valares *et al.*, 2016).

Dentro de los metabolitos secundarios de las plantas existen reportes de que los taninos, permiten mejorar la resiliencia (crecimiento, producción de lana y disminución de signos clínicos) y la resistencia (menor cantidad de nematodos en heces, menor carga parasitaria) de los ovinos infestados con nematodos gastrointestinales (Toro *et al.*, 2014), también se ha demostrado que los alcaloides y fenoles, según Mukherjee *et al.* (2015) poseen actividad antiparasitaria frente a dichos nematodos y su contenido puede presentar efectos indirectos en la respuesta inmune de los animales (Quijada *et al.*, 2015), lo cual resulta de interés desde la perspectiva de manejar eficientemente los recursos forrajeros, comúnmente utilizados en los sistemas de producción ovina del trópico.

A su vez, es importante conocer la variación temporal de los contenidos de taninos, fenoles y alcaloides de dos especies forrajeras del bosque seco tropical *G. sepium* y *L. leucocephala*, teniendo en cuenta que dichas especies presentan amplia distribución dentro del país (Pizano C., 2014) además, se han empleado en la alimentación animal en producciones intensivas y poseen un alto valor nutricional durante el periodo de aprovechamiento; por estas razones se hace necesaria la búsqueda de estrategias innovadoras que controlen los ciclos de vida de los parásitos que afectan a las producciones ovinas y que además puedan ser usadas por los productores de las zonas rurales (Rivero & Jaramillo, 2019).

## 4. Objetivos

### General

Analizar la variación temporal de metabolitos secundarios, presentes en *G. sepium*, *L. leucocephala* y el efecto nematocida *in vitro* de sus extractos.

### Específicos

- Comparar los parámetros nutricionales: materia seca (MS), proteína cruda (PC), cenizas (Cn), extracto etéreo (E.E), fibra detergente ácida (FDA), fibra detergente neutra (FDN), digestibilidad de materia seca (DMS), energía bruta (EB), energía digerible (ED), carbohidratos no fibrosos (CNF) y los metabolitos secundarios (Taninos, Fenoles y Alcaloides) de *G. sepium* y *L. leucocephala*, alrededor del periodo de aprovechamiento.
- Analizar la relación entre el contenido de metabolitos secundarios (Taninos, Fenoles y Alcaloides) y factores climáticos (fluctuación de la temperatura, precipitación y humedad relativa).
- Determinar la actividad nematocida *in vitro* de los extractos vegetales obtenidos a partir de las 2 especies forrajeras.

## 5. Marco referencial

### 5.1 Especies forrajeras

Las plantas de interés forrajero tienen amplia distribución en el trópico (Herrera *et al.*, 2017) por esta razón las gramíneas y leguminosas, han sido empleadas en la alimentación animal, mediante los sistemas silvopastoriles o como suplemento a las dietas (Santacoloma-varón & Granados, 2012), a su vez las gramíneas tropicales presentan una alta tasa fotosintética lo que les permite producir altas tasa de biomasa, presentando características bioquímicas y fisiológicas, que las destaca como opción eficiente en climas templados (Figueroa *et al.*, 2016). *G. sepium* es una leguminosa arbórea la cual es perenne, originaria de Centro América y norte de Sur América,, encontrándose distribuida ampliamente en las regiones tropicales (Hurtado *et al.*, 2012); esta especie presenta características atractivas para los agrosistemas tropicales ya que incrementa la captura del nitrógeno mejorando la calidad del suelo, presentado asociación con la cantidad de lombrices de tierra y la materia orgánica contenida en el suelo (Rodolfo *et al.*, 2018) también contiene menor concentración de taninos condensados, en comparación con otras especies, esta concentración de taninos podrían explicar el comportamiento de los animales al momento de seleccionar esta especie para su alimentación (Santacoloma-varón & Granados, 2012), según estudios realizados de la hoja de *G. sepium*, es un excelente forraje para dietas tropicales, ya que presenta compuestos nutricionales altos, buena degradabilidad y los principios tóxicos más bajos en comparación a otros forrajes, sus hojas son empleadas como repelente de ectoparásitos, siendo una alternativa de uso dentro de los agroecosistemas, al servir como controlador de plagas (Rodolfo *et al.*, 2018).

La *L. leucocephala*, se encuentra bien adaptada a las condiciones tropicales (Zambrano *et al.*, 2006) ésta presenta un alto potencial forrajero y buena aceptación animal, donde la producción de materia seca depende de la fertilidad del suelo, las condiciones ambientales, las prácticas de manejo y la forma de cultivo; esta leguminosa forrajera es altamente resistente a la sequía debido a las propiedades arbustivas que poseen, a su vez se resalta su amplia distribución a los largo del país, al ser una especie exótica que se ha adaptado a los suelos y a las condiciones climáticas de los bosques secos tropicales de las regiones del Valle del Cauca, Boyacá, Caldas, Cesar, Choco, Meta, Tolima etc. (Pizano, C., 2014).

## 5.2 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios, son compuestos derivados de la biosíntesis del metabolismo primarios de las plantas (Zheng *et al.*, 2014), donde se proporcionan un gran número de moléculas simples como el ácido shiquímico, el acetato y los aminoácidos los cuales constituyen los moléculas de partida para los metabolitos secundarios (García, 2004), el ácido shiquímico da origen a compuestos aromáticos entre ellos se encuentran los aminoácidos, ácidos cinámicos y algunas estructuras polifenólicas; el acetato es el precursor de los ácidos grasos y de los policétidos en la ruta del acetato-malonato y los terpenos o isoprenoides son sintetizados en la ruta del acetato-mevalonato, a su vez los aminoácidos son precursores de los alcaloides y de los antibióticos peptídicos (Ávalos & Pérez, 2009). Estos metabolitos secundarios se acumulan en las hojas durante las temporadas más secas, además las sustancias que contienen estos metabolitos se acumulan cuando las plantas esta sometidas al estrés por sequía (Marielle *et al.*, 2016) dichos metabolitos son sustancias elaboradas por las plantas como defensa (Santacoloma-varón & Granados, 2010) y su producción puede verse afectada por diversos factores (Figura 1.)

**Figura 1.** Factores externos e internos que afectan la producción de metabolitos secundarios.

Autores	Factores		
	Externos	Internos	Estrés climático
(Wasim Siddiqui M, 2017)	Infestación microbiana	Contenido de clorofila	Intensidad de insolación solar.
(Ávalos & Pérez, 2009)	Sobrepastoreo	Luminosidad	Fluctuación de la temperatura.
	Hongos	Estrés nutricional	La precipitación
	Época de foliación	Fotosíntesis	La velocidad de los vientos.
	Fertilización	Actividad RuBisCo	

Los metabolitos secundarios encontrados en especies forrajeras están integrados por los taninos, fenoles, alcaloides, etc, los cuales pueden influenciar en el crecimiento y la productividad de los animales (Herrera *et al.*, 2017), dichos metabolitos secundarios contribuyen al olor y sabores de las plantas, además están involucrados en la protección de las plantas contra diversas tensiones ambientales, que afectan la química de la planta (Torp, 2010; de Deus *et al.*, 2013); la interacción

química entre las plantas y el entorno está dirigida por la biosíntesis de metabolitos secundarios, los cuales ejercen sus funciones biológicas, como una respuesta adaptativa al entorno (Gershenson, 1984). Estos metabolitos secundarios se encuentran divididos en dos categorías los que tienen capacidad de fijar carbono y los que están limitados por la concentración de nutrientes; se ha considerado que dentro de la especie ocurre una disminución de los nutrientes y un aumento de la adquisición de carbono mediado por las condiciones ambientales (Horner *et al.*, 1988), situación que afecta la aceptabilidad de las gramíneas y leguminosas tropicales, siendo mediadas por la presencia de metabolitos secundarios (Pereira *et al.*, 2018),

### **5.3 Factores que afectan el contenido de metabolitos**

El contenido de metabolitos secundarios varían según la especie, etapa de desarrollo de la planta, variaciones climáticas (congelación, sequía, altas temperaturas, humedad), deficiencia de nutrientes, enfermedades, patógenos, depredadores, luminosidad, suministro de agua, CO<sub>2</sub>, la salinidad, los rayos UV, la alcalinidad, heridas y tratamientos con herbicidas, (Valares *et al.*, 2016; De Freitas *et al.*, 2014; Ramakrishna A., & Gokare, 2011; Gershenson, 1984), se ha determinado que los factores ambientales como: el estrés por la sequía, conduce a la deshidratación celular (Ramakrishna A., & Gokare, 2011) lo que influye directamente sobre el crecimiento de las plantas y la producción de los metabolitos secundarios (Galindo *et al.*, 2014).

Se han estudiado diversas especies de plantas con posibles propiedades antihelmínticas, como solución orgánica la afectación de los nematodos (Kabore *et al.*, 2012), entre ellas se tiene *G.sepium*, la cual proporciona proteína y metabolitos secundarios como: saponinas, taninos condensados, terpenoides, etc (Molina *et al.*, 2016), además se ha determinado que los extractos de esta especie, inhibe la supervivencia de las larvas de *H. contortus* (Wabo Pone *et al.*, 2011), también afecta algunos procesos biológicos y los huevos de nematodos gastrointestinales (Pérez *et al.*, 2014); estudios realizados con extractos de *L.leucocephala*, han mostrado efectividad sobre las larvas de *H. contortus*, esto se asocia a compuestos como taninos condensados y fenoles, (De Freitas *et al.*, 2014), a su vez se encontro que la semilla de esta especie, es util para expulsar gusanos de áscaris (Ademola *et al.*, 2005).

#### 5.4 Factores climáticos

La mayoría de las especies tropicales, sufren por la estacionalidad de las lluvias, lo que genera un estrés por sequía (Sedio *et al.*, 2017), las leguminosas tropicales presentan baja palatabilidad para los rumiantes en la transición de lluvias a seco, por la concentración del contenido de metabolitos secundarios (Pereira *et al.*, 2018); los factores climáticos tiene una correlación directa en las especies con potencial forrajero, en cuanto a *G. sepium* se ha reportado que en época seca aporta minerales, energía digestible, proteína fermentable y sobrepasante para los rumiantes, favoreciendo el crecimiento adecuado de la micro flora ruminal y la eficiencia de la utilización del forraje de baja calidad ,al incrementar la digestibilidad (Rodolfo *et al.*, 2018), en cuanto a *L. leucocephala*, la variación química de esta especie arbórea está influenciada por la edad del rebrote y los factores climáticos (Herrera *et al.*, 2017), teniendo en cuenta que en épocas de lluvia, esta especie presenta menor proporción de hojas y mayor crecimiento del tallo, lo que se le atribuye al crecimiento de la planta en esta época (Candelaria-Martínez *et al.*, 2017); a diferencia de las épocas de sequía, donde la planta sufre un estrés que afecta directamente el crecimiento y el desarrollo de la misma, teniendo en cuenta que el agua disponible en el suelo se reduce a niveles críticos, disminuyendo su productividad (Ramakrishna A., & Gokare, 2011; Shitan, 2016), al ocurrir las transiciones de lluvia a seco, se generan las limitaciones en el crecimiento de las plantas y a su vez disminuye su calidad, lo que limita la ingesta en los rumiantes (Pereira *et al.*,2018).

La implementación de esta leguminosa en la dieta de pequeños rumiantes, genera la producción de ácidos grasos de cadena corta ramificados y aminoácidos, estas sustancias favorecen la degradación de la fibra y sirven como activadores del crecimiento de muchas bacterias ruminales, ayudando a mejorar las ganancias de peso diarias en ovinos (Barros *et al.*, 2016), además estas especies forrajeras pueden mejorar la nutrición de los rumiantes, debido a la gran cantidad de proteína, lo que mejora la digestibilidad en el rumen (Iason, 2018); de esta manera se puede considerar el uso eficiente del agua en los sistemas agroforestales en épocas de sequía (Rodolfo *et al.*,2018), a su vez se ha determinado que estas especies contienen compuestos fenólicos, los cuales tiene acción sobre la fermentación ruminal y la reducción de emisiones de gas metano, dentro de esos compuestos se encuentran los taninos, los cuales pueden variar según

la temperatura a la cual crece la especie, la madurez de la planta, entre otros factores (García *et al.*, 2016).

La suplementación en pequeños rumiantes de energía, proteína, vitaminas, minerales, etc, ayuda a mejorar la reacción inmunitaria de los animales (Cepeda, 2017), siendo de relevancia dada la prevalencia de las infestaciones en Colombia, las cuales se pueden asociar al clima tropical por las variaciones (humedad, temperatura), las enfermedades por parásitos son más frecuente en invierno donde se reporta (20%) y en la fase de invierno a verano se reportan (10%) de los casos (Cepeda, 2017).

### **5.5 Técnicas o métodos de análisis de Metabolitos Secundarios**

Existen técnicas que permiten realizar el reconocimiento de metabolitos secundarios, algunas de ellas se realizan por medio de pruebas fitoquímicas preliminares (pruebas de marcha fitoquímica), estas son pruebas cualitativas de caracterización que cambian la estructura molecular de un compuesto mediante una reacción química (Mora *et al.*, 2018), existen técnicas no destructivas que permiten obtener el análisis cualitativo y cuantitativo mediante el uso de espectroscopia del infrarrojo cercano (Zossi *et al.*, 2010), también se pueden realizar métodos analíticos tales como: la determinación cuantitativa de fenoles y taninos por el método de espectrofotometría de absorción, de taninos por el método de titulación con curva calibración, de alcaloides basado en el método de Shamsa, de flavonoides aplicando el método con modificaciones de Feltrin, de saponinas totales en extractos vegetales etanólicos o acuosos, determinación indirecta de saponinas por determinación cuantitativa de azúcares reductores en extractos alcohólicos o acuosos de especies vegetales, entre otros (Rojas *et al.*, 2015).

### **5.6 Actividad nematicida de las especies forrajeras**

Investigadores como Martínez-Valladares *et al.*, 2013, han establecido la necesidad de considerar los frecuentes reportes relacionados a la resistencia de nematicidas, estas investigaciones han llevado a una creciente exploración de alternativas estratégicas de control parasitario, dentro de las que sobresale el uso de compuestos de origen vegetal, para el control de parásitos gastrointestinales (Pérez *et al.*, 2014). El uso de plantas ricas en metabolitos secundarios y especialmente aquellas que contiene taninos y fenoles, han demostrado que presentan actividad antiparasitaria frente a nematodos gastrointestinales, según (Hoste *et al.*, 2006) el efecto

nematicida de los taninos, ha sido asociado por su capacidad de formar complejos con la proteína de los parásitos, de esta forma pueden afectar la biología de los nematodos interfiriendo en su motilidad, además de intervenir en el proceso de desvaine, desarrollo larvario y la eclosión del huevo (Pérez *et al.*,2014).

El nematodo de vida libre *Panagrellus redivivus*, ha sido utilizado como modelo experimental para ensayos nematicidas de parásitos gastrointestinales, debido a su facilidad de mantenimiento y su uso como modelo biológico (Soares *et al.*, 2013 & Cunha *et al.*, 2003), siendo este un nematodo de vida libre que al ser ovovivíparo libera 10 a 40 crías entre 24 y 36 horas durante 20 a 25 días que dura su ciclo de vida, las crías alcanzan la madurez sexual a los tres días de vida (Figuroa, 2009), el medio más utilizado para la reproducción de *Panagrellus redivivus* es el cultivo en avena ( de Lara *et al.*, 2007).

## 6. Marco legal

Las principales normas que rigen las producciones ovinas en Colombia son la **Resolución 2304 de 2015 ICA**, la cual establece los requisitos sanitarios y de inocuidad para la certificación de las Buenas Prácticas Ganaderas, en la producción primaria de ovinos y caprinos destinados al consumo humano, que unificado al **Decreto 1500 de 2007** donde se establece el control de la carne, productos cárnicos, comestibles y derivados de la carne destinado para el consumo humano, desde cada una de las fases del beneficio y la comercialización (ICA, 2015).

Resaltando el artículo 3° del Decreto **1500 de 2007** donde se presentan las definiciones sobre:

**Alimento inocuo:** Es aquel que no causa efectos nocivos en la salud del consumidor (ICA, 2015).

**Buenas Prácticas Ganaderas (BPG):** Donde se resalta el propósito de disminuir riesgos físicos, químicos y biológicos en la producción primaria de alimentos de origen animal, que puedan generar riesgos en el consumidor (ICA, 2015).

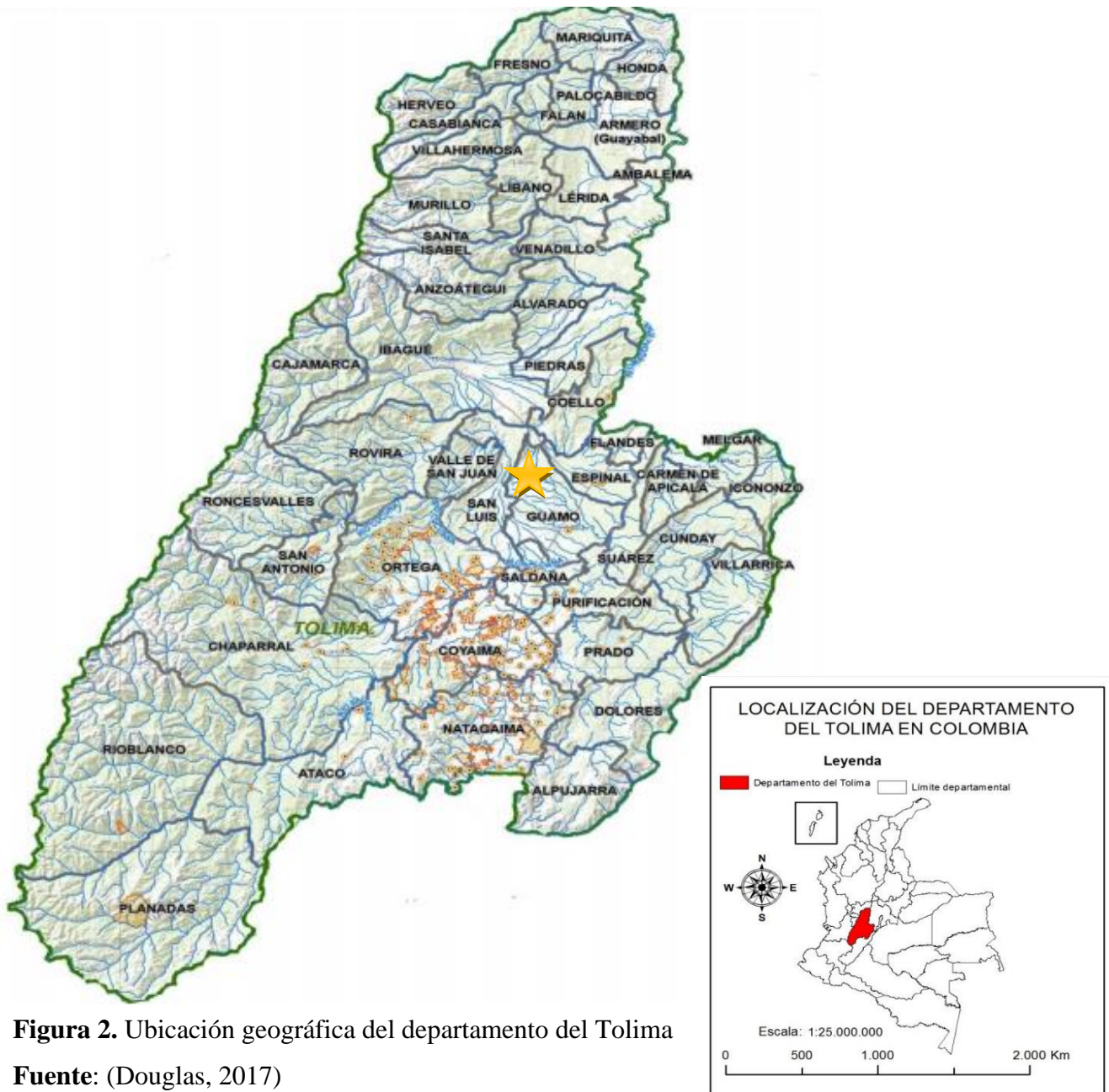
**Buenas Prácticas en el uso de Medicamentos Veterinarios (BPMV):** Se establecen los métodos de empleo oficiales recomendados para el uso de los medicamentos veterinarios de conformidad, con la información registrada en el rotulo incluyendo el tiempo de retiro y el uso de medicamentos aprobados por el ICA.

A su vez el **Decreto 2478 de 2018**, establece todos los procedimientos sanitarios para la importación y exportación de las materias primas destinadas para el consumo humano, cumpliendo los requisitos de inocuidad.

## 7. Materiales y métodos

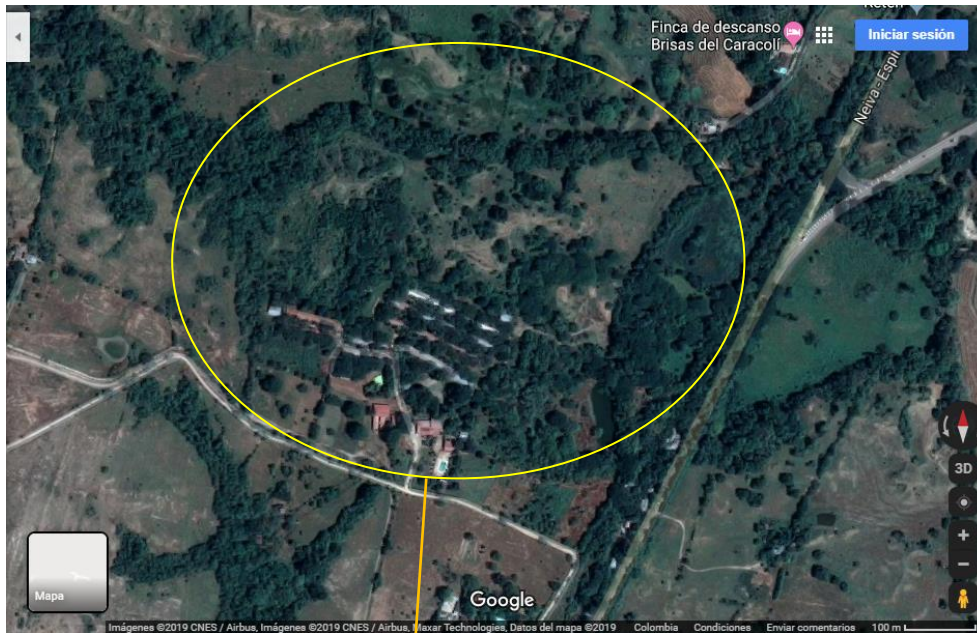
### 7.1 Zona de Estudio

El componente de campo se realizó en la granja El Recreo de la Universidad del Tolima (UT), situada en la vereda Caracolí del municipio del Guamo, en el departamento del Tolima (Colombia) ubicada a 400 msnm, 04°01'57" latitud Norte y 74°58'19" longitud Oeste. La ubicación pertenece a la zona de vida bosque seco tropical (bs-T), la temperatura promedio está en 27,1 °C con precipitación de 216 mm.



**Figura 2.** Ubicación geográfica del departamento del Tolima

Fuente: (Douglas, 2017)



**Figura 3.** Vista satelital de la granja El Recreo de la Universidad del Tolima (UT).

**Fuente:** Google maps, 2019



**Figura 4.** Centro de investigación Animal, Universidad del Tolima.

**Fuente:** Autor, 2018

## 7.2 Colecta de material vegetal, clasificación taxonómica y registro de datos climáticos

Para la investigación se emplearon dos especies forrajeras del bosque seco tropical, entre ellas se encuentra: *G. sepium* y *L. leucocephala*, las cuales fueron clasificadas taxonómicamente en el laboratorio de botánica de la Universidad del Tolima, estas dos especies forrajeras se

encontraban ubicadas en la finca el Recreo. En la figura 5, se observa el proceso realizado para la recolección de las muestras, para ello se registró el diámetro del tronco principal y se tomaron 3 muestras representativas de cada una de las especies (500g) seleccionadas aleatoriamente, un mes antes de iniciar la toma de muestras se registró información climatológica de pluviosidad, temperatura y humedad relativa, con los equipo R FUESS BERLIN-STEGLITZ (Thies CLIMA), Zu diesen Apparat gehört y R FUESS pluviómetro FNH, para el correspondiente análisis, el primer corte se realizó el día cero del experimento, se recolectaron las hojas y tallos en bolsas de papel, los días en los que se realizó la poda fueron 0, 42 y 91 entre los meses de Marzo y Junio del 2018, donde se presentó transición de temporada seca a lluvia.



**Figura 5.** Proceso para toma de muestras

**Fuente:** Autor, 2018

En cada momento se enumeraron muestras, las cuales se dejaron secar a temperatura ambiente que oscilo entre los 15-24 °C a la sombra, con volteo tres veces por día durante 15 días, a continuación el material se limpió y se pesó.

### **7.3 Análisis químico para la determinación del contenido bromatológico y de metabolitos secundarios**

El procedimiento se llevó a cabo en el laboratorio de Análisis Químico de Forrajes de AGROSAVIA Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria- centro de investigación Tibaitatá (Mosquera-Cundinamarca), para lo cual se realizó el secado total de las muestras en un horno MARBAGO® a 50 °C por un tiempo de 24 a 48 horas, el molido se llevó a cabo en un molino Retsch SM 100 con un tamiz de 4 a 6 mm, a continuación se aplicaron los procedimientos para determinar el contenido de metabolitos secundarios y los parámetros

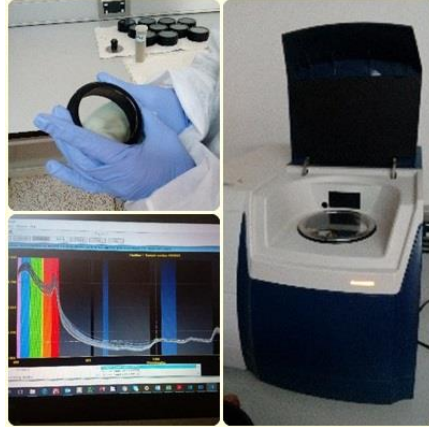
nutricionales, como se observa en la figura 6; después de moler las muestras, se envasaron a frascos de plástico transparente y se identificaron.



**Figura 6.** Procedimiento para el secado de las muestras

**Fuente:** Autor, 2018

Las muestras molidas, se llevaron a un equipo de espectroscopía Scanco (NIRS<sup>TM</sup> DS2500 F) como se observa en la figura 7, para determinar las variables nutricionales y el contenido de taninos, fenoles y alcaloides. Para el análisis de las muestras se usaron celdas Ring Cup, el equipo funciona mediante dos software: el Mosaico Solo (DS2500) y el FOSS (ISIScan Nova<sup>TM</sup>), el primero define mediante el espectro el tipo de archivo a trabajar, para esta investigación se empleó (NIRS), el cual es la huella del forraje, dado que contiene información de las propiedades físico-químicas y los compuestos orgánicos, seguidamente se estipula el tipo de muestra que se va analizar, el modelo de predicción, se describe el perfil de parámetros y se adiciona la información correspondiente a georreferencia (territorio, predio, latitud, altitud), estado fenológico, condiciones agroclimáticas y estado de la muestra (especie, hojas, tallos, fresca, seca, molida, húmeda). Los datos obtenidos del NIRS en cuanto a las variables nutricionales fueron: MS, PC, Cn, EE, FDN, FDA, DMS, EB, EDR y para los metabolitos secundarios taninos totales (Tt), taninos condensados (Tc), fenoles totales (Ft) y alcaloides totales (Alct).



**Figura 7.** Equipo de espectroscopia Scanco (NIRS™ DS2500 F)  
**Fuente:** Autor, 2019

Al terminar el scanner se enviaron los datos al software FOSS (ISIScan Nova™), este emplea un Check Sample (testigo) para verificar que el equipo este calibrado, para lo cual se comparan los datos arrojados por el NIRS, pretto y los datos de referencia, obtenidos de análisis anteriores a especies forrajeras, unificados en un modelo matemático mediante la ecuación de calibración, esta ecuación se mide con respeto a las variables de la muestra, junto al algoritmo LOCAL (el cual hace grupos de plantas y realiza la predicción mediante un curva, que compara los resultados de la muestra con los resultados de otras especies colectadas y analizadas en esa región), los resultados obtenidos se pasan por el set de validación, donde se evalúan estadísticamente con un coeficiente de correlación del 99%. Para realizar el análisis en el Equipo de espectroscopia Scanco (NIRS™ DS2500 F) se envasaron las muestras en una celda previamente aspirada la cual cuenta con un chip, que permite realizar la lectura de los parámetros, al terminar el proceso se enviaron los datos obtenidos a la plantilla de recursos alimenticios para animales del trópico (Alimento).

#### **7.4 Obtención de extractos etanólicos.**

Las muestras molidas se identificaron, se registró el peso seco y se depositaron en frascos ámbar de 200 mL, a continuación se le agregó etanol grado analítico PA-ACS-IS (AppliChem Panreac ITW Companies) al 99.8%, en una proporción de hojas molidas y etanol de 1:1,5 con relación a *G. sepium* y 1:1 para *L. leucocephala*, el macerado se realizó durante 5 días agitando la mezcla 2 veces al día. Se realizó el macerado de las muestras pertenecientes a las 2 plantas en los 3

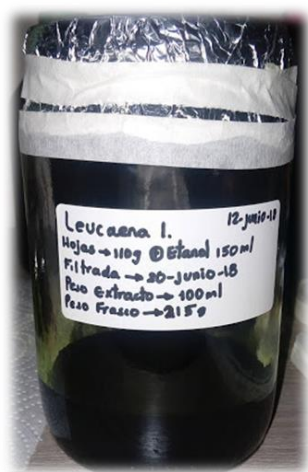
momentos de corte, a continuación se procedió a filtrar por gravedad la mezcla, usando un embudo de vidrio, un Erlenmeyer y papel filtro BOECO 3hw, 185 mm (Figura 8).



**Figura 8.** Proceso de filtrado por gravedad

**Fuente:** Autor, 2018

Los extractos se filtraron y pesaron depositándolos en frascos de vidrio boca ancha previamente pesados, a continuación se taparon con papel aluminio perforado para facilitar la evaporación del etanol (Figura 9) y se rotularon con la información correspondiente.



**Figura 9.** Envasado del extracto

**Fuente:** Autor, 2018

Seguidamente se ubicaron las muestras en una estufa BINDER a una temperatura de 40 °C, para facilitar la evaporación del etanol, los pesos fueron monitoreados hasta su estabilización en una balanza OHAUS Scout, a continuación los extractos se pasaron a frascos ámbar de 30 ml, los que se mantuvieron en refrigeración a 5°C durante todo el experimento (Figura 10).



**Figura 10.** Pesaje y traspaso de las muestras  
**Fuente:** Autor, 2018

## 7.5 Evaluación de la actividad nematocida en *Panagrellus redivivus*

### 7.5.1 Preparación de extractos

Los bioensayos para evaluar la actividad nematocida *in vitro* de las dos plantas en los 3 momentos de corte, se realizaron en el Laboratorio de Salud Animal de la Corporación Colombiana de investigación agropecuaria-centro de investigación Tibaitatá (Mosquera-Cundinamarca). Las concentraciones a partir de las cuales se diseñaron los bioensayos fueron determinadas previamente en el marco de la tesis de doctorado “Evaluación *in vitro* de la actividad antihelmíntica de extractos y fracciones de tres especies vegetales del bosque seco tropical tolimense, comúnmente utilizadas en la alimentación de ovinos”(Romero, 2019) encontrando Concentración Inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) y Concentración Inhibitoria 99 (CI<sub>99</sub>) de los extractos etanólicos de las mismas especies, para las pruebas de inhibición del desenvainamiento larval e inhibición de la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus*.

Con relación a *G. sepium* se usaron las concentraciones 22,4 mg/mL (CI<sub>50</sub>) y 65,43 mg/mL (CI<sub>99</sub>) y de *L. leucocephala* 43,35 mg/mL (CI<sub>50</sub>) y 119,9 mg/mL (CI<sub>99</sub>), disponiendo las respectivas cantidades en tubos Falcon para obtener 5 repeticiones por concentración, para tal efecto se diluyeron los extractos en dimetil sulfóxido DMSO (Sigma Aldrich 99,5%) al 1% y posteriormente en agua destilada (pH 6.9) (Figura 10).



**Figura 11.** Dimetil sulfóxido DMSO (Sigma Aldrich 99,5%) al 1%.  
**Fuente:** Autor, 2019

### 7.5.2 Montaje del bioensayo con *Panagrellus redivivus*

Con el uso de un pincel se recuperaron nematodos de *Panagrellus redivivus* a partir de cultivos de avena, depositándolos en 10 ml de agua destilada, para desechar las hembras aptas para fecundar se usó un tamiz N.º 100 de acero inoxidable, obteniendo las larvas jóvenes, para el bioensayo, estas se introdujeron en un vaso precipitado, seguidamente se realizó el cálculo de larvas por ml y la cantidad total de larvas. Al tener la cantidad requerida de larvas se depositó en placas de cultivo celular (NEST) de 24 pozos, un volumen de solución de larvas que contenía aproximadamente 50 individuos en cada pozo y se adiciono el extracto, incubando la mezcla en una estufa a 28°C por 24 horas (Figura 11).



**Figura 12.** Ubicación de las muestras en pozos.  
**Fuente:** Autor, 2019

Después de la incubación se continuó con las lecturas de los pozos en un microscopio invertido Olympus CKX41 a 10x, como se observa en la figura 12. Para el conteo se registró la cantidad de larvas muertas y vivas en cada uno de los pozos y se aplicó la fórmula descrita en la página 25.



**Figura 13.** Lectura de los pozos bajo el microscopio  
**Fuente:** Autor, 2019

## 8. Análisis estadístico

Para el desarrollo de la investigación se aplicaron métodos estadísticos descriptivos (tablas y frecuencias) y también se usó la estadística inferencial, dependiendo la distribución de la variable concentración de cada metabolito (prueba de Shapiro- Wilk) para conocer si era normal o no, así mismo se utilizó la estadística paramétrica, ANOVA o no paramétrica (Pruebas U de Mann-Whitney) para muestras independientes, según sea el caso con sus respectivas pruebas de comparación de medias (test de Tukey o test de conover), estas pruebas se usaron para comparar los contenidos de metabolitos secundarios en los 3 momentos de corte y analizar su variación entre plantas y época de corte. El análisis de correlación y regresión lineal multivariada se aplicó a los factores climáticos (variable independiente) y nivel de metabolitos secundarios (variable dependiente) para conocer el grado de influencia de cada uno de los factores en la concentración de metabolitos. Para el ensayo biológico se calculó el porcentaje de mortalidad por cada una de las réplicas (5) aplicando la siguiente fórmula:

$$\bar{x} = \frac{(\text{total de larvas muertas} * 100)}{\text{Total de larvas observadas}}$$

Debido que la variable porcentaje de mortalidad no cumplía el supuesto de normalidad, se decidió realizar dos modelos independiente (uno para concentración y uno para planta) utilizando el análisis de varianza no paramétrico denominado Kruskal-Wallis, la inferencia se realizó con un nivel de significancia del 0.01. Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico SPSS 20 IBM y Microsoft Excel.

## 9. Financiación

Las entidades en las cuales se apoyó el grupo de investigación para el desarrollo del proyecto fueron: la Universidad del Tolima, la Corporación Colombiana de investigación agropecuaria-centro de investigación Tibaitata (Mosquera-Cundinamarca) y la Universidad de Cundinamarca; el proyecto fue financiado por una parte de los recursos de la convocatoria interna de la Universidad del Tolima, la cual se encuentra sustentada en la importancia de aprovechar recursos forrajeros, que además de presentar reconocidas cualidades nutricionales, ha demostrado actividad biológica frente a agentes patógenos de gran importancia en la industria ovina, que ameritan esfuerzos desde el escenario investigativo.

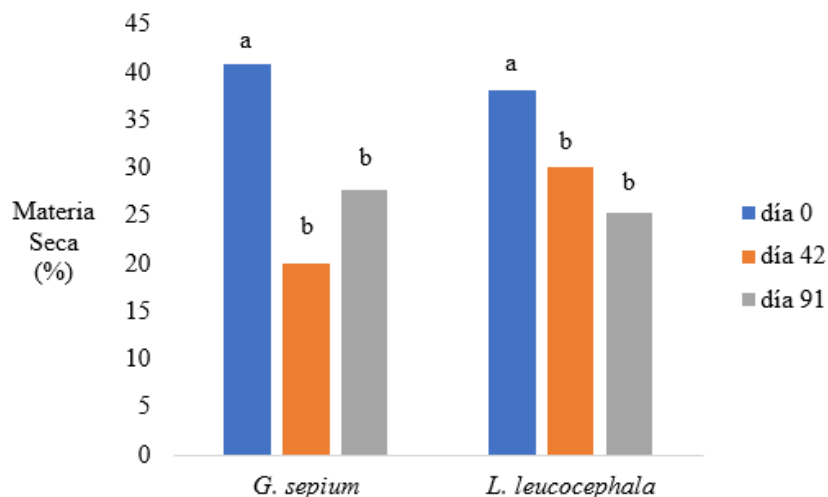
## 10. Resultados y discusión

La nutrición de pequeños rumiantes en el trópico depende principalmente de la disponibilidad de especies con potencial forrajero, dada esta situación se hace necesario conocer el contenido de nutrientes de cada una de las especies a emplear; para analizar los parámetros nutricionales de las especies estudiadas, se realizaron pruebas de normalidad y homocedasticidad con el propósito de determinar que variables se les aplicaban pruebas paramétricas y no paramétricas. Para las variables MS, PC, Cn, E.E, DMS, EB, ED, CNF y Alct se les aplico la prueba de Shapiro-Wilk y para las variables FDN, FDA, Ft, Tt, Tc la Prueba U de Mann-Whitney.

Los parámetros nutricionales y el contenido de metabolitos secundarios en *G. sepium* y *L. leucocephala*, obtenidos en la presente investigación, se comparan con resultados reportados por otros autores (Ver anexo 1).

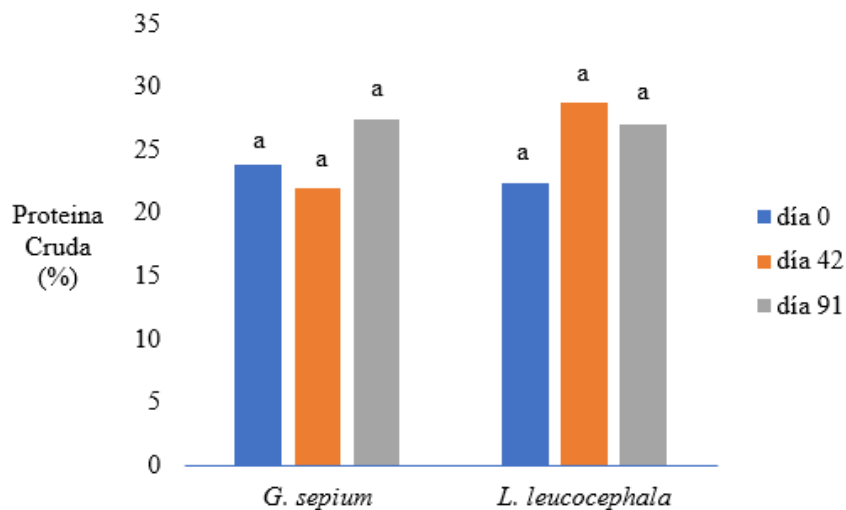
### 10.1 Parámetros nutricionales y contenido de metabolitos secundarios.

La materia seca (MS) contiene los principios nutritivos del alimento, en el presente trabajo se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) en la edad de las plantas, como se observa en la figura 14, siendo mayor el valor en *G. sepium* (40,85%) para el día 0, además en el día 42 se halló un porcentaje de 19,94 lo que difiere con Vela, 2015; Hurtado *et al.*, 2012 y Espinoza *et al.*, 2006, quienes en su estudio reportaron valores que oscilan entre 19,24% y 8,75 % en el día 0 y 80 de su experimento, *L. leucocephala* obtuvo un porcentaje de MS de 38,13 en el día 0 y 30,03% el día 42, Martínez *et al.* (2016) para el día 36 reporta un valor de 26,19%, ligeramente menor al obtenido en el presente estudio, según Newton de Lucena *et al.* (2014) al realizar las podas entre los días 70 a 84 en esta especie, se obtuvieron parámetros nutricionales más altos, lo que difiere de lo encontrado en el presente estudio. (Araque *et al.*, 2006), determina que a medida que avanza la maduración de la planta, aumenta el contenido de materia seca y extracto etéreo, además los componentes del clima, el suelo y las formas de manejo son determinantes para la disponibilidad del forraje (Pedraza, 2000).



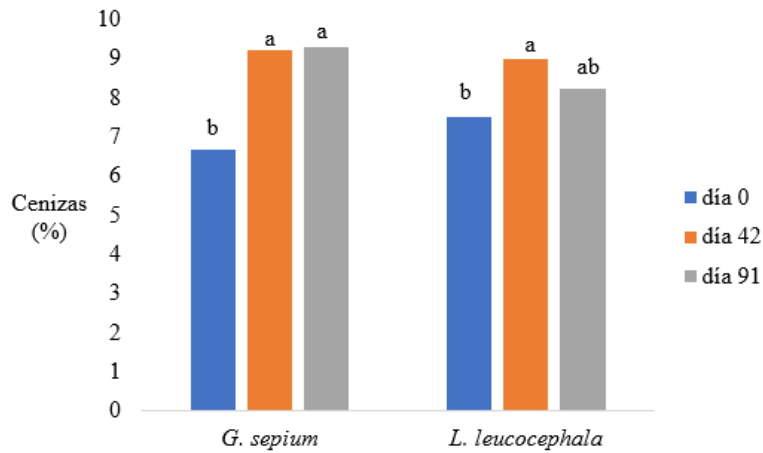
**Figura 14.** Comparación del promedio porcentual de Materia Seca por planta y por edad

Para el contenido de proteína cruda (PC), no se observan diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre plantas ni entre momentos de corte, como se observa en la figura 15, sin embargo se observa que en *G. sepium* este parámetro varía entre 21,9 y 27,4 con una tendencia a aumentar con la edad de corte resultado comparable al observado por La O *et al.*, 2018; Congo *et al.*, 2017; Vela, 2015; Cuervo-Jiménez *et al.*, 2013; Hurtado *et al.*, 2012 y García *et al.*, 2008, quienes obtuvieron valores similares a los observados en la presente investigación, sin embargo en el estudio de Ogunbosoye *et al.* (2015), reportaron un porcentaje menor en el día 0 de corte; en el día 42 *L. leucocephala* presentó el mayor porcentaje observado de PC con 28,68, lo que concuerda con lo descrito por Martínez *et al.*, 2016 y Congo *et al.*, 2017 quienes reportaron valores de 26,78% y 29,28% a una edad de corte de 36 a 45 días, pero difiere de lo observado por Safwat *et al.*, 2015; Vivas *et al.*, 2017 y Figueroa *et al.*, 2016 quienes registraron un porcentaje menor a una edad de corte de 0 a 42 días. Los intervalos más frecuentes de corte, favorecen la producción de biomasa comestible (Pedraza, 2000), pero al aumentar la edad de la planta disminuye la proteína y las cenizas (Cuervo-Jiménez *et al.*, 2013).



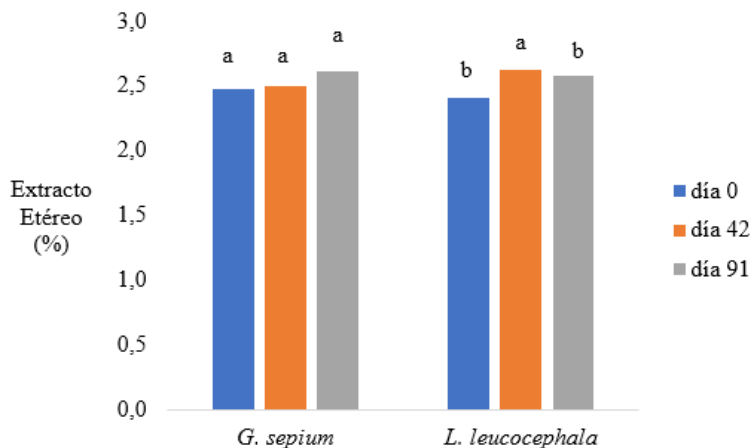
**Figura 15.** Comparación del promedio porcentual de Proteína Cruda por planta y por edad

En cuanto a las cenizas (Cn), se presentaron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) en el 1 y 2 corte, como se observa en la figura 16, en *G. sepium* se observan promedios que oscilan entre 6,72% y 9,28%, con tendencia a aumentar con la edad de corte, comportamiento similar a lo descrito por Vela, 2015; García *et al.*, 2008 y Espinoza *et al.*, 2006, quienes mencionan en sus estudios porcentajes que oscilan entre 6,57 a 9,55 entre los días 0 y 90, pero difiere de La O *et al.*, 2018 y Ogunbosoye *et al.*, 2015 quienes encontraron un valor mayor en el día 0; en cuanto a *L. leucocephala* se hallaron valores entre 7,5% y 8,97% aumentando a medida que se realizan los cortes siendo similares a los reportado por Safwat *et al.*, 2015; Gaviria *et al.*, 2015 y García *et al.*, 2008, quienes evaluaron el contenido de cenizas a edades de corte que oscilaron entre 0, 45 y 91 días, pero difiere del reporte de Hernández *et al.*, 2018; Vivas *et al.*, 2017 y Martínez *et al.*, 2016 quienes reportaron valores entre 12,08% y 6,57% entre los días 0, 90. El grado de maduración de la planta influye sobre los valores de ceniza disminuyéndolos (Araque *et al.*, 2002), debido en gran parte a la conversión de los productos fotosintéticos a componentes estructurales (Araque *et al.*, 2006).



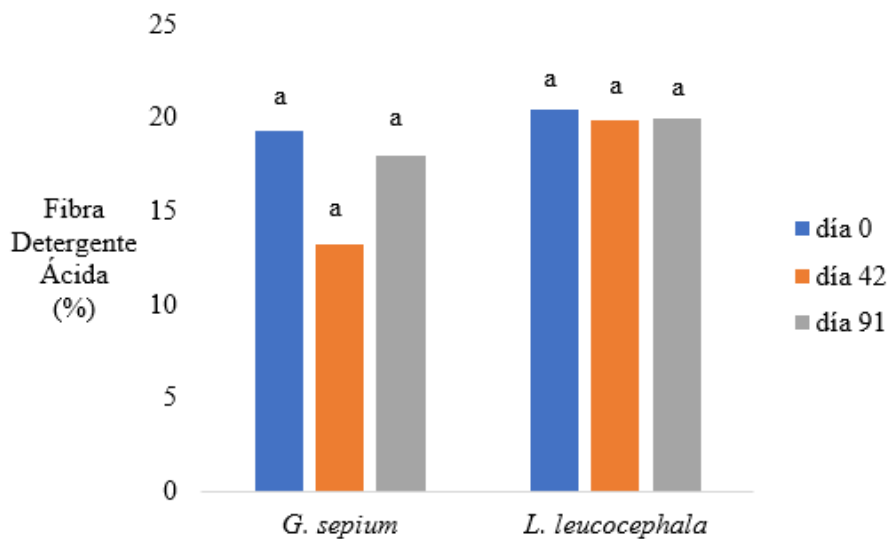
**Figura 16.** Comparación del promedio porcentual de Cenizas por planta y por edad

Con relación al extracto etéreo (EE), se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre las dos plantas, con valores que oscilan entre 2,47% a 2,41% para el día 0, los valores aumentaron progresivamente en las dos plantas en el tiempo, pero en los 3 momentos de corte no se encontraron diferencias estadísticas significativas, como se observa en la figura 17, lo cual difiere de Ogunbosoye *et al.*, 2015; Hurtado *et al.*, 2012 y Espinoza *et al.*, 2006, quienes observaron un valor mayor para *G. sepium* el día 0; en oposición a lo reportado por Safwat *et al.*, 2015; Figueroa *et al.*, 2016 quienes reportaron porcentajes que oscilan entre 3,42 y 4,61 para los días 0 y 40 en *L. leucocephala* y Vivas *et al.*, 2017 que para el día 0 encontró un porcentaje menor para esta especie. A medida que la planta va madurando el contenido de extracto etéreo aumenta junto a la materia seca (Araque *et al.*, 2006).



**Figura 17.** Comparación del promedio porcentual de Extracto Etéreo por planta y por edad

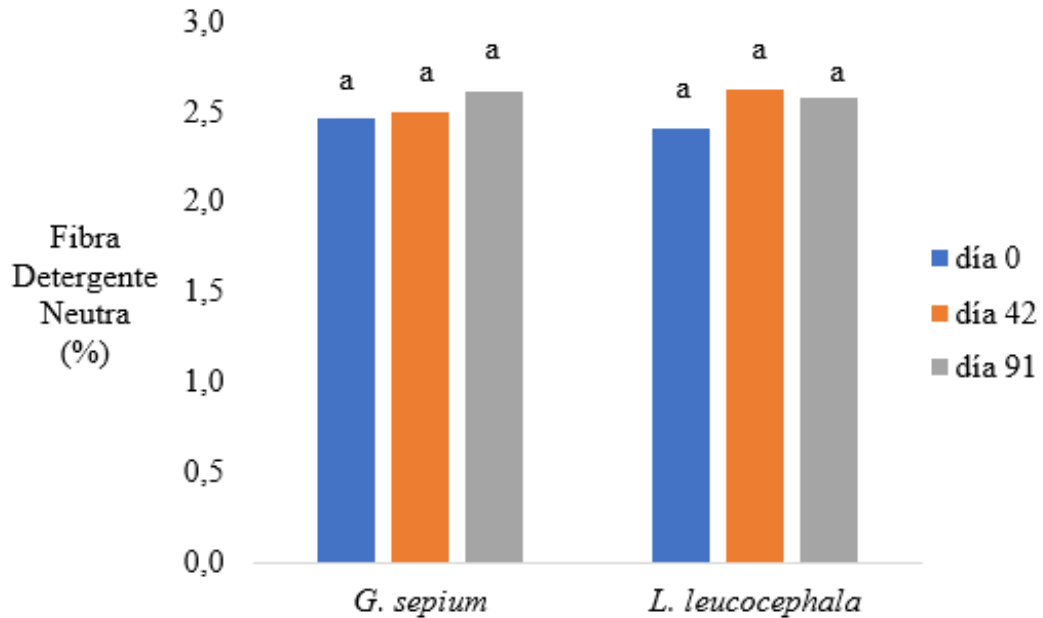
Al utilizar las pruebas de contraste U de Mann-Whitney para las pruebas de fibra detergente ácida (FDA) y fibra detergente neutra (FDN) no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ), entre momentos de corte ni entre las plantas. En la figura 18 se puede observar que el valor para *G. sepium* el día 0 fue más alto (19,28%) con respecto a FDA, en comparación a lo reportado por La O *et al.* (2018) quienes reportan un porcentaje mayor; en cuanto a *L. leucocephala* para el día 0 se presentó un valor en FDA de 20,46% lo cual difiere de lo hallado por Hernández *et al.*, 2018; Vivas *et al.*, 2017; Figueroa *et al.*, 2016; Safwat *et al.*, 2015 y Gaviria *et al.*, 2015, quienes reportaron valores mayores. El contenido de FDA del forraje permite estimar el contenido de energía, que proporciona el forraje al animal (Cruz & Sánchez, 2000).



**Figura 18.** Comparación del promedio porcentual de Fibra Detergente Ácida por planta y por edad

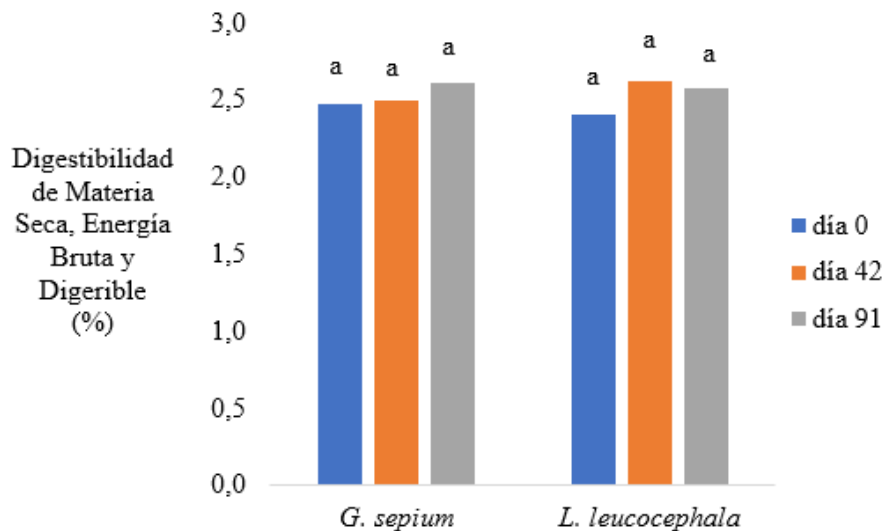
Con relación a la prueba de fibra detergente neutra (FDN) no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre edades ni entre las plantas, para *G. sepium* se encontró para el mismo día valores que oscilan entre 2,47% a 2,61% (Figura 19), estos resultados difieren de lo citado por La O *et al.*, 2018; Ogunbosoye *et al.*, 2015 y García *et al.*, 2008 quienes reportan valores mayores entre los días 0 y 90; en cuanto a *L. leucocephala* se encontraron porcentajes que oscilan entre 2,41 y 2,62, que difieren de lo reportado por Hernández *et al.*, 2018; Vivas *et al.*, 2017; Figueroa *et al.*, 2016; Safwat *et al.*, 2015 y García *et al.*, 2008 quienes encontraron valores mayores. La FDN permite medir la capacidad que tiene el forraje para ocupar volumen

en el tracto gastrointestinal, lo que se asocia el llenado físico del animal (Cruz & Sánchez, 2000), además el efecto de la madurez de la planta y la especie son factores que afectan la concentración de FDN (Rodríguez & Roncallo, 2013).



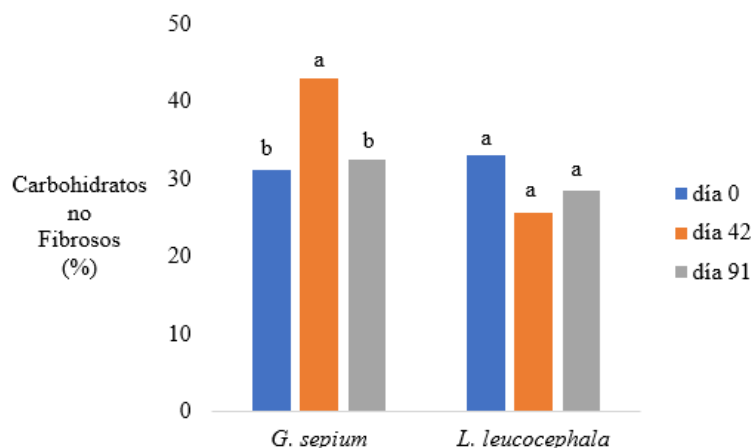
**Figura 19.** Comparación del promedio porcentual de Fibra Detergente Neutra por planta y por edad

Para la prueba de digestibilidad de la materia seca (DMS) y energía bruta (EB), se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) en la edad de las plantas, pero para la variable energía digestible (ED) no se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.01$ ), entre momentos de corte ni entre plantas (Figura 20); el valor más bajo se presentó el día 0, para *G. sepium* con 2,47%, en comparación con *L. leucocephala* que obtuvo un promedio de 2,41%, además se reportan valores similares entre las dos especies en cada uno de los cortes. El resultado de EB de *G. sepium*, difiere de los porcentajes observados por Hurtado *et al.*, 2012 y García *et al.*, 2008 quienes reportaron valores superiores entre los 0 y 90 días. Para *L. leucocephala* en el día 0, se encontró un valor de 2,41% que contrasta con los mayores valores encontrados por Vivas *et al.* (2017) con relación a DMS y EB. La DMS permite ofrecer dietas con mayor probabilidad de suplir los requerimientos de los animales, pero puede verse afectada por la diferentes especies forrajeras y su respuesta al ambiente y el manejo (Navarro & Roa, 2018).



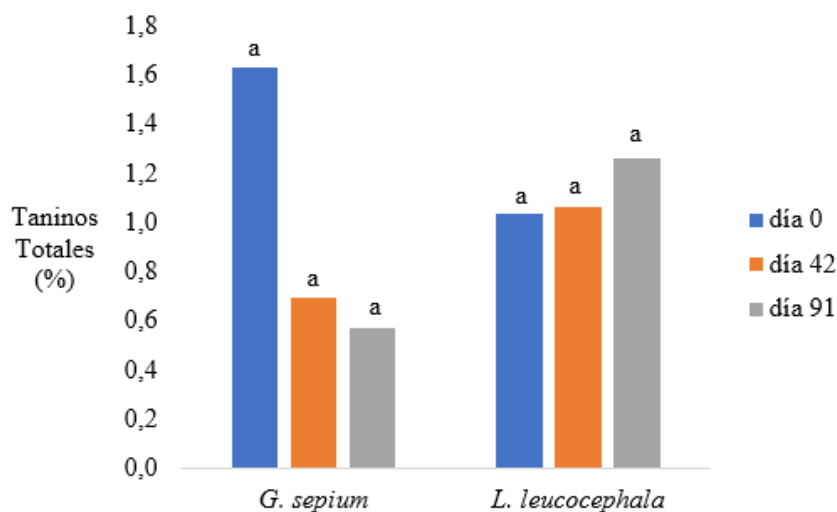
**Figura 20.** Comparación del promedio porcentual de Digestibilidad de la Materia Seca, Energía Bruta y Energía Digerible por edad y por planta

Con respecto al contenido de carbohidratos no fibrosos (CNF), se efectuó una comparación por ANOVA de dos factores: Kolomgorov-Smirnov<sup>a</sup> y Shapiro-Wilk, observando diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.01$ ) entre las plantas, el día 42 fue el mayor valor que obtuvo *G. sepium*, con un porcentaje 42,90 siendo representativo en relación al día 0 y 91 en comparación con *L. leucocephala* que obtuvo el día 0 un valor 33,11% (Figura 21) siendo significativo a diferencia del porcentaje obtenido el día 42 y 91; los resultados obtenidos de *G. sepium* difiere de los observados por Ogunbosoye *et al.* (2015), quienes reportan un menor valor (22,15%), tampoco son comparables con el mayor valor reportado por Castañeda *et al.* (2018); en cuanto a los porcentajes de CNF de *L. leucocephala*, estos difieren de los observados por Gaviria *et al.* (2015) quienes encontraron un 16,70% de carbohidratos solubles. Los CNF son excelente fuente de energía y usualmente son más digeribles que la FDN (Danelón, 2001), además su contenido mejora el suministro de energía y determina la cantidad de proteína bacteriana producida en el rumen (Wattiaux & Armentano, 2015).



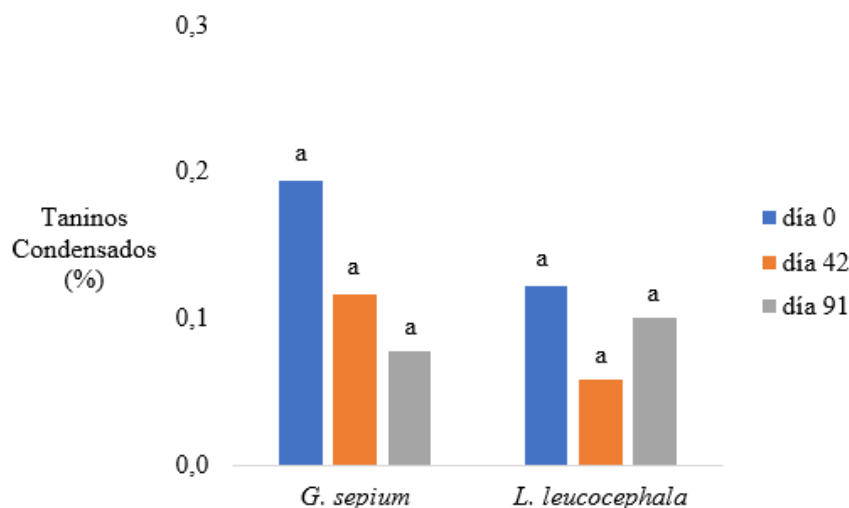
**Figura 21.** Comparación del promedio porcentual de Carbohidratos no Fibrosos por edad y por planta

A los valores obtenidos en el análisis del contenido de taninos totales, taninos condensados y fenoles totales, se les aplicó la prueba de contraste U de Mann-Whitney, encontrando que no hay diferencias significativas entre plantas ni tampoco entre momentos de corte, a diferencia de los alcaloides totales donde se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ), entre las plantas y entre momentos de corte (Figuras 22, 23, 24 y 25). Uno de los aspectos importantes de las leguminosas tropicales y que afecta su consumo y palatabilidad son los metabolitos secundarios (Carmona, 2007); los taninos totales para *G. sepium* variaron de 1,63% a 0,57%, mostrando descenso con el incremento de la edad de corte, lo cual difiere de los valores observados por García *et al.* (2008) quienes encontraron un valor menor a una edad de corte de 180 días, *L. leucocephala* presentó valores para taninos totales entre 1,06% y 1,26%, con una tendencia a aumentar con la edad de corte, en contraste con lo descrito por García *et al.* (2016) quienes encontraron en su investigación que la concentración de taninos varían según la especie, la temperatura a la cual crecen las plantas, madurez, entre otros factores, estas diferencias probablemente estén relacionadas con los períodos de cosecha, la intensidad y la duración de la época seca (Matumuini *et al.*, 2017).



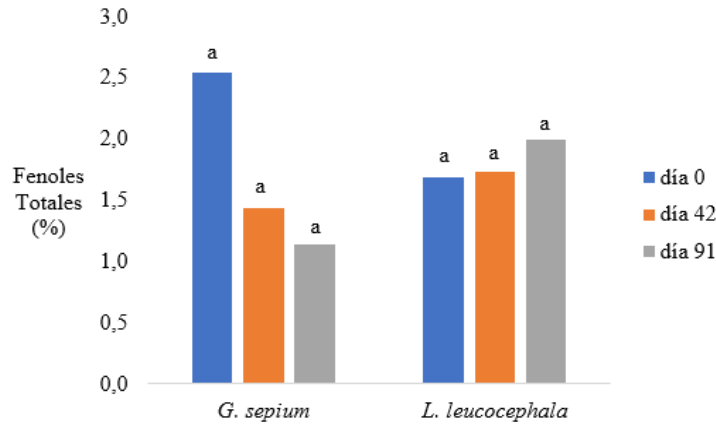
**Figura 22.** Comparación del promedio porcentual de Taninos totales por edad y por planta.

En la figura 23, se describe el contenido de taninos condensados encontrados en las dos especies, para *G. sepium* se observan porcentajes que van de 0,17 a 0,07, con una tendencia de descenso con respecto a la edad de corte, al respecto Santacoloma-varón & Granados. (2012) estimaron un porcentaje mayor entre 9,48 a 12,52, teniendo en cuenta que este valor varía dependiendo de la región donde se encuentra establecida la especie, en contraste con este reporte García *et al.* (2008) determinaron que el contenido de taninos condensados es menor. En cuanto al contenido de taninos condensados de *L. leucocephala* se encontraron valores entre 0,05% y 0,11%, lo cual difiere de los reportes de Sepúlveda *et al.* (2018) y Galindo *et al.* (2008), quienes encontraron un porcentaje mayor. Naranjo *et al.* (2016) expresan que los taninos condensados que posee *L. leucocephala* puede favorecer los procesos fermentativos a nivel del rumen; en cuanto al contenido de taninos encontrados en las dos especies, se destaca que dichos porcentajes son menores al 5%, lo cual es un rango favorable si se considera lo afirmado por Ahmen *et al.* (2018), quienes estiman que este porcentaje, es el máximo para ser tolerado por los animales. Se ha observado que la variación en el contenido de taninos totales se relaciona con las variables climáticas, (García *et al.*, 2016) reportaron que en las fabáceas la concentración de estos taninos aumenta en los meses secos, además de ser influenciado por factores ambientales, crecimiento y madurez de la planta (Torp, 2010), a su vez se considera que estos metabolitos son el grupo mas importante, encargado de la defensa de las plantas debido a sus propiedades bioquímicas y moleculares, además de influir significativamente en los cambios del suelo (Olivoto *et al.*, 2017).



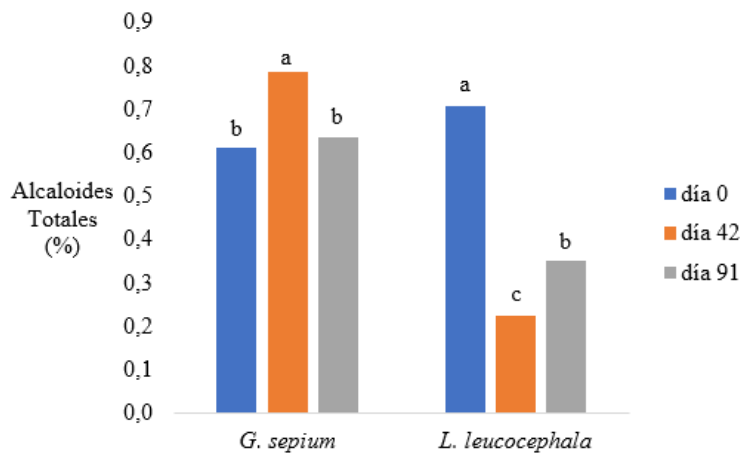
**Figura 23.** Comparación del promedio porcentual de Taninos condensados por edad y por planta

En la figura 24, se encuentra el contenido de fenoles totales obtenidos en las dos especies estudiadas, para *G. sepium* el contenido de estos metabolitos se encuentra entre 1,14% y 2,54% con tendencia a reducir con el aumento de la edad de corte, estos resultados difieren a los reportado por García *et al.* (2008), quienes encontraron un porcentaje de fenoles totales de 2,22% a una edad de corte de 180 días; con relación al contenido de fenoles totales de *L. leucocephala* se hallaron valores que van de 1,68% a 2,00% con tendencia a aumentar con la edad de corte, se considera que la variación de estos metabolitos puede estar asociada a factores como: la especie, el genotipos dentro de la especie, madurez y factores del ambiente (Carmona, 2007). Los fenoles forman puentes de hidrógeno alguno son solubles en solventes orgánicos, otros son glucósidos o ácidos carboxílicos y por lo tanto solubles en agua, estos compuestos son muy susceptibles a la oxidación: luz, radicales libres, química, etc (Gimeno, 2004); Los compuestos fenólicos actúan como mecanismos de defensa química protegiendo a las plantas del daño oxidativo fotoinducido, como defensa contra herbívoros (Iason, 2018), además desempeña un papel importante en la nutrición de rumiantes al aumentar la absorción de aminoácidos de las plantas en el intestino delgado (Pereira *et al.*, 2018).



**Figura 24.** Comparación del promedio porcentual de Fenoles totales por edad y por planta

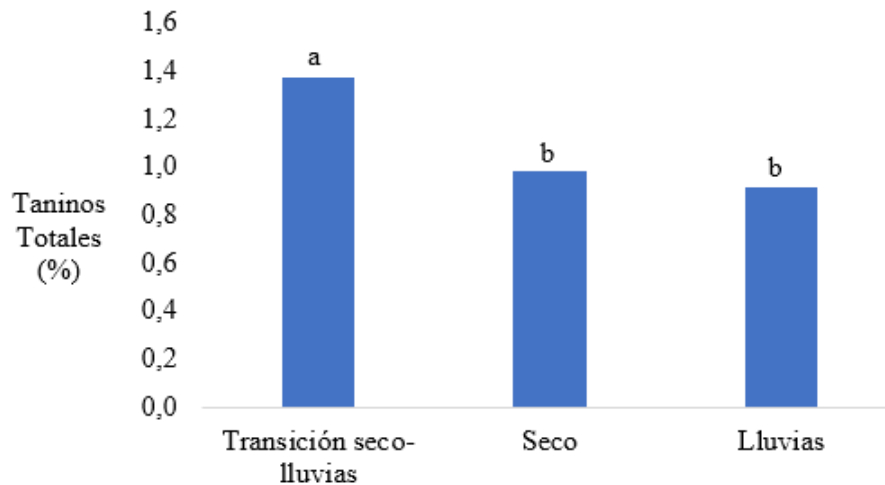
Los valores de alcaloides totales presentaron diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.01$ ) entre plantas (figura 25), donde *G. sepium* presentó porcentajes que oscilan entre 0,61 y 0,78, siendo inferiores el día 0 y 91, lo cual difiere con García *et al.* (2008) quienes obtuvieron un porcentaje menor; en cuanto a *L. leucocephala* se hallaron valores de alcaloides totales que varían entre 0,22% y 0,70%, presentando diferencias numéricas entre el día 42 y 91, resultados que difieren de lo encontrado por Carmona. (2007), quien describe que dentro del grupo de los alcaloides *L. leucocephala*, contiene mimosina en un porcentaje que varía entre 2,3% a 3,59%, . Se considera que la variación de estos metabolitos depende de factores asociados a la edad de la planta, estado fenológico, nutrición, interacción con herbívoros (Sepúlveda *et al.*, 2018), a su vez la síntesis de los alcaloides puede verse afectada por los cambios climáticos (Olivoto *et al.*, 2017).



**Figura 25.** Comparación de promedios de Alcaloides totales por edad y por planta.

## 10.2 Efecto de variables climáticas sobre el contenido de metabolitos secundarios.

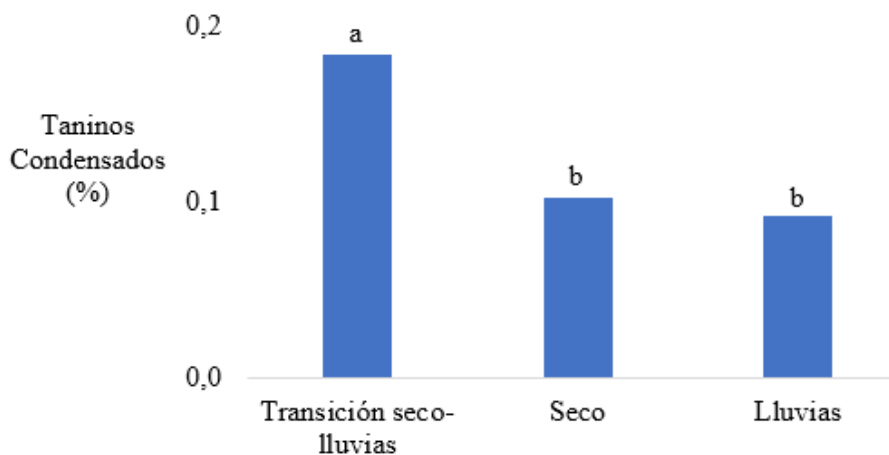
Las especies del bosque seco tropical experimentan la estacionalidad de las lluvias y el estrés por la sequía, lo que ha permitido que se adapten y generen hojas en la época de lluvias y en las estaciones secas (Sedio *et al.*, 2017), siendo capaces de producir estos compuestos químicos aun estando sometidas al estrés; la precipitación ejerce efectos en el crecimiento y la calidad de los forrajes, debido a la relación que presentan con los procesos bioquímicos y fisiológicos de las plantas (Herrera *et al.*, 2017), en relación con esto se observó que en la transición de la época seca a húmeda, se presentaron diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.01$ ). En cuanto a la relación que presentan los metabolitos secundarios con las variables climáticas se halló que el contenido de Tt presenta diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre las épocas de corte, con valores más altos en la transición de la época seca a húmeda con un porcentaje de 1,37 como se observan en la figura 26, contrario a lo expuesto por García *et al.* (2016) quienes reportaron que en las fabáceas, la concentración de estos taninos aumenta en los meses secos, situación que podría estar relacionada con la intensidad y duración de la estación seca, edad de rebrote y periodos de cosecha (Matumuini *et al.*, 2017).



**Figura 26.** Variación del contenido de Taninos totales.

Los taninos condensados presentaron diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.01$ ) entre las épocas de corte, en la época de transición seco a húmedo se encontró un porcentaje de 0,14 (Figura 27), lo que se asemeja a lo reportado por García *et al.* (2016) quienes encontraron variación entre los meses secos y de lluvias; pero contrasta con lo expuesto por Romero *et al.*

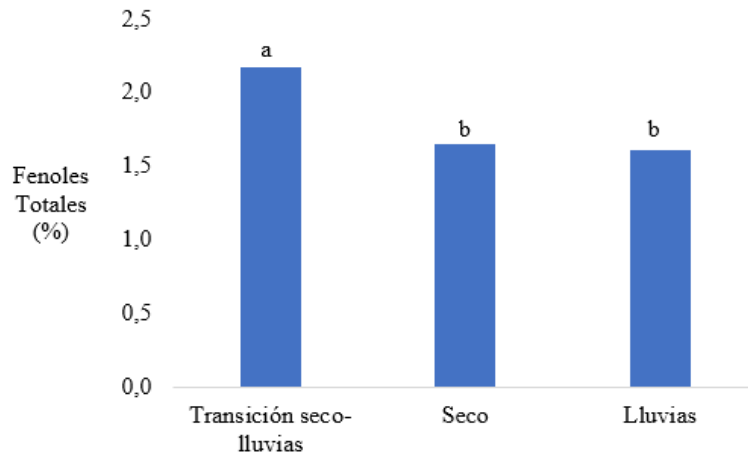
(2000), quienes encontraron promedios de 43,4% y 33,9% con tendencia a disminuir en la transición, esta variación del contenido de los Tc, está asociada al genotipo y a las condiciones del medio ambiente, según Lascano. (2004), además el transporte del precursor de Tc a las vacuolas, esta involucrado con la coloración de las semillas, incluyendo el flujo de alcaloides y catharantina a la epidermis de la hoja, los cuales están involucrados en los mecanismos de defensa (Shitan, 2016); la diversificación del contenido de taninos condensados está influenciado por la ubicación de este dentro de la planta (hojas, tallos), la temperatura, precipitación, especie, edad de rebrote, etc. (Carmona, 2007), además los taninos condensados libres adheridos a las proteínas y a la fibra, disminuyen por el efecto combinado del pastoreo y la época (Cuervo-Jiménez *et al.*, 2013).



**Figura 27.** Variación del contenido de Taninos condensados.

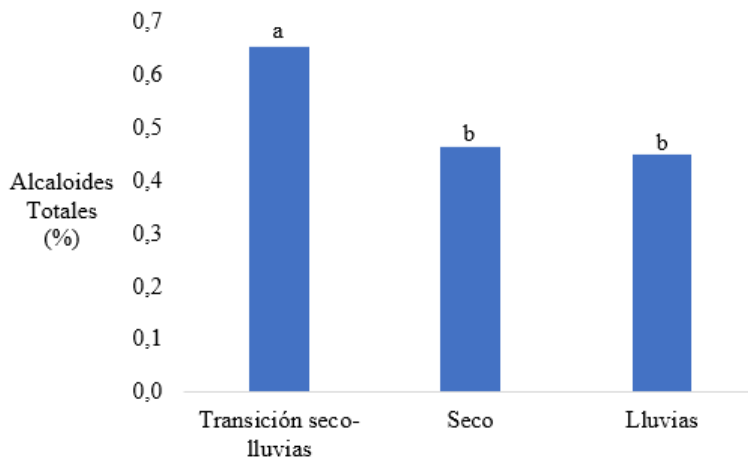
El contenido de Fenoles totales mostró diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.01$ ) entre las épocas de corte (Figura 28), en la transición de seco a húmedo se presentó un porcentaje mayor (2,17), en comparación con las otras épocas; según Mohammed (2017) la sequía es el estrés ambiental más importante y perjudicial para el crecimiento y desarrollo de las plantas; el contenido de Ft observados son similares a los reportados por Molina *et al.* (2016) y Romero *et al.* (2000) para la misma época. Los factores ambientales como la temperaturas extremas, radiación, niveles de CO<sub>2</sub> y disponibilidad del agua, afectan la síntesis de los metabolitos secundarios (Olivoto *et al.*, 2017; Pavarini *et al.*, 2012), a su vez la disminución de la fotosíntesis es dada por los cambios bioquímicos dependientes de las altas temperatura, incluyendo las tasas de fotorrespiración (Slot *et al.*, 2016), las hojas jóvenes en expansión dependen de las defensas

químicas hasta que estén maduras para que las paredes celulares se endurezcan y adquieran resistencia física para disuadir a los insectos (Sedio *et al.*, 2017).



**Figura 28.** Variación del contenido Fenoles totales.

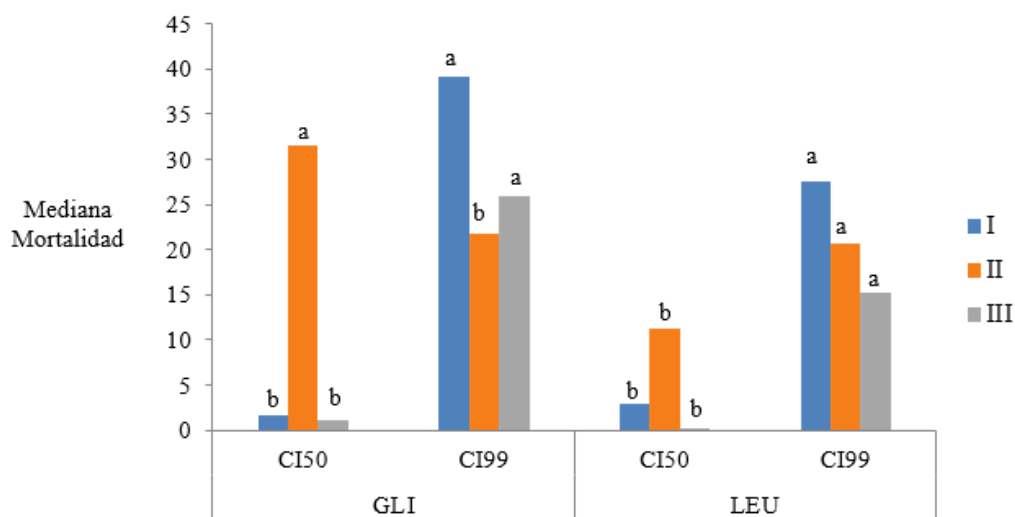
En consecuencia se halló que el contenido de alcaloides totales presentó diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.01$ ) entre las épocas de corte como se observa en la figura 29, donde se encontró que el porcentaje más alto registrado fue 0,65 siendo similar a los expresado por Olivoto *et al.* (2017) quienes reportan que los alcaloides podrían presentar una relación entre las respuestas metabólicas de las plantas y los factores ambientales. Pavarini *et al.* (2012) determina que el estrés hídrico provoca adaptaciones fisiológicas como la disminución del área foliar, los cambios osmóticos debidos a la pérdida del agua pueden inducir la biosíntesis de alcaloides de purina.



**Figura 29.** Variación del contenido de Alcaloides totales.

### 10.3 Comparación del efecto nematicida de los extractos etanólicos sobre el nematodo de vida libre *Panagrellus redivivus*.

Una alternativa para el control de los nematodos gastrointestinales corresponde al aprovechamiento de extractos vegetales obtenidos a partir de plantas con interés forrajero, en las que se han identificado compuestos con actividad antihelmíntica (Rivero & Jaramillo, 2019). La actividad nematicida de los extractos de las especies forrajeras frente al modelo biológico *Panagrellus redivivus* presentó diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.01$ ), los resultados obtenidos en cuanto a la mortalidad de las larvas del nematodos de *Panagrellus redivivus* y la efectividad de los extractos vegetales, reflejaron que *G. sepium* en el día 42 y a una concentración de 22,4 mg/ml, presentó un porcentaje de mortalidad de 31,5. Nazli *et al.*, 2008, reportaron que el extracto etanólicos de las hojas de *G. sepium* presentó un 60% de mortalidad frente al nematodo de *Meloidogyne*; estudios han encontrado que el extracto de esta especies inhiben la supervivencia de las larvas de *H. contortus* (Wabo Pone *et al.*, 2011), afectando los procesos biológicos y los huevos de nematodos gastrointestinales (Pérez *et al.*, 2014). Con relación a los extractos de *L. leucocephala* se obtuvo un porcentaje de mortalidad de 11,30 para el mismo día a una concentración de 43,35 mg/ml. Rivero-perez & Jaramillo. (2019) emplearon una concentración de 6,25 mg/ml de extracto de *L.leucocephala* en larvas de *H. contortus* donde obtuvieron una mortalidad de 22%, el efecto podría estar asociado en parte a compuestos secundarios como taninos condensados y fenoles (De Freitas *et al.*, 2014).



**Figura 30.** Mortalidad del nematodo de vida libre *Panagrellus redivivus*.

## 11. Conclusiones

Las especies forrajeras del bosque seco tropical *G. sepium* y *L.leucocephala*, presentan contenidos nutricionales aprovechables alrededor de los 42 días de corte, siendo estratégicas para el manejo nutricional de los animales.

Los metabolitos secundarios medidos (Tc, Tt, Ft y Alct), presentaron los más altos contenidos el día 42 posterior a la poda, condición que podrá contribuir al control de parásitos gastrointestinales de pequeños rumiantes si se tiene en cuenta que la mayoría de estos compuestos tiene actividad antihelmíntica.

La variación química, el crecimiento y la productividad de las especies con potencial forrajero, puede verse alterada por las condiciones climáticas (periodo seco, lluvia), en la transición de época seca a lluvias se observaron mayores contenidos de metabolitos, generados probablemente por el estrés al que fueron sometidas las plantas en la épocas secas.

Los extractos vegetales son una estrategia innovadora que eliminan y controlan el ciclo de vida de los parásitos gastrointestinales, dado su contenido de taninos y fenoles, los cuales presentan actividad nematicida; en esta investigación se resalta el efecto que presentó el extracto de *G. sepium*, el cual a una concentración de 22,4 mg/ml, alcanzó un mayor porcentaje de mortalidad del nematodo *Panagrellus redivivus*, en comparación a *L. leucocephala* .

## 12. Recomendaciones

Dado los contenidos nutricionales de las dos especies estudiadas, se recomienda suministrar las hojas de *G. sepium* y *L. leucocephala* a los 42 días de corte, donde se obtiene altos contenido de proteína y altas concentraciones de metabolitos secundarios, siendo útiles para la suplementación de ovejas con gestación tardía, corderos de 7-6 meses y borregas de (50kg), permitiéndoles cubrir sus requerimientos nutricionales, además de controlar los parásitos gastrointestinales.

Se aconseja suministrar estas especies en época seca y en la transición de seco-lluvias pues sus contenidos de metabolitos secundarios, son aceptables para el organismo de los animales, sin generar ninguna alteración.

Se recomienda evaluar *in vivo* la actividad nematicida de los extractos de las dos especies, con el fin de comparar su afectividad, teniendo como base los resultados obtenidos *in vitro* en esta investigación.

### 13. Referencias

- Ademola, I. O., Akanbi, A. I., & Idowu, S. O. (2005). Comparative Nematocidal Activity of Chromatographic Fractions of *Leucaena leucocephala*. Seed Against Gastrointestinal Sheep Nematodes. *Pharmaceutical Biology*, 43(7), 599–604. <https://doi.org/10.1080/13880200500301761>
- Aguirre, L., Cevallos, Y., & Escudero, G. (2016). Utilización de ensilaje de maíz y alfalfa en la alimentación de ovinos mestizos en pastoreo Using corn silage and alfalfa in feed for grazing sheep mestizos.
- Ahmen M., Alimon A., & Ebrahimi M., (2018). Nutritive and Anti-Nutritive Evaluation of *Kleinhovia hospita*, *Leucaena leucocephala* and *Gliricidia sepium* with Respect to Their Effects on in Vitro Rumen Fermentation and Gas Production. *Tropical Animal Science Journal*, 41(2), 128–136. <https://doi.org/https://doi.org/10.5398/tasj.2018.41.2.218>
- Alvarado-Canche, A. del R., Candelaria-Martinez, B., Castillo-Sanchez, L. E., Pineiro-Vazquez, A. T., & Canul-Solis, J. R. (2017). Production and feeding behavior of sheep in grazing under silvopastoral systems conformed for *Leucaena leucocephala* and *Cynodon plectostachyus*. *Revista Bio Ciencias*, 4(6), 1–11. <https://doi.org/10.15741/revbio.04.06.06>
- Araque C., Arrieta G., Sánchez A., & Sandoval E. (2002). Efecto de la edad del rebrote y tasa de crecimiento del matarratón (*Gliricidia sepium*) sobre su bromatología y minerales. *Zootecnia Tropical*, 20(2), 191-203. Recuperado en 04 de noviembre de 2019, de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-72692002000200004&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692002000200004&lng=es&tlng=es).
- Araque, C., Quijada, T., D'aubeterre, R., Páez, L., Sanchez, A. & Espinoza F. (2006). Bromatología del matarratón (*Gliricidia sepium*) a diferentes edades de corte en Urachiche, estado Yaracuy, Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 24(4): 393-399.
- Ávalos G., & Pérez U. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología) Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145.

- Barros-rodríguez, M., Solorio-sánchez, J., & Sandoval-castro, C. (2016). Efecto del consumo voluntario de *Leucaena leucocephala* sobre la degradación ruminal de la materia orgánica en ovinos. *Revista Ecuatoriana de Investigaciones Agropecuarias*, 1(1), 25–28. <https://doi.org/10.31164>
- Bauri, R. K., Tigga, M. N., & Kullu, S. S. (2015). A review on use of medicinal plants to control parasites. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 6(December), 268–277.
- Bernal H. (2014). Efectos de diferentes intensidades de pastoreo sobre la producción vegetal, el desempeño productivo y la carga parasitaria en ovinos de pelo en el municipio de El Guamo - Tolima. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.
- Biffa, D., Jobre, Y., & Chakka, H. (2006). Ovine helminthosis, a major health constraint to productivity of sheep in Ethiopia. *Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 7(1–2), 107–118. <https://doi.org/10.1017/S1466252307001132>
- Candelaria-Martínez, B., Rivera-Lorca, J. A., & Flota-Bañuelos, C. (2017). Disponibilidad de biomasa y hábitos alimenticios de ovinos en un sistema silvopastoril con *Leucaena leucocephala*, *Hibiscus rosa-sinensis* y *Cynodon nlemfuensis*. *Agronomía Costarricense*, 41(1), 121–131. <https://doi.org/10.15517/rac.v41i1.29759>
- Carmona, J. (2007). Efecto de la utilización de arbóreas y arbustivas forrajeras sobre la dinámica digestiva en bovinos. *Revista LaSallista de Investigación*, 4(1), 40–50.
- Castañeda-serrano, R. D., Piñeros-varón, R., & Vélez-giraldo, A. (2018). Foliage of tropical arboreal species in feeding ovines ( *ovis aries* ): intake , digestibility and balance nitrogen \*, 22(1), 58–68. <https://doi.org/10.17151/bccm.2018.22.1.4>
- Ceï, W., Salah, N., Paut, C., Dumoulin, P., Arquet, R., Félicité, Y., & Bambou, J. (2016). Impact of the post-weaning nutritional history on the response to an experimental *Haemonchus contortus* infection in Creole goats and Black Belly sheep. *Veterinary Parasitology*, 218, 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.01.015>

- Cepeda E. (2017). *Estudio parasitológico de nematodos gastrointestinales en ovinos del municipio de Ubaté, Cundinamarca*. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia uptc. Retrieved from <https://repositorio.uptc.edu.co/handle/001/2312>
- Chaweewan K., Quijada J., Williams A., M. I., & Williamson E., H. H. (2015). Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *Elsevier*, 5, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.06.001>
- Congo, C., Velástegui, F., Díaz, A., Ramírez, C., Fernández, F., Vera, A., & Sotomayor, D. (2017). Bancos forrajeros como alternativa tecnológica para la sostenibilidad e intensificación de la ganadería bovina de la región Amazónica Ecuatoriana. *INiAP*, 7–8. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.31374.05445>
- Cruz M., Sánchez. J. (2000). La fibra en la alimentación del ganado lechero. *Nutrición Animal Tropical*, 6(1), 39–74.
- Cuervo-Jiménez A., Narváez-Solarte W., & Von-Hessberg C. (2013). CARACTERÍSTICAS FORRAJERAS DE LA ESPECIE *Gliricidia sepium* (Jacq.) Stend, FABACEAE. *Bol.cient.mus.hist.nat*, 17(1), 33–45. Retrieved from [scielo.org.co/pdf/bccm/v17n1/v17n1a03.pdf](http://scielo.org.co/pdf/bccm/v17n1/v17n1a03.pdf)
- Cunha, F. R., Oliveira, D. F., & Campos, V. P. (2003). Extratos Vegetais com Propriedades Nematicidas e Purificação do Princípio Ativo do Extrato de *Leucaena leucocephala*. *Fitopatologia Brasileira*, 28(4), 438–441.
- Danelón J. (2001). Comprendiendo a los carbohidratos. Retrieved from <http://www.infogranjas.com.ar/index.php/alimentos/38-general/1478-comprendiendo-a-los-carbohidratos-.html>
- de Deus Nepomuceno, D., de Carvalho Almeida, J. C., de Carvalho, M. G., Fernandes, R. D., & Catunda Júnior, F. (2013). Classes of secondary metabolites identified in three legume species. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 42(10), 700–705. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982013001000002>

- De Freitas E., de Queiroz, J., Ribeiro F., dos S. W., & Zamprogno T. (2014). Proteolytic activity of the nematophagous fungus *Arthrobotrys sinensis* on *Angiostrongylus vasorum* larvae. *BMC Research Notes*, 7–811. Retrieved from <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/7/811>
- de Lara, R., Castro, T., Castro, J., & Castro, G. (2007). Cultivo del nematodo *Panagrellus redivivus* (Goodey, 1945) en un medio de avena enriquecida con *Spirulina* sp. *Revista de Biología Marina Y Oceanografía*, 42(1), 29–36. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572007000100004>
- Espinoza F., Araque C., Quijada T., DÁubeterre R., & Páez L., (2006). Bromatología del matarraton (*Gliricidia sepium*) a diferentes edades de corte en Urachiche, estado Yaracuy, Venezuela. *SciELO*, 24(0798-7269)
- Figueroa, J. (2009). Nematodo de vida libre *Panagrellus redivivus* ( Goodey , 1945 ): Una alternativa para la alimentación inicial de larvas de peces y crustáceos. *Investigación Y Ciencia*, 45, 4–11. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67412188002>
- Figueroa I., Lara A., Miranda L., Huerta. M., & Krishnamurthy L., M. J. (2016). Composición química y mineral de leucaena asociada con pasto estrella durante la estación de lluvias. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 16, 3173–3183. Retrieved from [scielo.org.mx/pdf/remexca/v7nspe16/2007-0934-remexca-7-spe16-3173.pdf](http://scielo.org.mx/pdf/remexca/v7nspe16/2007-0934-remexca-7-spe16-3173.pdf)
- Galindo, J., González, N., Delgado, D., Sosa, A., González, R., & Aldana, A. I. (2008). Efecto modulador de *Leucaena leucocephala* sobre la microbiota ruminal. *Zootecnia Trop*, 26(3), 249–252.
- Galindo, J., González, N., Marrero, Y., Sosa, A., Ruiz, T., Febles, G., & Noda, A. C. (2014). Effect of tropical plant foliage on the control of methane production and in vitro ruminal protozoa population. *Cuba Journal of Agricultural Science*, 48(4), 359–364. Retrieved from <http://www.cjascience.com/index.php/CJAS/article/view/564>
- García, D. E. (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos Y Forrajes*, 27(1), 1–12

- García, D. E., Medina, M. G., Cova, L. J., Torres, a, Soca, M., Pizzani, P., & Domínguez, C. E. (2008). Preferencia de vacunos por el follaje de doce especies con potencial para sistemas agrosilvopastoriles en el Estado Trujillo, Venezuela. (Spanish). *Pastos Y Forrajes*, 31(3), 255–270. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=43662488&lang=es&site=ehost-live>
- García L, Bolaños E, Lagunes L, Ramos J, & O. M. (2016). Concentración de compuestos fenólicos en fabáceas forrajeras tropicales en edad diferente del rebrote. *AGROCIENCIA*, 50, 429–440.
- Gaviria, X., & Rivera, J. (2015). Calidad nutricional y fraccionamiento de carbohidratos y proteína en los componentes forrajeros de un sistema silvopastoril intensivo. *Pastos Y Forrajes*, 38(2), 194–201.
- Gershenzon, J. (1984). Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. In *Phytochemical Adaptations to Stress*. New York: Springer Science+Business Media.
- Gimeno E. (2004). Compuestos fenólicos. *Offarm*, 23, 80–84. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13063508>
- Grueiro, M. M. (2002). Cribado Antihelmíntico Primario: Sistemas Para La Evaluación De Actividad Nematocida in Vitro. *Analecta Veterinaria*, 22(1), 32–49. Retrieved from [http://www.sedici.unlp.edu.ar/search/downloadp.php?id\\_document=ARG-UNLP-ART-0000000915&id\\_parte=5780](http://www.sedici.unlp.edu.ar/search/downloadp.php?id_document=ARG-UNLP-ART-0000000915&id_parte=5780)
- Hernández J., Sánchez P., Torres N., Herrera J., Rojas A., Reyes I., & M. M. (2018). Composición química y degradaciones in vitro de vainas y hojas de leguminosas arbóreas del trópico seco de México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 9, 105–120.
- Herrera R, Verdecia D, Ramírez J, & García M, C. A. (2017). Secondary metabolites of *Leucaena leucocephala* . Their relationship with some climate elements , different expressions of digestibility and primary metabolites Metabolitos secundarios de *Leucaena leucocephala* . Su relación con algunos elementos del clima. *Cuba Journal of Agricultural Science*, 51(1), 107–116.

- Horner J., Gosz J., & Cates R. (1988). The role of carbon-based plant secondary metabolites in decomposition in terrestrial ecosystems. *The American Naturalist*, 132(6), 869–883. Retrieved from <https://www.journals.uchicago.edu/doi/pdfplus/10.1086/284894>
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S. M., & Hoskin, S. O. (2006). The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology*, 22(6), 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.04.004>
- Hurtado D., Nocua S., Narváez-solarte W., & Vargas-sánchez, J. (2012). Valor nutricional de la morera (*Morus sp.*), matarratón (*Gliricidia sepium*), pasto india (*Panicum máximum*) y arboloco (*Montanoa quadrangularis*) en la alimentación de cuyes (*Cavia porcellus*). *Vet.zootec*, 6(1), 56–65. Retrieved from [vip.ucaldas.edu.co/vetzootec/downloads/v6n1a06.pdf](http://vip.ucaldas.edu.co/vetzootec/downloads/v6n1a06.pdf)
- Iason, G. (2018). The role of plant secondary metabolites in mammalian herbivory : ecological perspectives, (April 2004), 123–131. <https://doi.org/10.1079/PNS2004415>
- Kabore, A., Traore, A., Nignan, M., Gnanda, B. I., Bamogo, V., Tamboura, H. H., & Bélem, A. M. G. (2012). *In vitro* anthelmintic activity of *Leuceana leucocephala* (Lam.) De Wit.(Mimosaceae) and *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Steud (Fabaceae) leave extracts on *Haemonchus contortus* ova and larvae. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4(1), 303–309
- La O, González H, Vásquez C, Hernández J, & Estrada A, L. J. (2018). Nutritional characterization of *Gliricidia sepium* in a saline and high drought ecosystem of the Cauto river basin, Cuba. *Cuba Journal of Agricultural Science*, 52(3), 1–10.
- Lascano, C. (2004). Efecto del ambiente y de genotipo en la composición y actividad biológica de los taninos presentes en leguminosas. *Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT*.
- Lezcano Y, Soca M, Sánchez L, Ojeda F, Olivera Y, Fontes D, & Montejo I, S. H. (2012). Caracterización cualitativa del contenido de metabolitos secundarios en la fracción comestible de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray Qualitative characterization of the content of secondary metabolites in the edible fraction of *Tithonia diversifolia*. *Pastos Y Forrajes*, 35(3), 283–292.

- Marielle I., Paz T., W. B., & Soares A. (2016). Effect of environmental and phenological factors on the antimicrobial activity of *Cochlospermum regium* ( Schrank ) Pilg . roots. *Acta Scientiarum*, 30567, 467–473. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v38i4.30567>
- Martínez, M., Cruz, A. R., Bueno, A. L., Alberto, L., Romero, M., & Huerta, M. (2016). Composición nutricional de leucaena asociada con pasto estrella en la Huasteca Potosina de México \*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 16, 3343–3355. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263146726015>
- Martínez-Valladares, M., Martínez-Pérez, J. M., Robles-Pérez, D., Cordero-Pérez, C., Famularo, M. R., Fernández-Pato, N., & Rojo-Vázquez, F. A. (2013). The present status of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematode infections of sheep in the northwest of Spain by in vivo and in vitro techniques. *Veterinary Parasitology*, 191(1-2), 177–181. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.08.009>
- Mateos, M. (2016). Espectrometría de masa acoplada a electroforesis capilar y cromatografía líquida para determinación de contaminantes y micronutrientes en alimentos.
- Matumuini F., Mboko A., Moupela C., Tendonkeng, F., Boussiengui G., Zougou G., Lemoufouet J., Miégoúé E., Akagah A., Boukila B., & Pamo, E. (2017). Variation of the chemical composition of four forage shrubs ( *Albizia lebbek* , *Leucaena leucocephala* , *Morinda lucida* and *Senna siamea* ) in dry season in southeast of Gabon. *Journal of Applied Biosciences*, 11696–11703. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.4313/jab.v117i1.6>
- Mcrae, K. M., Stear, M. J., Good, B., & Keane, O. M. (2015). The host immune response to gastrointestinal nematode infection in sheep. *Parasite Immunology*, 37(10), 605–613. <https://doi.org/10.1111/pim.12290>
- Mohammed W, V. B. (2017). *PLANT SECONDARY METABOLITES. Their Roles in Stress Ecophysiology* (Vol. 3). Canada & USA.
- Molefe, N. I., Tsotetsi, A. M., Ashafa, A. O. T., & Thekiso, O. M. M. (2012). In vitro anthelmintic effects of *Artemisia afra* and *Mentha longifolia* against parasitic gastro-

- intestinal nematodes of livestock. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 7(3), 157–163. <https://doi.org/10.3329/bjp.v7i3.11437>
- Molina E., G. P., & Moreno-rojas R., Montero K., & Ferrer R., S. U. (2016). Toxic and antinutritional substances content of *Amaranthus dubius* Mart . ex Thell . Effect of plant part and harvesting season. *Ciencias Agroforestales*, 33(1), 19–33.
- Mora C., Galeano E & Osorio E. (2018). Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia I. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- Mukherjee N., Mukherjee S., Saini P., Roy P., & S. S. (2015). Phenolics and Terpenoids ; the Promising New Search for Anthelmintics : A Critical. *Reviews in Medicinal Chemistry*, 16(February), 1415–1441. <https://doi.org/10.2174/13895575166661511201210>
- Naranjo J, Ceballos O, Gavirira X, Tarazona A, Correa G, Chará J, & Murgueitio E, B. R. (2016). Study of in vitro fermentation kinetics of mixtures of forages from intensive silvopastoral systems ( SSPI ) with *Leucaena leucocephala* in Colombia. *Rev. CES Med. Zotec.*, 11(2), 6–17.
- Navarro C. A., & Roa M. L. (2018). Comparación de la digestibilidad de tres especies forrajeras estimada mediante diferentes técnicas Comparison of the digestibility of three forage species estimated by different techniques Comparação da digestibilidade de três espécies forrageiras estimad. *Orinoquia*, 22(1), 15–33.
- Nazli, R., Akhter, M., Ambreen, S., Hameed, A. and Sultana, N. (2008). *Insecticidal, nematicidal and antibacterial activities of gliricidia sepium*. [online] Pakbs.org. Available at: [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/40\(6\)/PJB40\(6\)2625.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/40(6)/PJB40(6)2625.pdf) [Accessed 11 Oct. 2019]
- Newton de Lucena C, Valdinei P, & J. M. (2014). Effects of cutting regimes on forage yield and chemical composition of *Leucaena leucocephala*. *PUBVET*, 8(20), 2–9.
- Ogunbosoye, D., Tona, G., & Otukoya, F. (2015). Evaluation of the Nutritive Value of Selected Browse Plant Species in the Southern Guinea Savannah of Nigeria for Feeding to Ruminant

Animals. *British Journal of Applied Science & Technology*, 7(4), 386–395.  
<https://doi.org/10.9734/bjast/2015/14051>

Olivoto T., Federal, Nardino M., Carvalho I., Follmann D., Jardel V., Ferrari M., de Pelegrin A., Q. V. (2017). Plant secondary metabolites and its dynamical systems of induction in response to environmental factors : A review. *African Journal of Agricultural Research*, (February). <https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11677>

Pavarini, D. P., Pavarini, S. P., Niehues, M., & Lopes, N. P. (2012). Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1–4), 5–16.  
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.002>

Pedraza R. (2000). *Valoración nutritiva del follaje de Gliricidia sepium ( Jacq .) Kunth ex Walp . y su efecto en el ambiente ruminal*. Universidad de Camagüey Centro de Estudios para el Desarrollo de la Producción Animal Valoración. Retrieved from  
<https://www.researchgate.net/publication/277014040>

Pérez C, Hernández M, Cruz P, & Hernández G, B. G. (2014). Efecto antihelmíntico in vitro del extracto metanólico de hojas de *Gliricidia sepium* contra nematodos gasrointestinales de ovinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17, 105–111.

Pereira T., Modesto E., de Deus D., de Oliveira O., de Freitas R., Pierre J., Dubeux J., & de C. J. (2018). Characterization and biological activity of condensed tannins from tropical forage legumes. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 53(9), 1070–1077.  
<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2018000900011>

Petrie A, W. P. (2013). *Statistics for Veterinary and Animal Science*.

Pizano, C., G. H. (2014). El bosque seco tropical en Colombia. In P. C. & H. García (Ed.), *Instituto de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH)* (Ediprint L, Vol. 53, pp. 1689–1699). Bogotá, D.C. Colombia. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Quijada, J., Fryganas, C., Ropiak, H. M., Ramsay, A., Mueller- Harvey, I. & Hoste, H. (2015). Anthelmintic activities against *Haemonchus contortus* or *Trichostrongylus colubriformis* from small ruminants are influenced by structural features of condensed tannins. *Journal of*

*Agricultural and Food Chemistry*, 63(28), 6346–6354.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00831>

Ramakrishna A., & Gokare. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior* ISSN:, 2324.  
<https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>

Rebollo, A. (2016). *Validación de un modelo de simulación productiva de ovinos de pelo alimentados con Leucaena leucocephala y Panicum máximum*. Universidad Autónoma de Chiapas.

Rivero-perez, N., & Jaramillo, A. (2019). Actividad antihelmíntica de la vaina de *Leucaena leucocephala* sobre nematodos gastrointestinales de ovinos (in vitro). Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* pod on gastrointestinal nematodes of sheep (in vitro). *Abanico Veterinario*, 9, 1–9. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21929/abavet2019.95>

Rodolfo, J., Solis, C., & Castillo, L. E. (2018). *Gliricidia sepium* ( Jacq .) Kunth ex Walp . Una especie arbórea multipropósito para la sustentabilidad de los agroecosistemas tropicales *Gliricidia sepium* ( Jacq .) Kunth ex Walp . a multipurpose arboreal species for the sustainability of tropical agroeco. *Agroproductividad*, 11(October), 195–200.  
<https://doi.org/10.32854/agrop.v11i10.1268>

Rodríguez G & Roncallo. B. (2013). Producción de forraje y respuesta de cabras en crecimiento en arreglos silvopastoriles basados en *Guazuma ulmifolia* , *Leucaena leucocephala* y *Crescentia cujete*. *Corpoica Ciencia. Tecnol. Agropecu*, 14(1), 77–89.

Rojas A., L., Jaramillo J., C., & Lemus B., M. (2015). *Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios de plantas*. (UTMACH). Ecuador: Universidad Técnica de Machala. Retrieved from <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/6653>.

Romero C, Palma J, & L. J. (2000). Influencia del pastoreo en la concentración de fenoles totales y taninos condensados en *Gliricidia sepium* en el trópico seco. *Livestock Research for Rural Development*, 12, 4. Retrieved from [lrrd.cipav.org.co/lrrd12/4/rome124.htm](http://lrrd.cipav.org.co/lrrd12/4/rome124.htm)

Safwat, A. M., Sarmiento-Franco, L., Santos-Ricalde, R. H., Nieves, D., & Sandoval-Castro, C.

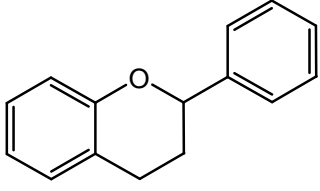
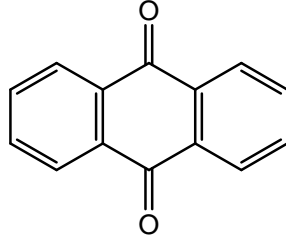
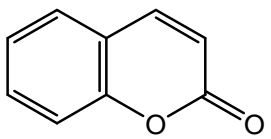
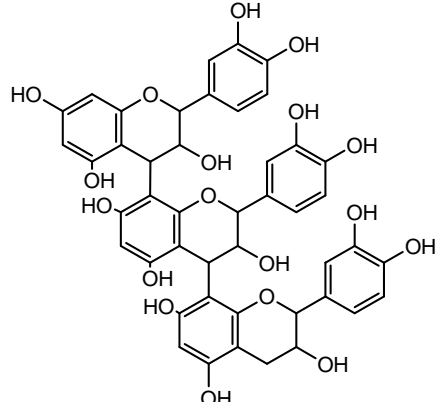
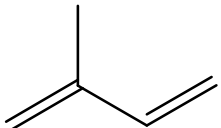
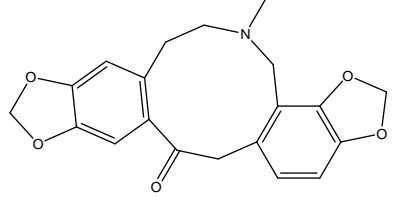
- A. (2015). Estimating apparent nutrient digestibility of diets containing *Leucaena leucocephala* or *Moringa oleifera* leaf meals for growing rabbits by two methods. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(8), 1155–1162. <https://doi.org/10.5713/ajas.14.0429>
- Salas, R. Z., Velásquez Vélez, R., Herrera Ospina, L. V., Osorio, L. R., & Polanco Echeverry, D. N. (2016). Prevalencia de Nematodos Gastrointestinales en Sistemas de Producción Ovina y Caprina bajo Confinamiento, Semiconfinamiento y Pastoreo en Municipios de Antioquia, Colombia. *Rev Inv Vet Perú*, 27(2), 344–354. <https://doi.org/10.15381/rivep.v27i2.11647>
- Santacoloma, L., & Granados, E. (2012). Interrelación entre el contenido de metabolitos secundarios de las especies *Gliricidia sepium* y *Tithonia diversifolia* y algunas propiedades físicoquímicas del suelo. *Revista de Investigación Agraria Y Ambiental*, 3(1), 53–62.
- Santacoloma-varón, L. E., & Granados, J. E. (2010). Evaluación del contenido de metabolitos secundarios en dos especies de plantas forrajeras encontradas en dos pisos térmicos de Colombia. *Revista de Investigación Agraria Y Ambiental RIAA*, 1(1), 31–35.
- Sedio B., Rojas J., Boya C., & W. S. (2017). Sources of variation in foliar secondary chemistry in a tropical forest tree community. *Ecology*, 98(3), 616–623. <https://doi.org/10.1002/ecy.1689>
- Sepúlveda-Vázquez, J., Torres-Acosta, J. F., Sandoval-Castro, C. A., Martínez-Puc, J. F., & Chan-Pérez, J. I. (2018). La importancia de los metabolitos secundarios en el control de nematodos gastrointestinales en ovinos con énfasis en Yucatán, México. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 5(2), 79–95.
- Shitan, N. (2016). Secondary metabolites in plants: transport and self-tolerance mechanisms. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(7), 1284–1294. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1151344>
- Slot Martijn, Garcia Milton N., Winter Klaus (2016) Respuesta de temperatura del intercambio de CO<sub>2</sub> en tres especies de árboles tropicales. *Functional Plant Biology* **43**, 468-478.

- Simanca S, J., Vergara Garay, O., & Bustamante Y, M. (2017). Descripción del crecimiento de ovinos criollos (*Ovis aries*) en dos poblaciones de Córdoba, Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 22(3), 6310. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1135>
- Soares, F., Braga, F., Araújo, J., Geniêr, H., Gouveia, A., & Queiroz, J. H. (2013). Nematicidal activity of three novel extracellular proteases of the nematophagous fungus *Monacrosporium sinense*. *Parasitology Research*, 112(4), 1557–1565. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3304-8>
- Toscan, G., Cadore, G. C., Limana, J. F. T., Weber, A., Palma, H. H., Duarte, M. M. F., ... & Vogel, F. S. F. (2017). Immune response of sheep naturally infected with *Haemonchus* spp. on pastures with two different nutritional conditions. *Semina: Ciências Agrárias*, 38(2), 809-819
- Toro, A., Rubilar, L., Palma, C., & Pérez, R. (2014). Resistencia antihelmíntica en nematodos gastrointestinales de ovinos tratados con ivermectina y fenbendazol. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(2), 247–252. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2014000200010>
- Torp, M. (2010). *The Effect of Snow on Plants and Their Interactions with Herbivores*. *Science*. Retrieved from [diva-portal.org/smash/get/diva2:283015/SUMMARY01.pdf](http://diva-portal.org/smash/get/diva2:283015/SUMMARY01.pdf)
- Turtola, S. (2005). The effects of drought stress and enhanced UV-B radiation on the growth and secondary chemistry of boreal conifer and willow seedlings. *PhD Dissertations in Biology*, 82(39), 1457–2486. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/7797/141f70ab4e4fe443952ec971c5e5c68b138b.pdf>
- Valares Masa, C., Sosa Díaz, T., Alías Gallego, J. C., & Chaves Lobón, N. (2016). Quantitative Variation of Flavonoids and Diterpenes in Leaves and Stems of *Cistus ladanifer* L. at Different Ages. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(3), 275. <https://doi.org/10.3390/molecules21030275>
- Vela, L. (2015). *Comportamiento agronomico y valor nutricional de la asociación de cuatro variedades de pasto (Panicum máximum Jacq), con la leguminosa Matarratón (Gliricidia sepium), en el colegio Jaime del Hierro en Santa María del Toachi*. Universidad Técnica Estatal de Quevedo unidad de estudios a distancia.

- Vivas Fernando, Vera Efraín, & A. J. (2017). Producción y salud animal Determinación in vitro de la calidad nutricional de tres leguminosas forrajeras In vitro determination of nutritional quality in three. *Revista La Técnica*, 5–10.
- Wabo Pone, J., Kenne Tameli, F., Mpoame, M., Pamo Tedonkeng, E., & Bilong Bilong, C. F. (2011). *In vitro* activities of acetonic extracts from leaves of three forage legumes (*Calliandra calothyrsus*, *Gliricidia sepium* and *Leucaena diversifolia*) on *Haemonchus contortus*. *Asian Pac J Trop Med*, 4(2), 125–128. [https://doi.org/10.1016/s1995-7645\(11\)60051-5](https://doi.org/10.1016/s1995-7645(11)60051-5)
- Wasim M., B. V. (2017). *Plant Secondary: Their Roles in Stress Ecophysiology*. (A. A. P. Inc., Ed.) (Taylor & F, Vol. 3). Canada & USA: Library of Congress Cataloging-in- Publication Data.
- Wattiaux M & Armentano. L. (2015). Metabolismo de Carbohidratos en vacas lecheras. *Agriculture Halla*, 9–12.
- Zambrano, C., Sánchez, D., & Uzcátegui, J. (2006). Consumo y digestibilidad de pasto King Grass (*Pennisetum purpureum*) fresco y ensilado con *Leucaena leucocephala* en ovinos en crecimiento. *Rev. Unell. Cienc. Tec*, 24, 77–82.
- Zheng, X., Xu, H., Ma, X., Zhan, R., & Chen, W. (2014). Triterpenoid saponin biosynthetic pathway profiling and candidate gene mining of the *Ilex asprella* root using RNA-Seq. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(4), 5970–5987. <https://doi.org/10.3390/ijms15045970>.
- Zossi, Silvia, Ruiz, Roberto M., Sorol, Natalia, & Sastre, Marcos. (2010). Espectroscopia por infrarrojo cercano (NIRS): Su aplicación en análisis de jugos de caña de azúcar. *Revista industrial y agrícola de Tucumán*, 87(1), 01-06. Recuperado en 02 de diciembre de 2019, de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-30182010000100001&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-30182010000100001&lng=es&tlng=es).

## Anexos

### Anexo 1. Biomoléculas

	
<p>Estructura básica de un flavonoide</p>	<p>Estructura básica de una antraquinona</p>
	
<p>Estructura básica de una cumarina</p>	<p>Estructura básica de taninos condensados</p>
	
<p>Estructura básica de terpeno (isopreno)</p>	<p>Ejemplo alcaloide con actividad antihelmíntica. Protopine</p>

**Anexo 2.** Soportes de investigaciones relacionadas a las variables encontradas

Autor	Año	Especie	Días	MS	PC	Cn	EE	EB	FDN	FDA	CNF
Vela	2015	G. sepium	80	19,24	25,71	7,35	4,12	3,04	X	X	X
			140	20,08	24,69	8,59	2,48	4,2			
Hurtado <i>et al</i>	2012	G. sepium	0	27,5	27,5	X	3,5	4,56	X	X	X
Aranque <i>et al</i>	2006	G. sepium	0	8,75	28,31	8,88	2,93	X	X	X	X
Ogunbosoye	2015	G. sepium	0	X	20,61	9,14	3,25	X	44,84	31,25	22,15
Congo <i>et al</i>	2017	G. sepium	45	X	24,77	X	X	X	X	X	X
		G. sepium	45	X	29,28	X	X	X	X	X	X
García <i>et al</i>	2008	G. sepium	90	X	29,95	7,53	X	18,7	40,26	X	X
		L. leucocephala	90	X	27,45	9,55	X	17,10	39,39	X	X
La O <i>et al</i>	2018	L. leucocephala	0	X	24,79	11,41	X	X	36,32	19,51	X
Martínez <i>et al</i>	2016	L. leucocephala	36	26,19	26,78	11,01	2,24	X	34,15	21,24	X
Vivas <i>et al</i>	2017	L. leucocephala	0	X	20,37	6,57	1,85	4,62	47,74	31,34	X
Hernández	2018	L. leucocephala	0	X	21,57	12,08	X	X	46,83	24,22	X
Figueroa <i>et al</i>	2016	L. leucocephala	42	X	24,16	X	3,42	X	49,02	23,63	X
Safwat	2015	L. leucocephala	0	X	16,31	7,96	4,61	X	34,24	29,9	X
Gaviria <i>et al</i>	2015	L. leucocephala	45	X	29,4	7,83	2,74	X	36,8	22,0	16,7

**Anexo 3.** Determinación de pruebas para análisis estadístico, para determinar la normalidad de las variables.

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
MS (g)	,958	17	,593
PC (g)	,921	17	,155
Cn (g)	,948	17	,427
E.E (g)	,909	17	,097
FDN(g)	,807	17	,003
FDA (g)	,868	17	,021
MS	,938	17	,296
EB	,953	17	,511
ED	,897	17	,060
EM	,936	17	,275
Fenoltot	,818	17	,004
Tantot	,847	17	,009
Tancon	,872	17	,024
Alctot	,966	17	,754

#### Anexo 4. Modelo factorial para la variable Materia Seca

##### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: MS (g)

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	899,093 <sup>a</sup>	5	179,819	6,271	,005
Intersección	14717,599	1	14717,599	513,242	,000
Edad	761,701	2	380,850	13,281	,001
Planta	10,930	1	10,930	,381	,550
Edad * Planta	136,760	2	68,380	2,385	,138
Error	315,434	11	28,676		
Total	18312,242	17			
Total corregida	1214,526	16			

#### Anexo 5 Modelo factorial para la variable Proteína Cruda

##### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: PC (g)

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	109,379 <sup>a</sup>	5	21,876	3,369	,043
Intersección	10188,884	1	10188,884	1569,023	,000
Edad	49,781	2	24,890	3,833	,055
Planta	10,112	1	10,112	1,557	,238
Edad * Planta	52,100	2	26,050	4,012	,049
Error	71,432	11	6,494		
Total	10989,599	17			
Total corregida	180,811	16			

## Anexo 6. Modelo factorial para la variable Cenizas

### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Cn (g)

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	16,230 <sup>a</sup>	5	3,246	2,481	,097
Intersección	1108,002	1	1108,002	847,033	,000
Edad	13,419	2	6,709	5,129	,027
Planta	,107	1	,107	,082	,780
Edad * Planta	2,373	2	1,187	,907	,432
Error	14,389	11	1,308		
Total	1151,342	17			
Total corregida	30,619	16			

## Anexo 7. Modelo factorial para la variable Extracto Etéreo

### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: E.E (g)

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	8,033 <sup>a</sup>	5	1,607	10,527	,001
Intersección	114,205	1	114,205	748,304	,000
Edad	7,092	2	3,546	23,234	,000
Planta	,002	1	,002	,014	,907
Edad * Planta	,562	2	,281	1,841	,204
Error	1,679	11	,153		
Total	143,328	17			
Total corregida	9,712	16			

**Anexo 8.** Prueba no paramétrica para la comparación de Fibra Detergente Neutra por edad y por planta

♣ Comparación de las edades

**Resumen de prueba de hipótesis**

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	Las medianas de FDN(g) son las mismas entre las categorías de Edad.	Prueba de medianas de muestras independientes	,784	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,0

♣ Comparación entre las plantas.

**Resumen de prueba de hipótesis**

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de FDN(g) es la misma entre las categorías de Planta.	Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes	,114 <sup>1</sup>	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia e:

<sup>1</sup>Se muestra la significancia exacta para esta prueba.

**Anexo 9.** Prueba para la comparación Fibra Detergente Ácida por edad y por planta

♣ Comparación de las edades

**Resumen de prueba de hipótesis**

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	Las medianas de FDA (g) son las mismas entre las categorías de Edad.	Prueba de medianas de muestras independientes	,784	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,06

♣ Comparación entre las plantas.

**Resumen de prueba de hipótesis**

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	Las medianas de FDA (g) son las mismas entre las categorías de Planta.	Prueba de medianas de muestras independientes	,153 <sup>1,2</sup>	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,06

<sup>1</sup>Se muestra la significancia exacta para esta prueba.

<sup>2</sup>Sig. exacta de Fisher

## Anexo 10.. Modelo factorial para la variable Digestibilidad Materia Seca

### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: DMS

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	62,275 <sup>a</sup>	5	12,455	3,185	,051
Intersección	87087,289	1	87087,289	22271,592	,000
Edad	44,741	2	22,370	5,721	,020
Planta	,335	1	,335	,086	,775
Edad * Planta	16,974	2	8,487	2,170	,160
Error	43,013	11	3,910		
Total	92261,332	17			
Total corregida	105,288	16			

## Anexo 11. Modelo factorial para la variable Energía Bruta

### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: EB

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	,116 <sup>a</sup>	5	,023	7,060	,003
Intersección	290,892	1	290,892	88149,083	,000
Edad	,034	2	,017	5,146	,026
Planta	,018	1	,018	5,568	,038
Edad * Planta	,080	2	,040	12,091	,002
Error	,036	11	,003		
Total	312,079	17			
Total corregida	,153	16			

**Anexo 12. . Modelo factorial para la variable Energía Digerible**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: ED

Origen	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	,169 <sup>a</sup>	5	,034	2,966	,062
Intersección	158,312	1	158,312	13929,627	,000
Planta	,017	1	,017	1,462	,252
Edad	,030	2	,015	1,337	,302
Planta * Edad	,132	2	,066	5,790	,19
Error	,125	11	,011		
Total	169,354	17			
Total corregida	,294	16			

**Anexo 13. Prueba para Carbohidratos no Fibrosos**

**Pruebas de normalidad**

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
CNF	,171	17	,200*	,910	17	,101

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: CNF

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	404,744 <sup>a</sup>	5	80,949	2,883	,067
Intersección	16654,906	1	16654,906	593,124	,000
Edad	35,106	2	17,553	,625	,553
Planta	167,861	1	167,861	5,978	,033
Edad * Planta	265,734	2	132,867	4,732	,033
Error	308,880	11	28,080		
Total	17651,876	17			
Total corregida	713,623	16			

## Anexo 14. Prueba para Taninos totales

### ♣ Comparación de las edades

#### Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Tanin es la misma entre las categorías de Planta.	Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes	,606 <sup>1</sup>	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es 0,05.

<sup>1</sup>Se muestra la significancia exacta para esta prueba.

♣ Comparación de las plantas

**Resumen de prueba de hipótesis**

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Tantot es la misma entre las categorías de Edad.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,568	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,

**Anexo 15. Prueba para Taninos condensados**

♣ Comparación de las edades

**Resumen de prueba de hipótesis**

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Tancon es la misma entre las categorías de Planta.	Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes	,806 <sup>1</sup>	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es

<sup>1</sup>Se muestra la significancia exacta para esta prueba.

♣ Comparación de las plantas

**Resumen de prueba de hipótesis**

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Tancon es la misma entre las categorías de Edad.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,359	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,

## Anexo 16. Prueba para Fenoles totales

### ♣ Comparación de las edades

#### Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Fenoltot es la misma entre las categorías de Planta.	Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes	,815 <sup>1</sup>	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es

<sup>1</sup>Se muestra la significancia exacta para esta prueba.

### ♣ Comparación de las plantas

#### Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Fenoltot es la misma entre las categorías de Edad.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,488	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,0

## Anexo 17. Prueba para Alcaloides totales

### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Alctot

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	,650 <sup>a</sup>	5	,130	4,137	,023
Intersección	4,869	1	4,869	154,971	,000
Planta	,250	1	,250	7,956	,017
Edad	,103	2	,051	1,635	,239
Planta * Edad	,316	2	,158	5,034	,028
Error	,346	11	,031		
Total	5,888	17			
Total corregida	,996	16			

**Anexo 18.** Prueba de normalidad para las variables climáticas y la relación entre metabolitos secundarios

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
temmax	,891	63	,000
temmin	,409	63	,000
preci	,723	63	,000
HR	,834	63	,000

**Anexo 19.** Prueba no paramétrica para la época y las variables de metabolitos

**Resumen de prueba de hipótesis**

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	Las medianas de Fenoltot son las mismas entre las categorías de Epoca.	Prueba de medianas de muestras independientes	,400	Retener la hipótesis nula.
2	Las medianas de Tantot son las mismas entre las categorías de Epoca.	Prueba de medianas de muestras independientes	,002	Rechazar la hipótesis nula.
3	Las medianas de Tancon son las mismas entre las categorías de Epoca.	Prueba de medianas de muestras independientes	,003	Rechazar la hipótesis nula.
4	Las medianas de Alctot son las mismas entre las categorías de Epoca.	Prueba de medianas de muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

**Anexo 20.** Matriz de correlación Pearson, para la época y el contenido de Taninos Totales

**Correlaciones**

		Tantot	temmax	temmin	preci	HR
Tantot	Correlación de Pearson	1	,160	,101	-,095	-,154
	Sig. (bilateral)		,212	,432	,457	,227
	N	63	63	63	63	63
temmax	Correlación de Pearson	,160	1	,596**	-,821**	-,781**
	Sig. (bilateral)	,212		,000	,000	,000
	N	63	63	63	63	63
temmin	Correlación de Pearson	,101	,596**	1	-,318*	-,849**
	Sig. (bilateral)	,432	,000		,011	,000
	N	63	63	63	63	63
preci	Correlación de Pearson	-,095	-,821**	-,318*	1	,481**
	Sig. (bilateral)	,457	,000	,011		,000
	N	63	63	63	63	63
HR	Correlación de Pearson	-,154	-,781**	-,849**	,481**	1
	Sig. (bilateral)	,227	,000	,000	,000	
	N	63	63	63	63	63

**Anexo 21.** Matriz de correlación Pearson, para la época y el contenido de Taninos condensados

**Correlaciones**

		Tancon	temmax	temmin	preci	HR
Tancon	Correlación de Pearson	1	,277*	,176	-,163	-,271*
	Sig. (bilateral)		,028	,167	,202	,031
	N	63	63	63	63	63
temmax	Correlación de Pearson	,277*	1	,596**	-,821**	-,781**
	Sig. (bilateral)	,028		,000	,000	,000
	N	63	63	63	63	63
temmin	Correlación de Pearson	,176	,596**	1	-,318*	-,849**
	Sig. (bilateral)	,167	,000		,011	,000
	N	63	63	63	63	63
preci	Correlación de Pearson	-,163	-,821**	-,318*	1	,481**
	Sig. (bilateral)	,202	,000	,011		,000
	N	63	63	63	63	63
HR	Correlación de Pearson	-,271*	-,781**	-,849**	,481**	1
	Sig. (bilateral)	,031	,000	,000	,000	
	N	63	63	63	63	63

**Anexo 22.** Matriz de correlación Pearson, para la época y el contenido de Fenoles Totales

**Correlaciones**

			Fenoltot	temmax	temmin	preci	HR
Fenoltot	Correlación de		1	,178	,114	-,103	-,176
	Pearson						
	Sig. (bilateral)			,163	,376	,422	,168
	N		63	63	63	63	63
temmax	Correlación de		,178	1	,596**	-,821**	-,781**
	Pearson						
	Sig. (bilateral)		,163	,000	,000	,000	,000
	N		63	63	63	63	63
temmin	Correlación de		,114	,596**	1	-,318*	-,849**
	Pearson						
	Sig. (bilateral)		,376	,000	,011	,000	,000
	N		63	63	63	63	63
preci	Correlación de		-,103	-,821**	-,318*	1	,481**
	Pearson						
	Sig. (bilateral)		,422	,000	,011	,000	,000
	N		63	63	63	63	63
HR	Correlación de		-,176	-,781**	-,849**	,481**	1
	Pearson						
	Sig. (bilateral)		,168	,000	,000	,000	,000
	N		63	63	63	63	63

**Anexo 23.** Matriz de correlación Pearson, para la variable época y el contenido de Alcaloides Totales, en relación a las variables climatológicas.

**Correlaciones**

		Alctot	temmax	temmin	preci	HR
Alctot	Correlación de Pearson	1	,274*	,175	-,159	-,271*
	Sig. (bilateral)		,030	,170	,215	,032
	N	63	63	63	63	63
temmax	Correlación de Pearson	,274*	1	,596**	-,821**	-,781**
	Sig. (bilateral)	,030		,000	,000	,000
	N	63	63	63	63	63
temmin	Correlación de Pearson	,175	,596**	1	-,318*	-,849**
	Sig. (bilateral)	,170	,000		,011	,000
	N	63	63	63	63	63
preci	Correlación de Pearson	-,159	-,821**	-,318*	1	,481**
	Sig. (bilateral)	,215	,000	,011		,000
	N	63	63	63	63	63
HR	Correlación de Pearson	-,271*	-,781**	-,849**	,481**	1
	Sig. (bilateral)	,032	,000	,000	,000	
	N	63	63	63	63	63

**Anexo 24.** Prueba de normalidad: Mortalidad

Concentración	Muestreros (crecimiento en días)		
	I (0 días)	II (42 días)	III ( 91 días)
<b>GLI</b>	<b>16,68</b>	<b>27,57</b>	<b>11,07</b>
CI50	1,72	31,47	1,12
CI99	39,1	21,71	25,99
<b>LEU</b>	<b>12,75</b>	<b>15,06</b>	<b>6,22</b>
CI50	2,93	11,3	0,25
CI99	27,47	20,69	15,17

## Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Mortalidad	,166	60	,000	,894	60	,000

a. Corrección de la significación de Lilliefors

## Anexo 25. Prueba para concentraciones inhibitorias: CI50

### Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	Las medianas de Mortalidad son las mismas entre las categorías de Concentración.	Prueba de medianas de muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

## Anexo 26. Prueba para concentraciones inhibitorias entre plantas: CI99

### Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	Las medianas de Mortalidad son las mismas entre las categorías de Planta.	Prueba de medianas de muestras independientes	,197	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.