

IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO FITOQUÍMICO DE DOS ESPECIES DE CAZAHUATE EN LA INTOXICACIÓN DE CABRAS EN UNA COMUNIDAD DE LA MIXTECA OAXAQUEÑA

IDENTIFICATION AND PHYTOCHEMICAL STUDY OF TWO SPECIES OF CAZAHUATE IN GOAT INTOXICATION IN A COMMUNITY OF OAXACA'S MIXTECA REGION

Roberta Mila-Arango¹, Efrén Ramírez-Bribiesca¹, Ramón M. Soto-Hernández¹, Omar Hernández-Mendo¹, Glafiro Torres-Hernández¹, Miguel Á. Mellado-Bosque²

¹Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. Km.36.5 Carretera México. 56230. Estado de México (robmilaa@yahoo.com.mx). ²Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Periférico y Carretera a Santa Fe. 27056. Torreón Coahuila, México.

RESUMEN

El propósito de este estudio fue la identificación de dos tipos de especies arbóreo-arbustivas presentes en la Región Mixteca Baja de Oaxaca, durante la temporada de sequía, las cuales han sido señaladas por técnicos y productores de rebaños caprinos como la principal causa de intoxicación de cabras, siendo en esta temporada la alternativa de alimentación en el sistema extensivo. El objetivo fue identificar y analizar bromatológica y fitoquímicamente a dos especies de *Ipomoea* involucradas en la intoxicación, así como realizar el análisis físico-químico del suelo donde crecen estas plantas y con ello corroborar o descartar la presencia de metabolitos secundarios, los cuales pueden ser la causa de la toxicidad. Las especies fueron identificadas como cazahuate blanco (*Ipomoea murucoides*) y cazahuate negro (*Ipomoea pauciflora* subsp. *pauciflora*), ambas pertenecientes a la familia Convolvulaceae. En el análisis bromatológico, *I. murucoides* presentó mayor contenido de proteína cruda y extracto etéreo ($P < 0.002$). El estudio fitoquímico preliminar de extractos mostró un alto contenido de taninos y flavonoides (+++) y una presencia notable (++) de terpenoides y alcaloides libres y liberados. En cuanto a los taninos y alcaloides el estudio mostró una presencia similar de estos metabolitos en ambas especies de *Ipomoea*, por lo que se afirma que si los causantes de la intoxicación son los metabolitos secundarios, la afección de ambas especies sería similar.

Palabras clave: CCF, extractos, *I. murucoides*, *I. pauciflora*, metabolitos secundarios.

ABSTRACT

The purpose of this study was to identify two types of tree-shrub species present in Oaxaca's Low Mixteca Region during drought season, which have been pointed out by technicians and goat producers as the principal cause for goat intoxication, since they are the food alternative during this season in the extensive system. The objective was to identify and analyze the bromatology and phytochemistry of two *Ipomoea* species involved in the intoxication, as well as to perform the physical-chemical analysis of the soil where these plants grow and, with that, to corroborate or dismiss the presence of secondary metabolites that can be the cause of the toxicity. The species were identified as white cazahuate (*Ipomoea murucoides*) and black cazahuate (*Ipomoea pauciflora* subsp. *pauciflora*), both belonging to the family Convolvulaceae. In the bromatology analysis, *I. murucoides* presented higher content of raw protein and ethereal extract ($P < 0.002$). The preliminary phytochemical study of extracts showed a high content of tannins and flavonoids (+++) and a notable presence (++) of terpenoids and free and released alkaloids. With regard to the tannins and alkaloids, the study showed a similar presence of these metabolites in both species of *Ipomoea*, so it is affirmed that if the secondary metabolites are the cause of the intoxication, the impact on both species would be similar.

Key words: CCF, extracts, *I. murucoides*, *I. pauciflora*, secondary metabolites.

INTRODUCTION

The Mixteca region is located in southern México, covering part of the states of Puebla, Guerrero and Oaxaca, with a total surface of 37 869 km². One of the principal economic

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: marzo, 2013. Aprobado: mayo, 2014.

Publicado como ARTÍCULO en ASyD 11: 463-479. 2014.

INTRODUCCIÓN

La región mixteca se ubica al sur de la República Mexicana, cubriendo parte de los estados de Puebla, Guerrero y Oaxaca, con una superficie total de 37 869 km². Una de las principales actividades económicas es la cría de ganado caprino bajo el sistema de libre pastoreo (Franco *et al.*, 2008), cuya alimentación depende de la producción de plantas leñosas bien adaptadas a las condiciones edafoclimáticas del lugar (Hernández, 2006). Sin embargo, la mayor limitante de estos sistemas extensivos es la baja disponibilidad de forrajes en la época de sequía, debido a que la vegetación disminuye drásticamente y, en consecuencia, los rebaños caprinos enfrentan problemas de falta de alimento, siendo la única fuente alimenticia los rebrotes de plantas tóxicas, como el cazahuatle (Arroyo, 2007). La intoxicación en los caprinos es ocasionada por sustancias conocidas como factores antinutricionales (FAN) o metabolitos secundarios que interfieren en el aprovechamiento de diversos nutrientes (proteínas, carbohidratos, minerales, etcétera). Esta intoxicación puede variar considerablemente en función del tipo de metabolito secundario, la estructura, la concentración, la solubilidad, el peso molecular y la cantidad consumida por el animal (Poncet-Legrand *et al.*, 2006). Algunas propiedades químicas notables de los metabolitos secundarios son: el poder reductor derivado de su capacidad de absorber oxígeno (Chyau *et al.*, 2002), su actividad antioxidante (Malencic *et al.*, 2008), la excelente capacidad como agente quelante (Santos-Buelga y Scalbert, 2000) y la capacidad de formar complejos estables con las proteínas y con otros polisacáridos, dependiendo del grado de polimerización y peso molecular (Hofmann *et al.*, 2006). Estos factores antinutricionales (FAN) son sustancias naturales no fibrosas generadas por el metabolismo secundario de las plantas, mismas que utilizan como medio de defensa contra depredadores (Kumar y Singh, 1992). Particularmente en la mixteca baja de Oaxaca la principal alternativa de alimento para los rebaños caprinos durante la época de sequía son dos especies de plantas conocidas comúnmente como cazahuatle blanco y negro. Durante tres años consecutivos se observaron en la región de estudio diferentes rebaños caprinos en el sistema de libre pastoreo en la estación más crítica (invierno-primavera), observándose que después de un consumo continuo de cazahuatle blanco y negro

activities is breeding goats under the system of free shepherding (Franco *et al.*, 2008), and their feeding depends on the production of woody plants that are well-adapted to the soil and climate conditions of the place (Hernández, 2006). However, the greatest limitation of these extensive systems is the low fodder availability during the drought season, because the vegetation decreases drastically and, in consequence, the goat flocks face problems from lack of food, since the sole source of food are sprouts of toxic plants like cazahuatle (Arroyo, 2007). Intoxication in goats is caused by substances known as antinutritional factors (ANF) or secondary metabolites that interfere with the use of various nutrients (proteins, carbohydrates, minerals, etc.). This intoxication can vary considerably in function of the type of secondary metabolite, the structure, the concentration, the solubility, the molecular weight and the amount consumed by the animal (Poncet-Legrand *et al.*, 2006). Some notable chemical properties of secondary metabolites are: the reducing power derived from their ability to absorb oxygen (Chyau *et al.*, 2002), their antioxidant activity (Malenic *et al.*, 2008), the excellent capacity as chelating agents (Santos-Buelga and Scalbert, 2000), and the capacity to form stable complexes with proteins and other polysaccharides, depending on the degree of polymerization and molecular weight (Hofmann *et al.*, 2006). These antinutritional factors (ANF) are non-fibrous natural substances generated by the secondary metabolism in plants, and they are used as a means of defense against predators (Kumar and Singh, 1992). Particularly in the Low Mixteca region in Oaxaca, the principal food alternative for goat herds during the drought season are two species of plants known commonly as white and black cazahuatle. For three consecutive years, different goat herds were observed in the study region under the free shepherding system during the most critical season (Winter-Spring), and it was seen that after continuous consumption of white and black cazahuatle during 20 days, the goats presented lack of coordination, fall of the posterior train, muscle tremors, opisthotonos movements, abortions, etc. These signs were present when consuming both species; however, producers from different zones in the Low Mixteca differ in regard to the plants' toxicity, mentioning that the black cazahuatle is more toxic, while others state that it is the white one. This lack of knowledge regarding the different toxic plants in

durante 20 días, los caprinos presentaron descoordinación, caída del tren posterior, temblores musculares, movimientos opistótonos, abortos, etcétera. Esta signología se presentó al consumir ambas especies; sin embargo, los productores de diferentes zonas de la mixteca baja difieren en cuanto a la toxicidad de la planta, mencionando que el cazahuate negro es más tóxico y otros afirman que es el blanco. Este desconocimiento sobre las distintas plantas tóxicas que se encuentran en la zona provoca que muchos casos de intoxicación queden sin diagnosticar o sean confundidos con otras causas. La identificación taxonómica de las plantas y un estudio fitoquímico permitirá determinar la presencia de los metabolitos secundarios y con ello llevar a cabo el diseño y la aplicación de medidas preventivas.

Por tanto, el objetivo de la presente investigación se basó en estudiar la región de estudio a través de un análisis de suelo, colecta e identificación botánica de las plantas, análisis bromatológico y determinación preliminar de los metabolitos secundarios presentes en las dos especies de cazahuate.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción de la región

La región mixteca cubre áreas de los estados de Puebla, Guerrero y gran parte de Oaxaca. Esta región se encuentra clasificada como de alta marginación, con una población mayoritariamente indígena y con carencias de alimentación, educación (analfabetismo), vivienda y atención médica, entre otros. Dentro de las principales actividades económicas de la región se encuentra la producción de artesanías (por ejemplo el tejido de la palma) y de granos básicos en temporal, así como la caprinocultura (DIGEPO, 2010). La mixteca oaxaqueña se divide en alta y baja, integrada en su totalidad por siete distritos. El de Huajuapán está conformado por 28 municipios, con una población total de 118 534 habitantes, de los cuales 18% son analfabetos; veinte municipios tienen un alto grado de marginación. El estudio se llevó a cabo en el municipio de San Miguel Amatitlán (municipio de alta marginación), específicamente en la comunidad de San Jorge el Zapote, ubicado a 17° 54' 49" N y 97° 59' 47" O, a una altura de 1460 m. El clima es cálido subhúmedo con lluvias en verano, la precipitación promedio anual es de 450 a 600 mm y la

the zone cause many cases of intoxication to remain without diagnosis or to be confused with other causes. The taxonomic identification of the plants and a phytochemical study will allow determining the presence of secondary metabolites and, with this, to carry out the design and implementation of preventive measures.

Therefore, the objective of this study was based on researching the study region through soil analysis, collection and botanical identification of the plants, bromatology analysis and the preliminary determination of secondary metabolites present in both species of cazahuate.

MATERIALS AND METHODS

Description of the region

The Mixteca region covers areas of the states of Puebla, Guerrero and a large part of Oaxaca. This region is classified as highly marginalized, with a mostly indigenous population and with deficiencies in food supply, education (illiteracy), housing and medical attention, among others. Within the main economic activities of the region there is production of handicrafts (for example, palm weaving) and of basic grains, seasonally, as well as goat breeding (DIGEPO, 2010). Oaxaca's Mixteca is divided into the high and low region, made up by seven districts. Huajuapán is made up of 28 municipalities, with a total population of 118 534 inhabitants, of which 18 % are illiterate; there are twenty municipalities with a high degree of marginalization. The study was performed in the municipality of San Miguel Amatitlán (municipality with high marginalization), specifically in the community of San Jorge el Zapote, located at 17° 54' 49" N latitude and 97° 59' 47" W longitude, at an altitude of 1460 m. The climate is warm sub-humid with summer rains, the average annual rainfall is 450 to 600 mm, and the mean annual temperature is 21 °C, with annual maximum and minimum means of 26 and 16 °C. It borders north with the state of Puebla; south with Huajuapán de León; east with Santiago Ayuquillilla; and west with Fresnillo de Trujano and Mariscala de Juárez. Its approximate distance from the state capital is 241 kilometers (DIGEPO, 2010). The total surface of the municipality is 198.48 km² and it represents 0.20 % with regard to the state's surface. The types of vegetation

temperatura media anual es de 21 °C, con medias máximas y mínimas anuales de 26 y 16 °C. Limita al norte con el estado de Puebla; al sur, con Huajuapán de León; al oriente, con Santiago Ayuquillilla; y al poniente, con Fresnillo de Trujano y Mariscala de Juárez. Su distancia aproximada a la capital del Estado es de 241 kilómetros (DIGEPO, 2010). La superficie total del municipio es de 198.48 km² y representa 0.20 % en relación con la superficie del Estado. Los tipos de vegetación reconocidos son seis: bosque de *Juniperus*, bosque de *Quercus*, bosque tropical caducifolio, matorral xerófilo, matorral subtropical y bosque de galería, predominando huizache (*Acacia farneciana*), tehuistle (*Acacia picachensis*), cubata (*Acacia cochliacantha*), mezquite (*Prosopis la evigata*), huaje (*Leucaena esculenta*), cazahuate (*Ipomoea Spp.*), hierba de burro (*Ambrosia chenopodiifolia*), tlaxiztle (*Amelanchier denticulata*), ocotes (*Pinus montezumae*), encinos (*Quercus glaucoideis*), entre otros. La fauna silvestre es muy escasa debido a la enorme deforestación y a la cacería; sin embargo, aún prevalecen algunos animales, como conejos (*oryctolagus cuniculus*), mapaches (*procyon*), zorros (*vulpes vulpes*), armadillos (*Dasyus novemcinctus*), tlacuaches (*Chironectes, minimus*) tejones (*Meles meles*) y venados (*Odocoileus virginianus*); aves como gavilán (*Accipiter nisum*), codornices (*Coturnix coturnix*), zopilote (*Cathartes aura*), palomas (*Columba livia*), colibrí (*Archilochus colubris*), calandrias (*Mimus saturninus*), chachalacas (*Ortalis vetula*) y correccaminos (*Geococcyx californianus*). Entre los reptiles están lagartijas (*Podaris sp.*), iguanas (*Conolophus subcristatus*) y serpientes (*Crotalus*). Dentro de las principales actividades económicas del municipio se encuentra la agricultura (maíz, frijol y calabaza), ganadería (caprinocultura) y comercio. Los suelos dominantes son regosol (81.79 %), leptosol (12.33 %) y phaeozem (5.88 %). En cuanto al uso potencial de la tierra 3.43 % es para agricultura manual estacional y 96.57 % no es apta para la agricultura. En el aspecto pecuario, 96.57 % de la vegetación natural es aprovechada únicamente por el ganado caprino (INEGI, 2005).

Análisis de suelo

Los tipos de suelo presentes en esta región son los litosoles, regosol, éutrico, regosol calcáreo, feozem háplico y cambisol cálcico. Los litosoles son los que mayor área ocupan, con una profundidad menor a los

reconocidos son seis: *Juniperus* forest, *Quercus* forest, deciduous tropical forest, xeric scrubland, subtropical scrubland and gallery forest, with predominance of huizache (*Acacia farneciana*), tehuistle (*Acacia picachensis*), cubata (*Acacia cochliacantha*), mezquite (*Prosopis la evigata*), huaje (*Leucaena esculenta*), cazahuate (*Ipomoea Spp.*), hierba de burro (*Ambrosia chenopodiifolia*), tlaxiztle (*Amelanchier denticulata*), ocote pines (*Pinus montezumae*), oak (*Quercus glaucoideis*), among others. The wild fauna is quite scarce due to the grave deforestation and to hunting; however, some animals still prevail, such as rabbit (*oryctolagus cuniculus*), raccoon (*procyon*), fox (*vulpes vulpes*), armadillo (*Dasyus novemcinctus*), opossum (*Chironectes, minimus*) badger (*Meles meles*) and deer (*Odocoileus virginianus*); birds such as sparrow hawk (*Accipiter nisum*), quail (*Coturnix coturnix*), black vulture (*Cathartes aura*), dove (*Columba livia*), hummingbird (*Archilochus colubris*), calandria lark (*Mimus saturninus*), chachalaca (*Ortalis vetula*) and roadrunner (*Geococcyx californianus*). Among the reptiles there are lizards (*Podaris sp.*), iguanas (*Conolophus subcristatus*) and snakes (*Crotalus*). The principal economic activities are agriculture (maize, bean and squash), livestock production (goat breeding) and commerce. The dominating soils are regosol (81.79 %), leptosol (12.33 %) and phaeozem (5.88 %). In terms of the potential use of land, 3.43 % is for rainfed manual agriculture and 96.57 % is not apt for agriculture. In the livestock production aspect, 96.57 % of the natural vegetation is used solely for goats (INEGI, 2005).

Soil analysis

The types of soils present in the region are lithosol, regosol, eutric, calcaric regosol, haplic feozem and calcaric cambisol. Lithosols occupy the largest area, with a depth under 10 cm; they are stony and the mother rock commonly surfaces. Xeric scrubland grows on these, mostly, and to a lesser degree *Juniperus* forest and subtropical scrubland. With these conditions the survival of different plant species in drought season is very difficult; this is why species that sprout with the first rains (such as white and black cazahuate) seek their survival, producing secondary metabolites as a defense mechanism. The plants generate the secondary compounds and concentrate them in their different plant tissues according to a

10 cm; son pedregosos y la roca madre comúnmente aflora. En ellos crecen principalmente el matorral xerófilo y en menor proporción el bosque de *Juniperus* y el matorral subtropical. Con estas condiciones la supervivencia de diferentes especies vegetales en temporada de sequía es muy difícil; es por ello que las especies que rebrotan en las primeras lluvias (como el cazahuate blanco y negro) buscan su supervivencia, produciendo metabolitos secundarios como medio de defensa. Las plantas generan los compuestos secundarios y los concentran en sus diferentes tejidos vegetales de acuerdo con una estrategia de defensa, esto en función de la importancia del tejido para la planta en ese estado fisiológico (Harborne, 1999). Dalo y Moussatché (1998) destacan que la toxicidad de los vegetales depende de muchas variables relacionadas con la planta, tales como la especie vegetal, el estado vegetativo, la época del año y las condiciones climáticas y edáficas, etcétera. Para realizar el análisis de suelo, en mayo de 2011 se tomaron diferentes muestras de suelo en la comunidad de San Jorge el Zapote, municipio de San Miguel Amatitlán, específicamente en los lugares donde se realizó la colecta de hojas de las dos especies en estudio. Las muestras de suelos se tomaron de 15 cm de profundidad, depositándolas en bolsas de plástico (impermeables por dentro), previamente identificadas para su traslado al Laboratorio de Fertilidad y Química Ambiental del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, identificadas con el Lote N. 2012014/ 737-738. En el laboratorio se determinó el pH (Black, 1968); Conductividad Eléctrica (C.E) (Jackson *et al.*, 1982); Materia Orgánica (M.O) (Klra y Maynard, 1991); Fósforo (P) (Olsen y Dean, 1965 y John, 1970); Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Sodio (Na) (Champman, 1965); Potasio (K), Carbono (C), Hierro (Fe), Cobre (Cu), Manganese (Mn), Zinc (Zn) (Lindsay y Norvell, 1978); Nitrógeno (Bremer, 1965) y Textura por el método de Boyoucos (Gee y Bawder, 1986).

Recolecta de ejemplares botánicos

En septiembre de 2011 se realizaron colectas de ejemplares botánicos (por triplicado) con diferentes partes vegetativas (raíz, tallo y hojas) y reproductoras (flor y fruto) de las dos especies de cazahuate; éstas fueron prensadas (prensa portátil de madera 60 x 40 cm) para su traslado al laboratorio del Programa de Botánica del Colegio de Postgraduados para su identificación

defense strategy, in function of the importance of the tissue in that physiological state (Harborne, 1999). Dalo and Moussatché (1998) highlight that the toxicity of vegetables depends on many variables related to the plant, such as the plant species, the vegetative state, the time of the year, and the climate and soil conditions, etc. To perform the soil analysis, different soil samples were taken in May 2011 at the community of San Jorge el Zapote, Municipality of San Miguel Amatitlán, specifically in the places where the leaf collection from the two species in study was done. The soil samples were taken at 15 cm depth, placing them in plastic bags (waterproof inside), previously identified for their transport to the Fertility and Environmental Chemistry Laboratory of Colegio de Postgraduados, Montecillo Campus, identified with the Lot No. 2012014/ 737-738. In the lab, the following were determined: pH (Black, 1968); Electric Conductivity (C.E) (Jackson *et al.*, 1982); Organic Matter (MO) (Klra and Maynard, 1991); Phosphorus (P) (Olsen Dean, 1965 and John, 1970); Calcium (Ca), Magnesium (Mg), Sodium (Na) (Champman, 1965); Potassium (K), Carbon (C), Iron (Fe), Copper (Cu), Manganese (Mn), Zinc (Zn) (Lindsay and Norvell, 1978); Nitrogen (Bremer, 1965) and Texture with the Boyoucos method (Gee, 1986).

Botanical specimen collection

On September 2011, collections of botanical specimens were performed (in triplicate) with different vegetative (root, stem and leaves) and reproductive (flower and fruit) parts from the two species of cazahuate; these were pressed (portable wooden press 60 x 40 cm) for their transport to the Botanical Program lab in Colegio de Postgraduados for their taxonomic identification. The information obtained at the moment of collecting was recorded, and with the support of a GPS (Global Position System), the exact location of the place was recorded. In the laboratory, the botanical material collected was completely dried through dehydrating and flattening, with the aim of preserving the plant structures for their later identification.

The samples pressed were placed between two sheets of drying paper (60 x 40 cm), previously labeled, placing a grooved carton between every two samples, stacking the other specimens in the same way. Next the press was fastened, keeping it in the prefabricated dryer for five days, time enough for

taxonómica. Se tomó nota de la información obtenida al momento de la colecta, y con apoyo de un GPS (Global Position System) se registró la ubicación exacta del lugar. En el laboratorio se secó totalmente el material botánico colectado mediante una deshidratación y un aplanado, con el fin de preservar las estructuras de las plantas para su posterior identificación.

Las muestras prensadas se colocaron entre dos hojas de papel secante (60 x 40 cm), previamente etiquetadas, poniendo en cada dos muestras un cartón acanalado, apilándose de la misma manera los demás ejemplares. Enseguida se procedió a sujetar la prensa, manteniéndola en el secador prefabricado por cinco días, tiempo suficiente para la deshidratación. El secado, identificación, montaje y etiquetado de los ejemplares botánicos fue realizado en el mismo herbario-hortorio del Programa de Botánica del Colegio de Postgraduados, donde fueron depositados, y los duplicados se distribuyeron en otros herbarios nacionales.

Colecta de material vegetativo (hojas)

En mayo de 2011 (temporada de sequía) se colectaron hojas de los rebrotes de las dos especies de caahuate (negro y blanco), siendo en esta temporada el único tejido vegetal presente, el cual, al ser consumido por las cabras, desencadena los problemas de intoxicación en esta temporada.

Las hojas colectadas fueron secadas bajo sombra a temperatura ambiente por un periodo de 20 días; después de este tiempo se molieron en un molino *Willey* (criba de 1 mm) y se almacenaron en recipientes de vidrio color ámbar para análisis posteriores.

Análisis bromatológico

En el laboratorio de Nutrición Animal del Colegio de Postgraduados, campus Montecillo, se determinó el contenido de materia seca (MS), cenizas (A.O.A.C., 2000), extracto etéreo (Nielsen, 2010), lignina (Goering y Van Soest, 1972; Van Soest, 1963); fibra detergente neutra (FDN) y ácida (FDA), de acuerdo con los procedimientos de Goering y Van Soest (1972) y Van Soest *et al.*, (1991); el contenido de proteína cruda (PC) se determinó por el contenido total de nitrógeno por el método de Kjeldahl.

dehydration. The drying, identifying, mounting and labeling of the botanical specimens was carried out in the same herbarium of the Botanical Program in Colegio de Postgraduados, where they were deposited, and the duplicates were distributed to other national herbariums.

Plant material collection (leaves)

On May 2011 (drought season), leaves were collected from the sprouts of the two species of caahuate (black and white), since they are the only plant tissue present during this season, which, when consumed by goats, trigger the intoxication problems during this season.

The leaves collected were dried under shadow at room temperature for a period of 20 days; after that time, they were ground in a Willey mill (sieve of 1 mm) and they were stored in amber glass containers for later analyses.

Bromatology analysis

At the Animal Nutrition laboratory in Colegio de Postgraduados, Montecillo Campus, the content of dry matter (MS), ash (A.O.A.C., 2000), ethereal extract (Nielsen, 2010), lignin (Goering and Van Soest, 1972; Van Soest, 1963), neutral detergent fiber (FDN) and acid (FDA), were determined according to procedures by Goering and Van Soest (1972) and Van Soest *et al.*, (1991); the raw protein content (PC) was determined by the total nitrogen content through the Kjeldahl method.

The MS content in the vegetative samples was used as an adjustment value for the other components of the chemical composition (A.O.A.C. 1975).

Description of the technique used to obtain extracts

At the Phytochemistry laboratory in Colegio de Postgraduados, four extracts from the two plant species previously ground (described earlier) were obtained, using the Soxhlet and Agitation-Free Dry, techniques that consist in using water or a solvent (liquid capable of dissolving another substance) to release and solubilize secondary metabolites. Four solvents were used for their extraction (hexane, dichloromethane, methanol and

El contenido de MS en las muestras vegetativas se usó como valor de ajuste para los demás componentes de la composición química. (A.O.A.C. 1975).

Descripción de la técnica para la obtención de los extractos

En el laboratorio de Fitoquímica del Colegio de Postgraduados se obtuvieron cuatro extractos de las dos especies vegetales, previamente molidas (descrito anteriormente), mediante el equipo Soxhlet y Agitación-Liofilización, técnicas que consisten en usar agua o un disolvente (líquido capaz de disolver otra sustancia) para liberar y solubilizar los metabolitos secundarios. Para la extracción de éstos se recurrió a la utilización de cuatro disolventes (hexano, diclorometano, metanol y agua). Las tres primeras extracciones se realizaron con el equipo Soxhlet, el cual permite hacer una extracción de sólido a líquido y la última extracción se realizó mediante agitación y liofilización. El disolvente se añadió a la cámara de extracción del equipo Soxhlet en cantidades suficientes para el funcionamiento del sifón, hasta cubrir las dos terceras partes de la cámara de extracción. Se pasó agua por el refrigerante y se inició el calentamiento del matraz bola hasta la ebullición del disolvente; los vapores fueron condensados en el refrigerante para caer sobre el material biológico. La extracción de una gota por segundo fue idónea hasta que se agotó; es decir, el líquido (disolvente) queda incoloro cuando pasa por la cámara de extracción (Roberts *et al.*, 1974; Harborne, 1991; Ikan, 1991). Para la preparación de las muestras se pesaron 10 g de cada una, depositándolas en cartuchos diferentes (recipiente cilíndrico) de papel filtro, mismos que fueron colocados en la cámara de extracción del equipo soxhlet (uno por uno). En seguida se adicionó el disolvente necesario para evitar que el matraz se quedara seco antes de la extracción. El primer disolvente usado para la extracción fue el hexano (Fermont®), el cual se mantuvo a una temperatura de 60 °C por 12 h, hasta quedar claro el disolvente, indicando con ello que todas las sustancias de la polaridad del disolvente se extrajeron. Posteriormente se evaporó el disolvente con la ayuda de un rotavapor (Buchi, Mod R114). Finalmente se depositó el extracto sólido en un frasco previamente pesado y, de esta manera, se conoció la concentración obtenida en 10 g de muestra. El mismo procedimiento se realizó con los cartuchos utilizados

water). The first three extractions were performed with the Soxhlet equipment, which allows making an extraction from solid to liquid and the last extraction was performed through agitation and freeze drying. The solvent was added to the extraction chamber in the Soxhlet equipment in sufficient amount for the functioning of the siphon, until covering two thirds of the extraction chamber. Water was passed through the refrigerant and the ball flask was heated until the solvent was boiling; the vapors were condensed in the refrigerant to fall on the biological material. The extraction of one drop per second was ideal until running out; that is, until the liquid (solvent) is left colorless when it goes through the extraction chamber (Roberts *et al.*, 1974; Harborne, 1991; Ikan, 1991). For the preparation of samples, 10 g of each one were weighed, and they were deposited in different cartridges (cylindrical recipient) with filter paper, which were placed in the extraction chamber of the Soxhlet equipment (one by one). Immediately after, the necessary solvent was added to prevent the flask from being left dry before the extraction. The first solvent used for the extraction was hexane (Fermont®), which was kept at a temperature of 60 °C for 12 h, until the solvent was clear, indicating that all substances of the solvent's polarity were extracted. Later, the solvent was evaporated with the help of a rotary evaporator (Buchi, Mod R114). Finally, the solid extract was deposited in a previously weighed jar and, thus, the concentration obtained in 10 g was known. The same procedure was carried out with the cartridges used in the prior extraction, changing only the solvent (dichloromethane R.A., Merck®), with a boiling point of 40 °C for 13 h, necessary time for the extraction. The third solvent used with the equipment was methanol R.A. (Baker®), with a boiling point of 65 °C for 33 h, necessary time to extract the substances of this polarity. Obtaining the extract with water from the plant material was prepared with the methodology proposed by Ersus and Yurdagel (2006), placing in an Erlenmeyer flask 10 g of sample, previously ground, from each species, adding enough water to cover it. It was treated with ultrasound (Ultrasound Bath, Brandsonic brand, Mod 22) for 10 min in two periods; next it was covered and it was subject to a process of magnetic agitation (at room temperature) during 6 h and filtered. The extract obtained was freeze-dried for 48 h with the objective of eliminating the solvent

en la extracción anterior, cambiándole únicamente el disolvente (diclorometano R.A., Merck®), con un punto de ebullición de 40 °C por 13h, tiempo necesario para la extracción. El tercer disolvente utilizado con el equipo fue el metanol R.A. (Baker®), con un punto de ebullición de 65 °C por 33 h, tiempo necesario para extraer las sustancias de esa polaridad. La obtención del extracto con agua del material vegetal se preparó con la metodología propuesta por Ersus y Yurdagel (2006), depositando en un matraz Erlenmeyer 10 g de muestra, previamente molida, de cada especie, agregándole agua suficiente para cubrirla. Se trató con ultrasonido (Baño de Ultrasonido, marca Brandsonic, Mod 220) por 10 min en dos periodos; enseguida se tapó y se sometió a un proceso de agitación magnética (a temperatura ambiente) durante 6 h y se filtró. El extracto obtenido se liofilizó por 48 h con el objetivo de eliminar el disolvente (mediante el proceso de sublimación /congelación), donde la muestra se congeló y se introdujo a una cámara de alto vacío, con el objeto de favorecer que el agua pasara del estado sólido a vapor, permitiendo la concentración del extracto liofilizado.

Estudio fitoquímico

La presencia de metabolitos secundarios en los tejidos vegetales se detectó con el análisis de los extractos, mediante agentes cromógenos (sustancias que reaccionan formando precipitados, espuma y cambios de color, entre otros) (Raffauf, 1994) y cromatografía en capa fina (CCF), la cual permite analizar moléculas pequeñas, y de esta manera conocer el número de compuestos presentes en la muestra (Domínguez, 1988; Stahl, 1969).

Mediante la realización de estas pruebas específicas se determinó de manera cualitativa la posible presencia o ausencia de diversos metabolitos secundarios (terpenoides, flavonoides, alcaloides, saponinas y taninos) en los cuatro extractos obtenidos de cada especie vegetal (cazahuate negro y blanco), determinándose a partir del nivel de coloración obtenida en la placa de CCF al ser aplicado el revelador específico para cada grupo de metabolitos, siguiendo la metodología descrita por Domínguez (1988), Stahl (1969); Soto y Rodríguez (1998). Para la valoración de las pruebas realizadas se utilizó el sistema cualitativo de cruces para especificar la presencia o ausencia de los grupos de metabolitos mediante los siguientes

(through the sublimation/freezing process), where the sample was frozen and introduced into a high vacuum chamber, with the aim of favoring for water to pass from the solid state to vapor, allowing the concentration of the freeze dried extract.

Phytochemical study

The presence of secondary metabolites in plant tissues was detected with the extract analysis, through chromogenic agents (substances that react forming precipitates, foam, and changing color, among others) (Raffauf, 1994) and thin layer chromatography (TLC), which allows analyzing small molecules and therefore understanding the number of compounds present in the sample (Domínguez, 1988; Stahl, 1969).

Through these specific tests, the possible presence or absence of various secondary metabolites (terpenoids, flavonoids, alkaloids, saponins and tannins) was determined in the four extracts obtained from each plant species (black and white cazahuate), determining this from the level of coloring obtained in the CCF plate when the specific developer for each group of metabolite was applied, following the methodology described by Domínguez (1988), Stahl (1969) and Soto and Rodríguez (1998). For the valuation of the tests performed, a qualitative crossing system was used to specify the presence or absence of the groups of metabolites through the following criteria: High content or Abundant presence (+++), Notable presence (++), Slight presence (+) and Absence (-) (Galindo *et al.*, 1989; García, 2003).

Statistical analysis

The difference of means in the bromatological analyses between the two species were compared with the Student t test and the yield percentages of extracts with the Kruskal-Wallis test (S.A.S, 2002).

RESULTS

Botanical identification

The two species of plants identified by technicians and producers as causes of intoxication in goats in Oaxaca's Low Mixteca region during drought season, commonly known as white cazahuate and black cazahuate, were identified as *I. muruoides*

criterios: Alto contenido o Presencia cuantiosa (+++), Presencia notable (++), Presencia leve (+) y Ausencia (-) (Galindo *et al.*, 1989; García, 2003).

Análisis estadístico

Las diferencias de las medias en los análisis bromatológicos entre las dos especies se compararon con la prueba t de Student y los porcentajes de rendimientos de los extractos se hizo con la prueba de Kruskal-Wallis (S.A.S, 2002).

RESULTADOS

Identificación botánica

Las dos especies de plantas identificadas por técnicos y productores como causantes de intoxicación en cabras en la mixteca baja de Oaxaca en temporada de sequía, conocidas comúnmente como cazahuato blanco y cazahuato negro, fueron identificadas como *I. murucoides* (Roemer y Schuities, 1819) e *I. pauciflora* subsp. *pauciflora* (Martens. y Galeotti, 1845), respectivamente, pertenecientes a la familia Convolvulaceae. (Figura. 1).

Ipomoea es el género que mejor representa a la familia Convolvulaceae, con cerca de 500 especies de distribución, de las cuales 150 se encuentran en México. Dentro de este género hay especies de hábito arbóreo-arbustivo o de enredaderas leñosas que se han diversificado (McDonald, 1992). Solano (1997) realizó un estudio florístico en la mixteca baja oaxaqueña, identificando la existencia de seis especies de *Ipomoea*, mencionando entre ellas a *I. murucoides* e *I. pauciflora*, sin hacer mención de la subsp *pauciflora*.

Ipomoea murucoides es una planta originaria de México, crece en climas que van de semicálido a templado en alturas de los 600 a los 2400 m, asociada a bosque tropical caducifolio y a matorral xerófilo, siendo común encontrarla en matorrales secos y espinosos. Es un especie arbóreo-arbustiva de 3 a 10 m de altura, de madera blanda, con presencia de látex, con tallos floríferos longitudinalmente surcados, densamente lanuginosos de 5 a 8 mm de diámetro. Las hojas son alargadas, presenta grupos de flores blancas que son muy vistosas, los frutos son lisos y en forma de huevo (cuando se encuentran secos tienden a abrirse), las semillas están cubiertas con pelos blancos y suaves (Pherson, 1981).

(Roemer and Schuities, 1819) and *I. pauciflora* subsp. *pauciflora* (Martens. and Galeotti, 1845), respectively, belonging to the Convolvulaceae family (Figure 1).

Ipomoea is the genus that best represents the Convolvulaceae family, with nearly 500 species of distribution, of which 150 are found in México. Within this genus there are species of tree-shrub habit or woody vines that have diversified (McDonald, 1992). Solano (1997) performed a floristic study in Oaxaca's Low Mixteca region, identifying the existence of six *Ipomoea* species, mentioning among them *I. murucoides* and *I. pauciflora*, without mentioning the subsp *pauciflora*.

Ipomoea murucoides is a plant originally from México, it grows in climates that range from the semi-warm to the temperate in heights from 600 to 2400 masl, associated to the deciduous tropical forest and to xeric scrubland, and it is common in dry and spiny shrubs. It is a tree-shrub species of 3 to 10 m height, soft wood, with presence of latex, flower stems that are longitudinally furrowed, densely woolly of 5 to 8 mm diameter. The leaves are elongated, it presents groups of white flowers that are very attractive, the fruits are smooth and egg-shaped (when they are dry they tend to open), the seeds are covered with white and soft hairs (Pherson, 1981).

Ipomoea pauciflora is a plant whose origin is still unknown; however, it inhabits warm and semi-warm climates, between 400 to 2000 masl, associated to very disturbed vegetation, derived from deciduous tropical forest and xeric scrubland. *I. pauciflora* is a tree-shrub plant that can reach 3 to 8 m of height, with white flowers, and its seeds are covered by soft white hairs (Soto, 1987).

Soil analysis

The results obtained in the different parameters (pH, CE, M.O, N, P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Cu, Mn, Zn) and texture (sand, loam, clay) evaluated from the soil proved to be similar in both *Ipomoea* species (Table1), thus dismissing that a difference in the soil composition affects the growth or production of secondary metabolites of the species under study, taking into account that the soil samples were taken around each plant species.

It is important to mention that the soil and climate demands from different species of the same genus are



a) Flor de *Ipomoea pauciflora*



b) Flor de *Ipomoea murucoides*



c) Ejemplar botánico de *Ipomoea murucoides*



c) Ejemplar botánico de *Ipomoea pauciflora*

Figura 1. a) flor de *Ipomoea pauciflora*. b) flor de *Ipomoea murucoides*. c) ejemplar botánico de *Ipomoea murucoides*. d) Ejemplar botánico de *Ipomoea pauciflora*.

Figure 1. a) *Ipomoea pauciflora* flower. b) *Ipomoea murucoides* flower. c) Botanical specimen of *Ipomoea murucoides*. d) Botanical specimen of *Ipomoea pauciflora*.

Ipomoea pauciflora es una planta cuyo origen aún se desconoce; sin embargo, habita en climas cálido y semicálido, entre 400 a 2000 msnm, asociada a la vegetación muy perturbada, derivada de bosque tropical caducifolio y matorral xerófilo. *I. pauciflora* es una planta arbóreo-arbustiva que llega a medir de 3 a 8 m, con flores de color blanco, y sus semillas están cubiertas por suaves pelos blancos (Soto, 1987).

not the same; such is the case of *Ipomoea fistulosa* (Mart.ex Choisy), which requires partially floodable or humid zones (Hueza *et al.*, 2003); however, *Ipomoea carnea*, *I. conzzati* (Greenman), *I. elongata* (Choisy), *I. orisabensis* (Ledonois ex Standley) and *I. purpurea* (L. Roth) require, for their growth, dry places with conditions similar to those of the species from this study (*I. pauciflora* and *I. murucoides*).

Análisis de suelo

Los resultados obtenidos en los diferentes parámetros (pH, CE, M.O., N, P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Cu, Mn, Zn) y la textura (arena, limo, arcilla) evaluados del suelo mostraron ser similares en ambas especies de *Ipomoea* (Cuadro 1), descartando con ello alguna diferencia en la composición del suelo que repercuta en el crecimiento o producción de metabolitos secundarios de las especies en estudio, tomando en cuenta que las muestras de suelo se tomaron alrededor de cada especie vegetal.

Es importante mencionar que las exigencias edafoclimáticas de diferentes especies del mismo género no son las mismas; tal es el caso de *Ipomoea fistulosa* (Mart.ex Choisy), la cual requiere de zonas parcialmente inundables o húmedas (Hueza *et al.*, 2003); sin embargo, *Ipomoea carnea*, *I. conzzati* (Greenman), *I. elongata* (Choisy), *I. orisabensis* (Ledonois ex Standley) e *I. purpurea* (L.Roth) requieren lugares secos con condiciones similares a las especies de este estudio para su crecimiento (*I. pauciflora* e *I. murucoides*).

Análisis bromatológico

Las hojas de las plantas evaluadas en este estudio mostraron diferencia en la mayoría de fracciones en su composición química (proteína cruda, extracto etéreo, fibra detergente ácida (FDA), fibra detergente neutra (FDN) y celulosa), excepto en lignina (Cuadro 2).

Los valores de proteína cruda (determinando el contenido total de nitrógeno total por 6.25) tuvieron diferencias significativas ($P < 0.002$) entre las dos especies evaluadas: 18.67 % para *I. murucoides* y 18.19 % para *I. pauciflora*. Estos valores son muy similares a las de otras especies existentes en la mixteca en temporada de lluvia; tal es el caso del huamúchil, con un contenido de proteína cruda de 18.3 % (Hernández *et al.*, 2002). Devendrá (1995) y Hernández (2006) mencionan que el valor nutricional de las plantas depende del estado fenológico, época del año, topografía, clima, madurez vegetal, fertilización; así como la posición de las hojas en las ramas.

Las hojas evaluadas en este estudio son rebrotes de las dos especies de *Ipomoea*, ya que en esta etapa las cabras las consumen como única alternativa de alimentación en temporada de sequía. Los contenidos de FDN, FDA y cenizas en *Ipomoea murucoides*

Cuadro 1. Análisis químico del suelo *I. murucoides* e *I. pauciflora* subsp. *Pauciflora*.

Table 1. Chemical analysis of the soil, *I. murucoides* and *I. pauciflora* subsp. *Pauciflora*.

Análisis (%)	Unidades	<i>I. pauciflora</i>	<i>I. murucoides</i>
pH		7.0	7.3
CE	mmhos/cm	1.0	0.4
M.O.	%	3.0	4.8
N	%	0.15	0.44
P	ppm	1.0	1.6
K	meq/100g	2.1	2.2
Ca	meq/100g	11.4	11.2
Mg	meq/100g	4.2	4.9
Na	meq/100g	0.5	0.4
Fe	ppm	12.0	11.0
Cu	ppm	2.0	1.0
Mn	ppm	27.0	15.0
Zn	ppm	1.0	1.0
Arena	%	66.0	58.0
Limo	%	17.0	31.0
Arcilla	%	16.0	10.0
Clasificación textural		Franco arcillo arenoso	Franco arenoso

Bromatology analysis

The leaves of the plants evaluated in this study showed differences in most of the fractions in their chemical composition (raw protein, ethereal extract, acid detergent fiber (FDA), neutral detergent fiber (FDN) and cellulose), except in lignin (Table 2).

The values of raw protein (determining the total content of total nitrogen by 6.25) had significant differences ($P < 0.002$) between the two species evaluated: 18.67 % for *I. murucoides* and 18.19 % for *I. pauciflora*. These values are quite similar to other species present in the Mixteca region during the rainy season; such is the case of huamúchil, with a raw protein content of 18.3 % (Hernández *et al.*, 2002). Devendrá (1995) and Hernández (2006) mentioned that the nutritional value of plants depends on the phenological stage, time of year, topography, climate, plant maturity, fertilization; as well as the leaf position on the branches.

The leaves evaluated in this study are sprouts from the two *Ipomoea* species, since in this stage the goats

Cuadro 2. Análisis bromatológico *I. murucoides* e *I. pauciflora* subsp. *pauciflora*.
Table 2. Bromatology analysis, *I. murucoides* and *I. pauciflora* subsp. *pauciflora*.

Análisis (%)	<i>I. pauciflora</i>	<i>I. murucoides</i>	EEM
Materia seca	92.15 b	92.35 a	0.05
Proteína	18.19 b	18.67 a	0.11
Extracto etéreo	8.68 b	15.81 a	1.62
Fibra detergente Neutro	35.45 b	46.25 a	2.4
Fibra detergente ácido	24.76 b	32.61 a	1.75
Cenizas	9.22 b	11.87 a	0.59
Lignina	7.99 a	8.85 a	0.29

Medias en la misma fila, seguidas por diferentes letras, son estadísticamente diferentes ($P < 0.002$). ♦ Means in the same row, followed by different letters, are statistically different ($P < 0.002$).

reflejan mayor madurez de la planta en comparación con *I. pauciflora* en la misma región y tiempo de colección. En consecuencia, estos resultados generan menor digestibilidad y disponibilidad de energía en el forraje.

En referencia al extracto etéreo, el mayor valor lo presentó *Ipomoea murucoides*. En general, a pesar de crecer en una temporada crítica y difícil (sequía), estas plantas presentaron un contenido nutricional aceptable, a diferencia de otras especies vegetales reportadas en la literatura (Tobin y Muller, 1998). Sin embargo, la presencia de compuestos secundarios en las plantas con actividad antinutricional influye en el valor nutritivo del follaje. Poppi y Norton (1995) los consideran como la mayor limitante para incrementar el uso de las leguminosas tropicales en la nutrición animal.

Obtención y rendimiento de los extractos a partir del material vegetal

Los rendimientos de los extractos obtenidos de las dos especies de *Ipomoea* mostraron mayor porcentaje de rendimiento en el extracto con metanol (20.2 y 12.9 %), posteriormente el de agua (10.2 y 5.9 %), seguido del hexano (7.9 y 5.5 %) y el diclorometano (1.8 %), siendo *I. murucoides* la que presentó mayor rendimiento a excepción del extracto con diclorometano, lo cual fue similar en ambas especies (Cuadro 3). A partir de los resultados obtenidos se demuestra

consume them as the only food alternative during drought season. The FDN, FDA and ash contents in *Ipomoea murucoides* reflect greater maturity of the plant in comparison to *I. pauciflora* in the same region and time of collection. As consequence, these results generate less digestibility and availability of energy in the fodder.

With regard to the ethereal extract, the highest value was presented by *Ipomoea murucoides*. In general, in spite of growing during a critical and difficult season (drought), these plants presented an acceptable nutritional content, in contrast with other plant species reported in the literature (Tobin and Muller, 1998). However, the presence of secondary compounds in the plants with anti-nutritional activity influences the nutritional value of the fodder. Poppi and Norton (1995) consider this the greatest limitation to increasing the use of tropical leguminous plants in animal nutrition.

Obtaining extracts and their yield from plant material

The yield of extracts obtained from the two *Ipomoea* species showed a higher percentage of yield than the methanol extract (20.2 and 12.9 %), then water (10.2 and 5.9 %), followed by hexane (7.9 and 5.5 %) and dichloromethane (1.8 %), with *I. murucoides* being the one that presented higher yield with the exception of the dichloromethane extract, which was similar in both species (Table 3). From the results obtained, it is shown that leaves from this species contain more polar compounds (soluble in methanol and water) than low-polarity ones (hexane and dichloromethane).

These yields were obtained from the dry material and from weight difference with the extract. A similar study performed in Venezuela with *Ipomoea quamoclit* (Convolvulaceae), doing extractions with hexane and methanol from leaves, flower and stem, obtained higher yield from the methanol extract (Shailili *et al.*, 2007), similar to the one recorded in this study with the two *Ipomoea* species.

Phytochemical study

In the raw extracts of the two *Ipomoea* species, from the foliar plant of the two species, a high content (+++) of flavonoids and tannins (extract with methanol), a notable presence (++) of free and

Cuadro 3. Porcentaje de rendimiento obtenido de los cuatro extractos de las dos especies de *Ipomoea* en 10 g de muestra.
Table 3. Percentage of yield obtained from the four extracts of the two *Ipomoea* species in 10 g of sample.

Especie vegetal	Rendimiento extracto (%)			
	Metanol	Agua	Hexano	Diclorometano
<i>Ipomoea pauciflora</i>	20.2 a	10.2 a	7.9 a	1.8 a
<i>Ipomoea murucoides</i>	12.9 b	5.9 b	5.5 b	1.8 a

Medias en la misma columna seguidas por diferentes letras son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$). ♦ Means in the same column, followed by different letters, are statistically different ($P < 0.05$).

que las hojas de estas especies contienen más compuestos polares (solubles en metanol y agua) que de baja polaridad (hexano y diclorometano).

Estos rendimientos fueron obtenidos a partir del material seco y se obtuvieron por diferencia de peso con el extracto. Un estudio similar realizado en Venezuela con *Ipomoea quamoclit* (Convolvulaceae), realizando extracciones con hexano y metanol de hojas, flor y tallo, obtuvieron mayor rendimiento del extracto con metanol (Shaili *et al.*, 2007), similar a lo registrado en el presente estudio con las dos especies de *Ipomoea*.

Estudio fitoquímico

En los extractos crudos de las dos especies de *Ipomoea*, procedentes de la parte foliar de las dos especies de *Ipomoea*, se encontró un alto contenido (+++) de flavonoides y taninos (extracto con metanol), una presencia notable (++) de alcaloides libre y liberados (extracto con diclorometano) y la presencia notables de (++) terpenoides (extracto con hexano y diclorometano). Sin embargo, en el extracto con agua hubo presencia leve (+) de taninos en *I. murucoides* y en *I. pauciflora* (-) hubo ausencia. En ninguno de los extractos de las dos especies se encontró la presencia de saponinas (Cuadro 4, Figura. 2).

La presencia cualitativa de estos metabolitos secundarios fue muy similar en las dos especies, observándose muy poca diferencia en la cromatografía de capa fina (CCF) realizada. Estas pequeñas variaciones se atribuyen tanto a las especies, al estado de desarrollo como al estado fisiológico de la planta, los cuales cumplen un papel importante como mecanismos de señalización y defensa ante las agresiones ambientales (estrés abiótico, cantidad de luz, agua, cambios extremos de temperatura, heridas, así como otras provenientes de los organismos patógenos o de herbívoros). Los resultados para alcaloides coinciden

released alkaloids (extract with dichloromethane) and the notable (++) presence of terpenoids (extract with hexane and dichloromethane) were found. However, in the extract with water there was a slight (+) presence of tannins in *I. murucoides* and in *I. pauciflora* there was absence (-). The presence of saponins was not found in any of the extracts from the two species (Table 4, Figure 2).

The qualitative presence of these secondary metabolites was quite similar in the two species, showing a very small difference in the thin layer chromatography (TLC) performed. These small variations are attributed both to the species, the state of development, and to the physiological state of the plant, which fulfill an important role as mechanisms for signaling and defense against environmental aggressions (abiotic stress, amount of light, water, extreme temperature changes, wounds, as well as others from pathogenic organisms or herbivores). The results for alkaloids agree with those reported by Jenett-Siems *et al.* (2004) regarding the presence of this type of compounds in eight *Ipomoea* species, all from Germany. However, these studies have not yet proven the presence of flavonoids and tannins. On the other hand, two studies about the *Ipomoea* genus, carnosus species, one performed in Argentina and another in Mozambique, point out that it is a toxic plant, causing economic losses in animal production when it is consumed by goats in times of scarcity of natural grasses, because it is one of the few species that remain green all year, identifying the presence of “*swainsonina* and *calisteginas*” alkaloids in this plant through gas chromatography-mass spectrometry (Katalin *et al.*, 1999; Riet and Méndez, 2000). The clinical signs presented by the consumption of this species (*Ipomoea carnea*) is characterized by oscillatory lateral movements of the head, ocular nigmatism, ataxia, tremors, balancing, fall of the posterior train, difficulty to rise, and paresia (Armién *et al.*, 2007;

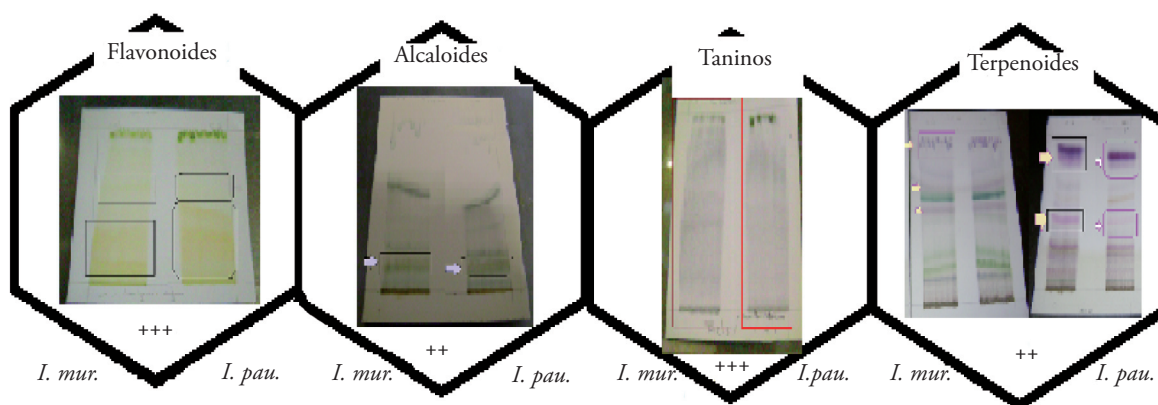
Cuadro 4. Análisis fitoquímico de los extractos obtenidos de las dos especies de *Ipomoea*.
Table 4. Phytochemical analysis of the extracts obtained from the two *Ipomoea* species.

Extracto	Terpenoides		Flavonoides		A.Libres		A.Lib.		Saponinas		Taninos	
	<i>I. p</i>	<i>I. m</i>	<i>I. p</i>	<i>I. m</i>	<i>I. p</i>	<i>I. m</i>	<i>I. p</i>	<i>I. m</i>	<i>I. p</i>	<i>I. m</i>	<i>I. p</i>	<i>I. m</i>
E.H	++	++							-	-		
E.D	++	++			++	++	++	++	-	-		
E.M			+++	+++					-	-	+++	+++
E.A									-	-	-	+

E.H: Extracto con hexano; E.D: Extracto diclorometano; E.M: Extracto con metanol; E.A: Extracto con agua; I.p: *Ipomoea pauciflora*; I.m: *Ipomoea murucoides*; +++: Presencia cuantiosa o alto contenido; ++: Presencia notable; +: Presencia leve; -: ausencia; A. Lib: Alcaloides liberados; A. Libres: Alcaloides libres. ♦ E.H: Extract with hexane; E.D: Extract with dichloromethane; E.M: Extract with methanol; E.A: Extract with water; I.p: *Ipomoea pauciflora*; I.m: *Ipomoea murucoides*; +++: Abundant presence or high content; ++: Notable presence; +: Slight presence; -: Absence; A. Lib: Alkaloids released; A. Libres: Free alkaloids.

con lo reportado por Jenett - Siems *et al.* (2004) sobre la presencia de este tipo de compuestos en ocho especies de *Ipomoea*, todas provenientes de Alemania. Sin embargo, estos estudios no han demostrado aún la presencia de flavonoides y taninos. Por otro lado, dos estudios sobre el género *Ipomoea*, especie *carnea*, uno realizado en Argentina y otro en Mozambique, señalan que es una planta toxica, provocando pérdidas económicas en la producción animal cuando es consumida por las cabras en épocas de escasez de pasturas naturales, debido a que es una de las pocas especies que permanecen verdes todo el año, identificando la presencia de alcaloides “*swainsonina* y *calisteginas*” en esta planta mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (Katalin *et al.*, 1999; Riet y Méndez, 2000). La signología clínica presentada por el consumo de esta especie (*Ipomoea carnea*)

Haraguchi *et al.*, 2003). Other signs observed when consuming *Ipomoea carnea* are: weight loss, decrease in frequency of ruminal sounds, anemia, delay in the time of capillary filling, and abnormalities in the cutaneous crease (Daló and Moussatché, 1998). Some animals show great appetite towards this species, which probably leads to an addiction (Barnosa *et al.*, 2006; Ralphs *et al.*, 1990). *Ipomoea fistulosa* is another species that belongs to the Convolvulaceae family in Argentina, where animals do not consume these plants under natural conditions, with enough food supply. The consumption of this *Ipomoea* occurs in certain times of the year, primarily as the result of lack of sufficient fodder, and the younger animals are affected more. Its toxicity is attributed to the presence of alkaloids that inhibit glucosidases (*swainsonina* and *calisteginas*) (Méndez and Riet-Correa, 2000;


Figura 2. Identificación de metabolitos secundarios de las dos especies de *Ipomoea*. I.mur: *Ipomoea murucoides*; I.pau: *Ipomoea pauciflora*.
Figure 2. Identification of secondary metabolites of the two *Ipomoea* species. I.mur: *Ipomoea murucoides*; I.pau: *Ipomoea pauciflora*.

se caracteriza por movimientos oscilatorios laterales de la cabeza, nigmatismos oculares, ataxia, temores, balanceo, caída del tren posterior, dificultad para levantarse, y paresia (Armién *et al.*, 2007; Haraguchi *et al.*, 2003). Otros signos observados al consumir *Ipomoea carnea* son: pérdida de peso, disminución de la frecuencia de ruidos ruminales, anemia, retardo en el tiempo de llenado capilar y anomalías del pliegue cutáneo (Daló y Moussatché, 1998). Algunos animales muestran gran apetencia hacia el consumo de esta especie, lo cual posiblemente conduzca a una adicción (Barbosa *et al.*, 2006; Ralphs *et al.*, 1990). *Ipomoea fistulosa* es otra especie perteneciente a la familia Convolvulaceae en Argentina, donde en condiciones naturales, con oferta suficiente de alimento, los animales no ingieren estos vegetales. El consumo de esta *Ipomoea* ocurre en determinadas épocas del año, principalmente por la falta de forraje suficiente, siendo más afectados los animales jóvenes. Su toxicidad es atribuida a la presencia de alcaloides inhibidores de glucosidasas (*swainsonina* y *calisteginas*) (Méndez y Riet-Correa, 2000; Molyneux *et al.*, 1995). Las cabras de la región mixteca baja de Oaxaca presentaron una signología similar, por lo que se asume que esto se debe al consumo de las especies *I. murucoides* e *I. pauciflora*, de las cuales no existe información científica.

CONCLUSIONES

Las dos especies conocidas como cazahuato blanco y negro, señaladas como causantes de intoxicación en cabras en el periodo de sequía (invierno-primavera) en la región mixteca baja de Oaxaca, fueron especies identificadas como *murucoides* y *pauciflora* (subsp. *pauciflora*), pertenecientes al género *Ipomoea* de la familia Convolvulaceae. El análisis bromatológico realizado en las dos especies mostró que tienen un porcentaje de proteína y extracto etéreo aceptable para la alimentación de los animales, a pesar de crecer en un suelo pobre. Sin embargo se encontró la presencia de metabolitos secundarios al realizar el análisis fitoquímico preliminar en ambas especies, identificando un alto contenido (+++) de taninos y flavonoides, y la presencia notable (++) de terpenoides y alcaloides libres y liberados. Con este estudio realizado se empieza a corroborar que son especies arbóreo-arbusivas necesarias en la alimentación de los rebaños (de sistema de explotación extensiva) en temporada de sequía; sin embargo, con base en lo obtenido en

Molyneux *et al.*, 1995). The goats from Oaxaca's Low Mixteca region presented similar signs, so it is assumed that this is due to the consumption of the species *I. murucoides* and *I. pauciflora*, of which there is no scientific information.

CONCLUSIONS

The two species known as white and black cazahuato, signaled as causes of intoxication in goats during the drought period (winter-spring) in Oaxaca's Low Mixteca region, were species identified as *murucoides* and *pauciflora* (subsp. *pauciflora*), which belong to the *Ipomoea* genus from the Convolvulaceae family. The bromatology analysis performed in the two species showed that they have a percentage of protein and ethereal extract acceptable for feeding the animals, in spite of growing on poor soil. However, the presence of secondary metabolites was found when performing the preliminary phytochemical analysis of both species, identifying a high content (+++) of tannins and flavonoids, and the notable presence (++) of terpenoids and free and released alkaloids. With this study, we begin to corroborate that they are tree-shrub species necessary in the diet of the herds (of extensive exploitation system) during the drought season; however, based on what was found in this study, it is recommended to avoid the consumption of these species for the time being, due to the presence of tannins and alkaloids. In view of this, it is necessary to identify in future research the structure, concentration and amount consumed by goats and, with that, to determine the concentrations tolerated by the animal or to seek alternatives that counteract the effect of the secondary metabolites (tannins-alkaloids), or to definitely avoid their consumption, seeking other food alternatives.

- End of the English version -

este estudio, por el momento se recomienda evitar el consumo de estas especies, debido a la presencia de taninos y alcaloides. Ante esto es necesario identificar la estructura, concentración y cantidad consumida por los caprinos en futuras investigaciones y con ello determinar las concentraciones soportadas por el animal o buscar alternativas que contrarresten el efecto de los metabolitos secundarios (taninos- alcaloides),

o definitivamente evitar su consumo, buscando otras alternativas de alimentación.

LITERATURA CITADA

- A.O.A.C. 1975. Official Methods of Analysis of the Association of official Agricultural Chemists. 12th Edition. Published by the Association of official Agricultural Chemists. Washington, D.C.
- A.O.A.C. 2000. Official Methods of Analysis of the AOAC International, 17th Ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD. USA. 1:500.
- Armien, A.G., Tokarnia, C.H., Vargas, and P.P., Frese, K. 2007. Spontaneous and experimental glycoprotein storage disease of goat induced by *ipomoea carnea* subsp *fistulosa* (convolvulaceae). Vet Pathol 44:170-184.
- Arroyo. 2007. Clasificación del potencial forrajero arbóreo arbustivo de importancia para la caprinocultura en el municipio de Piaxtla, en la mixteca poblana. Tesis de licenciatura. FMVZ-BUAP. Tecamachalco, Puebla.
- Barbosa, R. C., C. F. Riet, R.M. Medeiros, E.F. Lima, S.S. Barros, E.J. Gimeno, R.J. Molyneux, and D.R. Gardner. 2006. Intoxication by *Ipomoea sericophylla* and *Ipomoea riedelii* in goat in the state of Paraíba, Brazil. Toxicon 47:371-379.
- Black. 1968. Soil-Plant relationship J. Wiley and Sons New York. USA. pp 237-355.
- Bremer. 1965. Total nitrogen. In: C.A. Black (ed) Methods of soil analysis part. 2. Agronomy. American Society of agronomy Madison Wisconsin. pp: 1149-1178.
- Chapman. 1965. Cation exchange capacity. In: C.A Black (ed). Methods of analysis. Part 2. American Society of Agronomy Madison. Wisconsin. (agronomy). pp: 891-901.
- Chyau, C.C., S.Y. Tsai, P.T. Ko, and J.L. Mau. 2002. Antioxidant properties of solvent extracts from Terminalia cattappa leaves. Food Chemistry, 78:483-488.
- Daló y Moussatché. 1998. Acción tóxica de las plantas del género *Ipomoea*. Revista de la Universidad Centro Occidental (Venezuela) 6:25-39.
- Devendra. 1995. Composition and nutritive value of browse legume. In: Tropical legumes in animal nutrition. Edited by J.P.F. D'Mello y C. Devendra. CAB. International. pp: 49-65.
- DIGEPO (Dirección General de Población de Oaxaca. Distrito de Oaxaca). 2010. <http://www.oaxaca.gob.mx/digepo/publicaciones.htm>.
- Domínguez. 1988. Métodos de Investigación Fitoquímica. Cuarta Reimpresión Ed.Limusa, México. 281 p.
- Ersus, S., and U. Yurdagel. 2006. Microencapsulation of anthocyanins pigments of black carrot (*Daucus carota*) by spray drier. Journal of Food Engineering 80: 805-812.
- Franco, G. F., Sánchez, R. M., Hernández, J. E., Villareal, O.A., Rodríguez, J.C., y Rojas, V.H. 2008. Identificación botánica y tipo de hábitat de la vegetación arbórea y arbustiva consumida por cabras en pastoreo trashumante en la región mixteca, México. Departamento de producción animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. Campus de Rábanales, 14014. Córdoba España.
- Galindo, W., M. Rosales., E. Murgueitio, y J. Larrahondo. 1989. Sustancias antinutricionales en las hojas de los árboles forrajeros. Livestock Res, Rural Develop; 1(1): <http://www.cipav.org.com/lrrd/lrrd1/1/ Mauricio.htm>.
- García. 2003. Evaluación de los principales factores que influyen en la composición fitoquímica de Morus. Alba (Linn). Tesis de maestría, EEPF. Indio Hatuey, Matanzas, Cuba.
- Gee, G.W., and J.W. Bauder. 1986. Particle-size analysis. In: A. Klute (ed). Methods of soil analysis. part 1 American Society of agronomy. Madison, Wisconsin. Usa. pp: 383-411.
- Goering, H.K., y P.J. Van Soest. 1972. Forage Fiber Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures and some Applications). Agricultural Handbook No. 379. Agricultural Research Service. United States Department of Agriculture. 20 p.
- Haraguchi, M., S.L. Gorniak, K. Ikeda, Y. Minami, A. Kato, A.A. Watson, R.J. Nash, Molyneux, and R.J. Asano. 2003. Alkaloidal components in the poisonous plants, *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). J. Agri Food Chem 51:4995-5000.
- Harborne. 1991. Phytochemical Methods 3^a ed. Chapman y Hall. Londres. 288 p.
- Harborne. 1999. An overview of antinutritional factors in higher plants. In: J.C. Caygill and I. Mueller-Harvey (eds). Secondary plant products. Antinutritional and beneficial actions in animal feeding. Nottingham University Press. pp: 7-16.
- Hernández, G.F., E.B. Villarreal, R.J. Camacho, O.R. Pedraza, y F.C. Juárez. 2002. Valor nutricional de seis especies arbóreas y arbustivas consumidas por los caprinos durante la época de lluvia en la mixteca poblana. Departamento de producción animal FMVZ-BUAP, México. CEDEPA Universidad de Camagüey Cuba.
- Hernández. 2006. Valoración de la caprinocultura en la mixteca poblana: Socioeconomía y recursos arbóreo-arbustivos. Tesis doctoral. Universidad de Camagüey, Cuba.
- Hueza, I.M, M.L. Dagli, S.L. Gorniak, and C.A. Paulino. 2003. Toxic effect of prenatal *Ipomoea carnea* K administration to rats. Vet Hum Toxicol 45: 298-302.
- Hofman, T., A. Glabasnia, B. Swarz, K.N. Wisman, K.A. Gangwer, and A.E. Hagerman. 2006. Protein binding astringent taste of a polymeric procyanidin, 1, 2, 3, 4, 6 Pentagallyl-D-glucopyranose, castalagin, and grandinin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54:9503-9509.
- Ikan. 1991. Natural products. A laboratory guide. Academic Press. San Diego. 360 p.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2005. Marco Geoestadístico Municipal, Prontuario de Información Geográfica Municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Versión 3.1.
- Jackson, F. S., T.N. Barry, C. Lascano, and B. Palmer. 1982. The extractable and bound condensed tannin content of leaves from tropical tree, shrub and forages legumes. Journal of the science of food and agriculture. 17:103-110.
- Jenett, Siems. K., C. Sonja, T. Schimming, K. Siem, F. Muller, M. Hilker, L. Witte, T. Hartmann, D. Austin, and E. Eich. 2004. Phytochemistry and Chemotaxonomy of the Convolvulaceae Phytochemistry. 66:223-231.
- John. 1970. Colorimetric determination of phosphorus in soil and plant materials with ascorbic.
- Katalin, K. I., M. de Balogh, P. Alberto, Jaco. J. Dimande, Lugt. Vander, J. Russell, T.W. Molyneux, and W. G. Naude. 1999. A lysosomal Storage disease induced by *Ipomoea carnea* in goats in Mozambique. Journal of veterinary Diagnostic investigation. 11:266-272.
- Klra, and D.G. Maynard. 1991. Methods manual for forest soil and plant analysis. For. Can; Northwest. Reg; north for. Cent, Edmoton. Alberto Canada.

- Kumar, R., and M. Singh. 1992. Tannins: their adverse role in ruminant nutrition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32(3): 447-453.
- Lindsay, W.L. and W.A. Norvell. 1978. Development of a DTPA soil test for Zinc, Iron manganese, and soil. *Sci. Suc. Am J.* 42:421-428.
- Malencic, D., Z. Maksimovic, Popovic, and M.J. Miladinovic. 2008. Polyphenol content and antioxidant activity of soybean seed extracts. *Bioresource Technology*, 99:6688-6691.
- Martens and Galeotti. 1845. *Bull. Acad. Roy. Sci. Bruxelles* 12:266. 1845. TYPE: Galeotti 1403 (BR, holotype not seen; P, presumed isotype). Pedúnculos 3-12mm long; México-Guatemala. Subsp. *Pauciflora*.
- McDonald. 1992. Evolutionary implications of typical and anomalous secondary growth in arborescent *Ipomoea* (convulvaceae). *Bull. Torrey Bot. Club* 119: 262-267.
- Méndez, M.C., y F. Riet-Correa. 2000. Plantas tóxicas e micotoxicosis. Pelotas, editora e gráfica universitaria/UFPel. Laboratorio regional de diagnóstico Facultad de Veterinaria. 112 p.
- Molyneux, R.J., R.A. McKenzie, B.M. O'Sullivan, and A.D. Elbein. 1995. Identification of the glycosidase inhibitors swansonine and calystegine B2 in weir vine (*Ipomoea* sp) Q6 AFF calabra and correlation with toxicity. *J of Natural Products* 58:878-886.
- Nielsen. 2010. *Food Analysis Laboratory Manual*, 2nd Ed. Kluwer Academic/Plenum Publisher, Nueva York. 177 p.
- Olsen, S.R. and L.A. Dean. 1965. Phosphorus. In: C.A Black (ed). *Methods of soil analysis part 2*. American Society of agronomy Madison. Wisconsin Agronomy. pp: 1035-1040.
- Pherson, Gordon. 1981. *Studies in Ipomoea* (Convolvulaceae) I. The arborescens group. pp: 533-538.
- Poncet-Legrand, C., A. Edelman, J.L. Putaux, D. Cartalade, P. Sarni-Manchado, and A. Vernhet. 2006. Poly (L-proline) interactions with flavan-3-ols units: influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. *Food Hydrocolloids*, 20:687-697.
- Poppi, D. P., and B.W. Norton. 1995. Intake of tropical legumes. In: *Tropical Legumes in Animal Nutrition*. Edited by J.p.F. D'Mello and C. Devendra. CAB International. pp: 173-189.
- Raffauf. 1994. *Plant Screening. A field test manual*.
- Ralphs, M.H., K.E. Panter, and L.F. James. 1990. Feed preferences and habituation of sheep poisoned by locoweed. *J Anim Sci* 68: 1354-1362.
- Riet, C. E., and M. Méndez. 2000. Plantas tóxicas e micotoxicosis, Ed. Grafica Universitaria, Pelotas (Brasil). pp: 36-37.
- Roemer, and Schuitens. 1819. *Syst. Veg.* 4:248. Type: not determined ("e horto valentino").
- Roberts, R.M., L.B. Rodewald, and A.S. Wingrove. 1974. *An Introduction to Modern Experimental Organic Chemistry*. Holt, Rinehart and Winston, Inc. New York. 528 p
- Santos-Buelga, C. and A. Scalbert. 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds. Nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of food and Agriculture*, 80:1094-1117.
- SAS. 2002. *User's guide statistic*. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
- Shailili, M., H. Fernando, C. Oscar, V. Helen, M. Miguel, M. Raumaris, y M. Yuianny. 2007. Evaluación fitoquímica y actividad antibacteriana de los extractos de *Ipomoea quamoclit* L. (Convolvulaceae). Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre. Escuela de Ciencias, Departamento de Química. Lab. de Productos Naturales. Cumaná, Venezuela.
- Solano. 1997. Estudio florístico y descripción de la vegetación del municipio de Asunción Cuyotepeji, Distrito de Huajuapán de León, Oax, México. Departamento de Botánica. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. pp: 37-75.
- Soto, J.C. 1987. Las plantas medicinales y su uso tradicional en la cuenca del Río Balsas, destacados de Michoacán Guerrero. Tesis. UNAM. 231 p.
- Soto, H.M., y M.T. G. Rodríguez. 1998. Curso teórico-práctico de fitoquímica. Especialidad de Botánica. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Texcoco, Estado de México, Mexico. pp: 31-83.
- Stahl. 1969. *Thin Layer chromatography, a Laboratory Handbook*. Springer Verlag, Berlin. 1041 p.
- Tobin, G., y H. G. Muller. 1998. *Nutrición y ciencia de los alimentos*. Primera edición. Editorial Acribia, S.A.
- Van Soest, P.J. 1963. Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. II A rapid Method for the Determination of Fiber and Lignin. *Assoc. Off. Agr. Chem. Jour.* 46:829-835.
- Van Soest, P.J., J.B. Robertson, and B.A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.