

## Evaluación de los principales factores que influyen en la composición fitoquímica de *Morus alba* (Linn.).

### I. Análisis cualitativo de metabolitos secundarios

D.E. García, F. Ojeda e I. Montejó

Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey"  
Central España Republicana, CP 44280, Matanzas, Cuba  
E-mail: DGarcia @indio.atenas.inf.cu

Con el objetivo de detectar la presencia de metabolitos secundarios en cuatro variedades de morera mediante la utilización del tamizaje fitoquímico, se llevó a cabo una investigación en un diseño de bloques al azar con arreglo factorial 4 x 3 x 3 y tres repeticiones. En el conjunto hojas-pecíolos-tallos tiernos se investigaron 15 grupos de compuestos y se detectaron los fenoles, los flavonoides, las cumarinas, los carbohidratos solubles, los esteroides, los alcaloides y las saponinas. Estas funciones químicas estuvieron presentes en las cuatro variedades, las tres edades de la biomasa comestible, los tres niveles de fertilización orgánica y las dos épocas. Las menores variaciones se observaron en los fenoles, los esteroides y los carbohidratos solubles; en cambio, los flavonoides, las cumarinas y los alcaloides presentaron fluctuaciones apreciables. Mediante el análisis de conglomerados se pudo comprobar que la frecuencia de corte fue la variable de mayor influencia. En el período poco lluvioso (PPLL) la agrupación por la edad de rebrote fue más marcada que en el período lluvioso (PLL), a excepción de los 60 días. Los porcentajes de miembros de cada conglomerado agrupados en la frecuencia más poblada fueron de 57, 78 y 85 % en el PPLL, y de 67, 62 y 80 % en el PLL.

**Palabras clave:** Antimetabolitos, *Morus alba*

With the objective of detecting the presence of secondary metabolites in four mulberry varieties through the use of phytochemical sieving, a research was carried out in a randomized block design with a 4 x 3 x 3 factorial arrangement and three repetitions. In the leaves-petioles-fresh stems set 15 compound groups were investigated and phenols, flavonoids, coumarins, soluble carbohydrates, sterols, alkaloids and saponins were detected. These chemical functions were present in the four varieties, the three ages of edible biomass, the three organic fertilization rates and the two seasons. The lowest variations were observed in phenols, steroids and soluble carbohydrates; however, flavonoids, coumarins and alkaloids showed noticeable fluctuations. Through the conglomerate analysis cutting frequency was proved to be the variable of higher influence. In the dry season (DS) the grouping by regrowth age was more remarkable than in the rainy season (RS), with the exception of the 60 days. The percentages of members of each conglomerate grouped in the most populated frequency were 57, 78 and 85 % in the DS, and 67, 62 and 80 % in the RS.

**Key words:** Antimetabolites, *Morus alba*

La ganadería cubana está precisada a producir alimento durante todo el año con la menor cantidad de recursos externos. Teniendo en cuenta que los pastos por sí solos no cubren los requerimientos nutricionales de los rumiantes para una adecuada producción de leche y carne, los árboles son una buena fuente alternativa para su utilización como alimento suplementario. Estos se caracterizan por presentar elevados contenidos de proteína y una alta digestibilidad comparada con la de los pastos (Simón, Hernández y Ojeda, 1998; Simón, 1998).

No obstante, la mayoría de estas plantas contienen elevados niveles de metabolitos secundarios, compuestos que bajo determinadas circunstancias pueden causar efectos diversos y hasta contrastantes en la fisiología animal (Ojeda, 1996).

Existen muchas especies de árboles y arbustos con buenas características forrajeras; en este sentido, la especie *Morus alba* sobresale como fuente de forraje en Cuba por su excelente capacidad de producción de biomasa, composición química (Duke, 2001), alta digestibilidad

(González, Delgado y Cáceres, 1998), adaptabilidad a diversas condiciones de clima y suelo (Datta, 2002), perennidad ante el corte (Martín, Reyes, Hernández y Milera, 2002) y disponibilidad (Benavides, 1994). Su forraje fresco o ensilado se utiliza como suplemento proteico para los rumiantes y puede estimular altos niveles de producción de leche y ganancias de peso (Benavides, 1999). Dadas estas características, esta planta se proyecta como una alternativa alimenticia con alto potencial en el futuro.

El estudio del metabolismo secundario de forma integral, en las principales especies arbóreas utilizadas en la alimentación animal, resulta de vital importancia en aras de realizar un mejor manejo de la biomasa que aportan y un óptimo aprovechamiento de esta fuente de alimento.

Según Duke (2001), las hojas de *M. alba* contienen constituyentes volátiles tales como alcoholes (n-butanol y  $\beta$ - $\gamma$ -hexenol), aldehídos (Metil-etil-acetaldehído, n-butil-aldehído, isobutil-aldehído, valeraldehído, hexaldehído,  $\alpha$ - $\beta$ -hexenal), cetonas alifáticas (acetona, metil-etil-cetona, metil-hexil-cetona), butil-amina y ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico). Además contienen malato de calcio, ácido succínico y tartárico, xantofilas, carotenoides, fitatos (forman el 18 % del fósforo total), isoflavonoides (Quercetina 3-glucósido), bases nitrogenadas (adenina, colina y trigonellina), atrayentes del gusano de seda (Citral, acetato de linalilo, linalol, acetato de terpenilo, hexenol) y terpenoides, los cuales controlan las mordidas que realizan los gusanos a las hojas. La madera contiene Morina (0,3-0,4 % MS), Dihidromorina, Dihidrokaenferol, 2,4,4',6-Tetra-hidroxi-benzofenona, Maclurina y 2 % MS del estilbeno Hidroxi-resveratrol.

El uso principal de la morera a nivel mundial ha sido como alimento del gusano de seda; de ahí que la mayoría de las investigaciones realizadas en esta planta hayan sido orientadas a su producción en la sericultura.

A partir de la década de los ochenta en América Central comenzó a evaluarse su potencial

forrajero y se recomendó su uso en los sistemas de corte y acarreo para los ovinos, los caprinos y los bovinos, así como en la alimentación de los monogástricos. No obstante, en la actualidad se carece de estudios encaminados a la dilucidación de su metabolismo secundario.

Si bien la composición química de esta planta ha sido ampliamente estudiada, se conoce muy poco sobre los metabolitos secundarios presentes en la parte comestible, sus concentraciones, la repercusión nutricional, así como el efecto de los principales factores que influyen en sus variaciones.

El objetivo de este trabajo fue detectar los principales metabolitos secundarios presentes en la fracción comestible de cuatro variedades de *M. alba*, así como la influencia de los principales factores.

### Materiales y Métodos

El experimento se llevó a cabo en la Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey", situada a los 22° 48' 7" de latitud Norte y 81° 2' de longitud Oeste, a 19 msnm, en el municipio de Perico, provincia de Matanzas, Cuba.

Los muestreos se realizaron en dos períodos correspondientes al año 2002; enmarcados entre los meses de enero, febrero, marzo, abril y mayo como PPLL; y mayo, junio, julio, agosto y septiembre como PLL.

**Características del suelo.** El suelo donde se llevó a cabo la investigación presenta una topografía plana y se clasifica como Ferralítico Rojo lixiviado (Hernández y col., 1999).

**Diseño experimental y tratamientos.** Se utilizó un diseño de bloques al azar con arreglo factorial 4 x 3 x 3 y tres repeticiones, lo que hizo un total de 36 tratamientos/bloque.

Los factores estudiados fueron:

- Fertilización orgánica equivalente a: 100, 300 y 500 kg de N/ha/año y un tratamiento control (sin fertilización)
- Frecuencia de corte (60, 90 y 120 días)
- Variedad: Cubana (C), Indonesia (I), Tigriada (T) y Acorazonada (A)

### **Unidad experimental y manejo agronómico**

Las mediciones se realizaron en el tercer año de evaluación agronómica de una plantación de morera de 4 años de edad y densidad de 25 000 plantas/ha. El área experimental abarcó 108 parcelas de 7 x 3 m, sin separación entre ellas. Cada parcela estuvo integrada por 64 plantas, separadas a 0,4 m y 1 m entre los surcos orientados de este a oeste.

El corte de cada planta se realizó de manera manual con tijera de poda, a la altura fija de 0,5 m sobre el nivel del suelo.

La fertilización orgánica (gallinaza) se aplicó directamente en el tronco de cada planta y el control de malezas se realizó de forma manual, ambos después de cada corte.

Los cortes correspondientes a las frecuencias de 60, 90 y 120 días para cada período muestreado, se realizaron de forma tal que su distribución fuera equitativa en cada etapa, para lograr que se reflejara de forma directa el efecto de las condiciones ambientales en todo el proceso de evaluación.

### **Prueba exploratoria**

Con el objetivo de conocer si los grupos de metabolitos secundarios en *M. alba* se encontraban presentes de manera común en las dos partes de la planta, se realizó un análisis cualitativo inicial de manera independiente al conjunto hojas-pecíolos y a los tallos tiernos, donde se pudo observar que ambas partes presentaban los mismos grupos de compuestos secundarios.

### **Procedimiento de muestreo**

El material vegetal formado por la fracción comestible de *M. alba* (hojas-pecíolos-tallos tiernos) fue recolectado de forma manual a partir de 10 plantas por parcela seleccionadas al azar, luego de ser eliminado el efecto de borde de las unidades experimentales.

Las muestras provenientes de cada réplica se llevaron de forma inmediata al laboratorio, se pesaron 5 g, se trituraron hasta tamaño homogéneo y, finalmente, fueron maceradas con 50 mL de etanol al 98 % durante 48 horas.

### **Pesquisaje fitoquímico**

A los extractos alcohólicos provenientes de los diferentes tratamientos se les aplicó el tamizaje fitoquímico propuesto por Rondina y Cassio, descrito por Alfonso, Fernández, González y Avilés (2000); los análisis se realizaron por triplicado.

Las pruebas cualitativas para la detección de cumarinas se hicieron a partir de modificaciones realizadas al extracto crudo. La solución alcohólica fue tratada previamente con  $\text{Pb}(\text{AcO})_2$  al 4 %, el que contenía 0,5 % de  $\text{AcOH}$  con el objetivo de eliminar las clorofilas, para después centrifugar por 10 minutos a 2 500 repeticiones por minuto, filtrar con papel y realizar una extracción con dos porciones de 20 mL de  $\text{CHCl}_3$  al filtrado. Del extracto clorofórmico, se evaporaron 2 mL de la solución en una placa de porcelana y se le adicionó 1 mL del reactivo de Baljet.

### **Metabolitos investigados**

Se investigaron un total de 15 grupos de metabolitos, estos fueron: los fenoles, los taninos, los grupos  $\alpha$ -aminos, los triterpenos y los esteroides, las fitoquinonas, los flavonoides, las proantocianidinas y las catequinas, los carbohidratos reductores solubles, los cardenólidos, las saponinas, las cumarinas, los alcaloides y los cianógenos.

Para la descripción de los ensayos se utilizó el sistema de cruces para especificar la presencia o ausencia de los metabolitos en los tratamientos. En todos los análisis se siguieron los criterios que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Criterios seguidos en las detecciones cualitativas para el pesquisaje fitoquímico.

Criterio	Nomenclatura
Presencia cuantiosa	+++
Presencia notable	++
Presencia leve	+
Ausencia	-

En el caso del ensayo empleado para la detección de saponinas se partió del criterio si-

guiente: contenido abundante = altura de la espuma >14 mm; contenido moderado entre 10-14 mm y contenido bajo <10 mm.

Previamente para el control de los reactivos se utilizaron soluciones de compuestos patrones (tabla 2).

Tabla 2. Soluciones utilizadas para el control de los reactivos.

Metabolito	Ensayo	Soluciones Control
Fenoles	FeCl <sub>3</sub> 1-10 %	Fenol 1 %
Taninos	Gelatina 1 %	Ácido tánico 1 %
Grupos alfa-aminos	Ninhidrina 0,2 %	L- Ácido aspártico 1 %
Triterpenos/Esteroides	Lieberman-Burchard	Colesterol 2 %
Fitoquinonas	Borntrager	Quinol 2 %
Flavonoides	Shinoda	Quercetina 2 %
Proantocianidinas/Catequinas	Roseheim Fehling	D(+) Catequina 1 %
Carbohidratos reductores	Benedict	D(+) Glucosa 5 %
Cardenólidos	Kedde	Digitalis 2 % (masa/volumen)
Saponinas	Prueba de espuma	*
Cianógenos	Guignard	*
Cumarinas	Baljet	Cumarina 2 %
Alcaloides	Wagner, Hager, Dragendorff	Gramina 2 % Efedrina 2 %

\* No utilizadas

Los datos obtenidos a partir de los ensayos cualitativos se llevaron a una escala numérica (1-ausencia y 2, 3, 4-presencia) y el análisis de conglomerados se realizó mediante el método de Ward, utilizando la distancia euclidiana como criterio de diferencia entre los casos.

### Resultados y discusión

La biomasa proveniente de *M. alba*, que serviría como material vegetal de partida para los análisis de los experimentos que forman esta investigación, fue nula para los tratamientos donde no se fertilizó (parcelas control), como producto de que ninguna de las variedades aportó cantidades considerables de hojas ni de tallos tiernos para poder ser incluidos en los resultados; este comportamiento fue común para los dos períodos evaluados, así como para las tres frecuencias de defoliación empleadas.

La necesidad que tiene la morera de ser fertilizada es un consenso generalizado, al cual han arribado los principales autores que investigan sobre este tópico en diferentes partes del mun-

do, como Costa Rica (Benavides, 2002), Japón (Machii, 2002) y Cuba (Martín *et al.*, 2002).

Mediante el empleo del tamizaje fitoquímico, de los 15 grupos de metabolitos investigados en el conjunto hojas-pecíolos-tallos tiernos, se detectaron los fenoles, los flavonoides, las

cumarinas, los carbohidratos solubles, los esteroides, los alcaloides y las saponinas; estos aparecieron en todas las variedades, por lo que la presencia de los mismos compuestos en cada caso es una de las evidencias de la marcada componente genética del metabolismo secundario en el género *Morus*.

### Fenoles

Las tablas 3 y 4 muestran el comportamiento de los compuestos fenólicos desde el punto de vista cualitativo mediante la utilización de FeCl<sub>3</sub> al 1%. En ambas épocas estos compuestos se detectaron de forma abundante.

Todos los ensayos se caracterizaron por presentar una coloración negra, la cual es una de las propiedades de los extractos que contienen una amplia diversidad de estructuras hidroxiladas.

No se encontraron diferencias apreciables entre las épocas. En el PLL hubo una mayor variabilidad con respecto al PPLL, aunque fue poco marcada; también se observó una tendencia similar entre las variedades.

Tabla 3. Comportamiento cualitativo de los fenoles en el PPLL.

Variedad	60 días			90 días			120 días		
	100*	300*	500*	100*	300*	500*	100*	300*	500*
Cubana	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Indonesia	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Tigriada	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Acorazonada	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

\* kg N/ha/año

Tabla 4. Comportamiento cualitativo de los fenoles en el PLL.

Variedad	60 días			90 días			120 días		
	100*	300*	500*	100*	300*	500*	100*	300*	500*
Cubana	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Indonesia	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	++
Tigriada	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Acorazonada	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

\* kg N/ha/año

La presencia de fenoles en la especie ha sido reportada por Chunlian, Donsheng y Erjun (1999) y por Domínguez, Telles y Revilla (2001).

Estos tipos de metabolitos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, formando parte de todas las plantas vasculares, y su presencia ha sido detectada en algunas de las principales plantas con interés forrajero en diferentes latitudes, como *Leucaena leucocephala* (Pedraza, García y Pacheco, 1997), *Calliandra calothyrsus* (Salawu, Acamovic, Stewart y Maasdorp, 1997), *Acacia cyanophylla* (Ben Salem, Nefzaoui, Ben Salem y Tisserand, 2000) y en *Macroptilium atropurpureum* y *Lablab purpureus* (Mupangwa, Acamovic, Topps, Ngongoni y Hamudikuwanda, 2000).

### Flavonoides

En las tablas 5 y 6 se presenta el resultado correspondiente al análisis de los flavonoides. Las pruebas cualitativas mostraron una mayor variabilidad entre las variedades y las épocas. Los ensayos oscilaron desde coloraciones rosadas tenues hasta tonos rojos intensos.

Rangos de variabilidades en escalas numéricas han sido encontrados por Mengcheng, Zhishen y Xiangrui (1996) y Zhishen, Jianming y Mengsheng (1996) en *M. alba*. En igual senti-

do, Chuanbu (2000) señala ensayos positivos en el contenido de Rutina y detecciones generales.

Detecciones similares se han realizado en *Gliricidia sepium*, *Albizia lebbek* y leguminosas rastreras (Martínez, Hernández y Guevara, 1996).

### Cumarinas

Las cumarinas presentaron diferencias menos marcadas que los flavonoides (tablas 7 y 8). La coloración naranja desarrollada por el reactivo de Baljet fue común para todos los ensayos realizados, aunque con diversos grados de intensidad, según la concentración inherente a cada tratamiento.

Las cumarinas en *M. alba* han sido detectadas por Domínguez et al. (2001), la Esculetina por Marles y Farnsworth (1995) y la Umbeliferona por Ho-Zoo y Won-Chu (2001). Estos compuestos se han encontrado en *G. sepium* (Ahn, Elliott y Norton, 1997) y en familias de especies templadas tales como Umbelíferas y Rutáceas (Berenbaum, 1991).

### Carbohidratos reductores solubles

Las tablas 9 y 10 muestran el comportamiento de los carbohidratos solubles en ambos períodos; estos intermediarios del metabolismo fue-

Tabla 5. Comportamiento cualitativo de los flavonoides en el PPLL.

Variedad	60 días			90 días			120 días		
	100*	300*	500*	100*	300*	500*	100*	300*	500*
Cubana	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Indonesia	+++	++	+	+++	++	+	+	+++	++
Tigriada	+	+++	+	+++	+++	++	+++	+++	+++
Acorazonada	+++	++	+	+++	++	++	+++	+++	+++

\* kg N/ha/año

Tabla 6. Comportamiento cualitativo de los flavonoides en el PLL.

Variedad	60 días			90 días			120 días		
	100*	300*	500*	100*	300*	500*	100*	300*	500*
Cubana	+	++	++	++	++	++	+++	++	++
Indonesia	++	++	++	++	++	++	+++	+++	++
Tigriada	++	++	++	++	++	++	+++	+++	++
Acorazonada	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++

\* kg N/ha/año

Tabla 7. Comportamiento cualitativo de las cumarinas en el PPLL.

Variedad	60 días			90 días			120 días		
	100*	300*	500*	100*	300*	500*	100*	300*	500*
Cubana	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++
Indonesia	+	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++
Tigriada	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++
Acorazonada	++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++

\* kg N/ha/año

Tabla 8. Comportamiento cualitativo de las cumarinas en el PLL.

Variedad	60 días			90 días			120 días		
	100*	300*	500*	100*	300*	500*	100*	300*	500*
Cubana	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
Indonesia	++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++
Tigriada	++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++
Acorazonada	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

\* kg N/ha/año

ron detectados en forma cuantiosa, de acuerdo con el contenido energético reportado en la especie y la elevada concentración de sacáridos en sus extractos alcohólicos (Fujun, Nakashima y Kimura, 1995; Jun, Rong y Hongzhang, 2000).

En este caso no se encontraron diferencias muy marcadas entre las épocas, las variedades y las frecuencias de defoliación.

### ***Esteroides***

El análisis cualitativo en la detección de triterpenos y esteroides (tablas 11 y 12) reveló una elevada similitud entre los tratamientos. Los esteroides fueron detectados de manera abundante y el ensayo aplicado se caracterizó por una coloración azul verdosa intensa, lo que evidencia la presencia de varios esteroides en el tejido



Tabla 9. Comportamiento cualitativo de los carbohidratos en el PPLL.

Variedad	60 días			90 días			120 días		
	100*	300*	500*	100*	300*	500*	100*	300*	500*
Cubana	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Indonesia	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
Tigriada	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Acorazonada	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

\* kg N/ha/año

Tabla 10. Comportamiento cualitativo de los carbohidratos en el PLL.

Variedad	60 días			90 días			120 días		
	100*	300*	500*	100*	300*	500*	100*	300*	500*
Cubana	+	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
Indonesia	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Tigriada	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
Acorazonada	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++

\* kg N/ha/año

Tabla 11. Comportamiento cualitativo de los esteroides en el PPLL.

Variedad	60 días			90 días			120 días		
	100*	300*	500*	100*	300*	500*	100*	300*	500*
Cubana	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Indonesia	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Tigriada	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Acorazonada	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

\* kg N/ha/año

Tabla 12. Comportamiento cualitativo de los esteroides en el PLL.

Variedad	60 días			90 días			120 días		
	100*	300*	500*	100*	300*	500*	100*	300*	500*
Cubana	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
Indonesia	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Tigriada	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Acorazonada	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++

\* kg N/ha/año

vegetal (Galindo, Rosales, Murgueitio y Larrahondo, 1989).

La presencia de  $\beta$ -Sitosterol y Estigmasterol ha sido señalada por Mengzhao (1989) y trazas de colesterolina por Xiangrui y Hongsheng (2001).

Los resultados generales obtenidos para este grupo de metabolitos en la especie están acordes con lo reportado por Mengzhao (1989).

### Alcaloides

Los alcaloides se investigaron mediante el empleo de tres reactivos de grupo; en las tablas 13 y 14 se observan algunas variaciones en el PPLL cuando se compara con el PLL.

Estos metabolitos, conjuntamente con los flavonoides, expresaron la mayor variabilidad en las pruebas de detección.

Tabla 13. Comportamiento cualitativo de los alcaloides en el PPLL.

Variedad	60 días			90 días			120 días		
	100*	300*	500*	100*	300*	500*	100*	300*	500*
Cubana	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
Indonesia	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++
Tigriada	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Acorazonada	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

\* kg N/ha/año

Tabla 14. Comportamiento cualitativo de los alcaloides en el PLL.

Variedad	60 días			90 días			120 días		
	100*	300*	500*	100*	300*	500*	100*	300*	500*
Cubana	++	++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++
Indonesia	+++	+++	+	++	++	+++	+++	+++	+++
Tigriada	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++
Acorazonada	++	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++

\* kg N/ha/año

La presencia de alcaloides y compuestos aminados en el tejido vegetal de la morera ha sido reportada por Ho-Zoo y Won-Chu (2001).

Los alcaloides se han encontrado en árboles de uso forrajero, especialmente en plantas dicotiledóneas (Ramos, Frutos, Giráldez y Mantecón, 1998), y de forma particular en las leguminosas forrajeras del género *Erythrina* (Sotelo, Soto y Lucas, 1996).

### Saponinas

Todos los extractos ensayados mostraron alturas relativas de la espuma entre 10-14 mm, equivalente a contenidos moderados de estos metabolitos (Galindo *et al.*, 1989).

La prueba no resultó concluyente para poder aseverar la presencia de estos compuestos, ya que el principio del método consiste solamente en la disminución de la tensión superficial del medio, por lo que otros compuestos con propiedades estructurales similares en la planta, como mucílagos y glicósidos esteroidales, pudieron crear falsos positivos al respecto.

Detecciones positivas en *M. alba* han sido realizadas por Domínguez *et al.* (2001), y negativas por Maldonado, Grande, Aranda y Pérez-Gil (2000).

### Metabolitos no detectados

El resto de los compuestos investigados mostraron resultados negativos en todas las tratamientos; el conjunto estuvo formado por: grupos  $\alpha$ -aminos, taninos que precipitan proteínas, proantocianidinas/catequinas, cardenólidos, fitoquinonas y cianógenos.

La no presencia de grupos  $\alpha$ -aminos, proantocianidinas/catequinas y fitoquinonas también ha sido reportada por Domínguez *et al.* (2001).

La ausencia de taninos que precipitan proteínas, corroborada en este experimento y que apoya lo expresado por García, Ojeda y Pérez (2002) con la utilización de gelatina como proteína para inducir la precipitación, coincide con los resultados de pruebas realizadas por Makkar, Singh y Negi (1989) y Makkar y Becker (1998) al emplear BSA como proteína precipitante.

Aunque las pruebas desarrolladas con el reactivo de Roseheim demuestran la inexistencia evidente de taninos condensados, no se puede expresar con certeza absoluta que no exista ningún tipo de tanoide en la especie, en primer lugar por lo controvertida que resulta la definición de estos metabolitos, y teniendo en cuenta



también que en el ensayo de precipitación solo resultan positivos los taninos que presenten un peso molecular considerable, capaces de unirse a la proteína e insolubilizarse (Leinmueller, Steingass y Menke, 1993).

De todos los metabolitos detectados, los fenoles, los esteroides y los carbohidratos solubles presentaron una menor variabilidad con los factores estudiados; en cambio, las cumarinas, los flavonoides y los alcaloides mostraron mayores diferencias entre los tratamientos.

#### **Análisis de agrupación en las pruebas cualitativas**

Para determinar la tendencia de agrupación de los tratamientos dentro de los factores en estudio, se empleó el análisis de conglomerados mediante el método de Ward (Rossi, Pereira y González, 2000; Navarro, 2002).

Las tablas 15 y 16 muestran la agrupación en el PPLL y en el PLL. En ambas épocas se observó un marcado efecto de la frecuencia de corte en comparación con los factores variedad y fertilización; la importancia de la edad de rebrote y su repercusión en el metabolismo secundario ha sido señalada por Brooks y Owen-Smith (1994).

El agrupamiento por edad de rebrote se hizo más marcado en el PPLL, excepto para la frecuencia de 60 días, en comparación con el PLL. En el PPLL el porcentaje de miembros de cada conglomerado, agrupados en la frecuencia más poblada, fue de 57, 78 y 85 % para los conglome-

merados 1, 2 y 3, respectivamente; en cambio, para el PLL fue de 67, 62 y 80 %, respectivamente.

Basado en el análisis de las distancias euclidianas, se pudo comprobar que para el PPLL la frecuencia de 60 días mostró diferencias con respecto a las de 90 y 120 días; este resultado concuerda con las diferencias encontradas por Mochiutti (1995) en las frecuencias de defoliación mayores (50 días), en comparación con las más bajas (75 y 100 días) para algunos metabolitos secundarios en *G. sepium*. En el PLL la frecuencia que mostró características diferentes al resto fue la de 120 días; la tendencia a la diferenciación de las frecuencias mayores, así como la menor repercusión fisiológica de los metabolitos secundarios en la nutrición animal para estas edades de rebrote, ha sido reportada por Steward, Allison y Simons (1996).

#### **Conclusiones**

La especie *M. alba* contiene, tanto en las hojas como en los tallos tiernos, fenoles, flavonoides, cumarinas, carbohidratos solubles, esteroides, alcaloides y saponinas, los cuales estuvieron presentes en los tres niveles de fertilización, las tres frecuencias de corte y las dos épocas. La mayor variabilidad se observó en el caso de los flavonoides, las cumarinas y los alcaloides; mientras que los fenoles, los carbohidratos solubles y los esteroides no pre-

Tabla 15. Agrupación en el análisis cualitativo para el PPLL.

		Conglomerados PPLL											
Frecuencia	Fertilización	1				2				3			
		C	I	T	A	C	I	T	A	C	I	T	A
60	100			X			X		X	X			
	300	X	X		X							X	
	500	X	X	X	X								
90	100					X	X	X	X				
	300					X		X					
	500		X		X	X							
120	100		X	X	X					X		X	X
	300		X							X	X	X	X
	500									X	X	X	X

Tabla 16. Agrupación en el análisis cualitativo para el PLL.

Frecuencia	Fertilización	Conglomerados PPLL											
		1				2				3			
		C	I	T	A	C	I	T	A	C	I	T	A
60	100	X	X	X	X								
	300	X		X			X		X				
	500	X	X	X	X								
90	100					X	X	X	X				
	300					X	X	X	X				
	500	X	X	X	X								
120	100									X	X	X	X
	300					X					X	X	X
	500		X			X		X					X

sentaron diferencias marcadas entre los tratamientos. La edad de rebrote fue la variable de mayor influencia en el metabolismo secundario de las cuatro variedades de *M. alba*.

### Recomendaciones

Emplear técnicas analíticas con vistas a cuantificar los grupos de compuestos detectados en el análisis cualitativo y dilucidar numéricamente, en otras investigaciones, la influencia de cada factor en las concentraciones de los metabolitos secundarios.

### Referencias

- Ahn, J.; Elliott, R. & Norton, B. 1997. Oven drying improves the nutritional value of *Calliandra calothyrsus* and *Gliricidia sepium* as supplements for sheep given low. *Journal of Science and Agriculture*. 75:503
- Alfonso, M.; Fernández, L.; González, N. & Avilés, R. 2000. La Achira (*Canna edulis* Ker.) y su potencialidad en el control de plagas. Ponencia XII Forum de Ciencia y Técnica. INIFAT. Ciudad de La Habana, Cuba. 11 p.
- Benavides, J.E. 1994. La investigación en árboles forrajeros. En: Árboles y arbustos forrajeros en América Central. (Ed. Benavides, J.E). Serie técnica, Informe técnico No. 236. CATIE. Turrialba, Costa Rica. Vol. 1, p. 3
- Benavides, J.E. 1999. Utilización de la morera en los sistemas de producción animal. En: Agroforestería para la producción animal en América Latina. Estudio FAO Producción y Sanidad Animal No. 143. FAO, Roma. p. 279
- Benavides, J.E. 2002. Utilization of mulberry in animal production systems. In: Mulberry for animal production. Animal Production and Health Paper No. 147. FAO, Rome. p. 291
- Ben Salem, H.; Nefzaoui, A.; Ben Salem, L. & Tisserand, J.L. 2000. Deactivation of condensed tannin in feed block. Effect on feed intake, diet digestibility, nitrogen balance, microbial synthesis and growth by sheep. *Livestock Production Science*. 64:51
- Berenbaum, M.R. 1991. Coumarins. In: Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites. Vol. I. The chemical participant. (Eds. Rosenthal, G.A. & Berenbaum, M.R.). p. 221
- Brooks, R. & Owen-Smith, N. 1994. Plant defenses against mammalian herbivores: are juvenile *Aca-cia* more heavily defended than mature trees?. *Bothalia*. 24 (2):211
- Chuanbu, Z. 2000. Determination of flavonol in mulberry leaves and its health drink. *Food Science and Technology*. 2:53
- Chunlian, L.; Donsheng, L. & Erjun, L. 1999. The content polyphenol and anthelmintic material in different mulberry leaves. *Journal of Anhui Agriculture Science*. 27 (4):356
- Datta, R.K. 2002. Mulberry cultivation and utilization in India. In: Mulberry for animal production. Animal Production and Health Paper No. 147. FAO, Rome. p. 45
- Domínguez, A.; Telles, Enidia & Revilla, J. 2001. Comportamiento inicial de dos especies de morera en fase de establecimiento. *Pastos y Forrajes*. 24 (2):147
- Duke, J.A. 2001. *Morus alba* (L.). [en línea]. Disponible en: <http://newcrop.hort.purdue.edu/newcrop/duke-energy> [Consulta: Diciembre 2001].

- Fujun, C.; Nakashima, N. & Kimura, I. 1995. Potentiating effect on pilocarpine-induced saliva secretion, by extracts and N-containing sugars derived from mulberry leaves, in streptozocin-diabetic mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 18 (12):1676
- Galindo, W.; Rosales, M.; Murgueitio, E. & Larrahondo, J. 1989. Sustancias antinutricionales en las hojas de árboles forrajeros. *Livestock Research for Rural Development*. 1 (1):36
- García, D.E.; Ojeda, F. & Pérez, Guadalupe. 2002. Comportamiento fitoquímico de cuatro variedades de *Morus alba* en suelo Ferralítico Rojo con fertilización. [cd-rom]. En: Memorias V Taller Internacional Silvopastoril "Los árboles y arbustos en la ganadería tropical" y II Reunión Regional de Morera. EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba
- González, E.; Delgado, Denia & Cáceres, O. 1998. Rendimiento, calidad y degradabilidad ruminal potencial de los principales nutrientes en el forraje de morera (*Morus alba*). En: Memorias III Taller Internacional Silvopastoril "Los árboles y arbustos en la ganadería". EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba. p. 69-72
- Hernández, A. & col. 1999. Clasificación genética de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos. Ministerio de la Agricultura. AGRINFOR. Ciudad de La Habana, Cuba. 64 p.
- Ho-Zoo, L & Won-Chu, L. 2001. Utilization of mulberry leaf as animal feed: feasibility in Korea. In: Mulberry for animal feeding in China. (Eds. Jian, L.; Yuyin, C.; Sánchez, M. & Xingmeng, L.). Hangzhou, China. 75 p.
- Jun, Z.; Rong, Z. & Hongzhang, W. 2000. Technique selection for preparing the total polysaccharide of mulberry. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*. 31 (5):347
- Leinmueller, E.; Steingass, H. & Menke, K.H. 1993. Tannins in ruminant feedstuffs. In: Animal Research and Development Vol. 33. Institute for Scientific Cooperation, Germany. 350 p.
- Machii, H. 2002. Evaluation and utilization of mulberry for poultry production in Japan. In: Mulberry for animal production. Animal Production and Health Paper No. 147. FAO, Rome. p. 237
- Makkar, H.P.S. & Becker, K. 1998. Do tannins in leaves of trees and shrubs from Africa and Himalayan regions differ in level and activity?. *Agroforestry*. 40 (1):59
- Makkar, H.P.S.; Singh, B. & Negi, S.S. 1989. Relationship of rumen degradability with microbial colonization, cell wall constituents and tannin levels in some tree leaves. *Animal Production*. 49:299
- Maldonado, M.; Grande, D.; Aranda, E. & Pérez-Gil, F. 2000. Evaluación de árboles forrajeros tropicales para la alimentación de rumiantes en Tabasco, México. En: Memorias IV Taller Internacional "Los árboles y arbustos en la ganadería tropical". EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba. p. 135
- Marles, R.J. & Farnsworth, N.R. 1995. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*. 2 (2):137
- Martín, G.; Reyes, F.; Hernández, I. & Milera, Milagros. 2002. Agronomic studies with mulberry in Cuba. In: Mulberry for animal production. Animal Production and Health Paper No. 147. FAO, Rome. p. 103
- Martínez, S.J.; Hernández, Yaumara & Guevara, R. 1996. Determinación cuantitativa de algunos factores antinutritivos en cinco leguminosas tropicales. En: Resúmenes. Taller Internacional "Los árboles en los sistemas de producción ganadera". EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba. p. 27
- Mengcheng, T.; Zhishen, J. & Xiangrui, Z. 1996. Study on flavonoid content in mulberry leaves. *Journal of Zhejiang Agricultural University*. 22 (4):394
- Mengzhao, Y. 1989. Determination of sterol plant growing substance in mulberry leaves. *Journal of Zhejiang Agricultural University*. 15 (4):335
- Mochiutti, S. 1995. Comportamiento agronómico y calidad nutritiva de *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp. bajo defoliación manual y pastoreo en el trópico húmedo. Tesis Mag. Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 144 p.
- Mupangwa, J.F.; Acamovic, T.; Topps, I.; Ngongoni, N.T. & Hamudikuwanda, H. 2000. Content of soluble and bound condensed tannins of three tropical herbaceous forage legumes. *Animal Feed Science and Technology*. 83:139-144
- Navarro, Marlén. 2002. Evaluación del vigor de la semilla de *Albizia lebbek* (A. Benth.) durante la emergencia de plántula. Tesis presentada en opción al título académico de Máster en Pastos y Forrajes. EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba. 89 p.
- Ojeda, F. 1996. Factores antinutricionales presentes en los árboles forrajeros. Conferencia. Diplomado en Silvopastoreo. EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba

- Pedraza, R.M.; García, A. & Pacheco, R. 1997. Nutrientes y factores antinutritivos en el follaje de *Leucaena leucocephala* cv. Perú a diferentes edades de rebrote. *Pastos y Forrajes*. 20:187
- Ramos, G.; Frutos, P.; Giráldez, F.J. & Mantecón, A.R. 1998. Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los herbívoros. *Arch. Zootec.* 47 (180):597
- Rossi, C.A.; Pereira, A.M. & González, G.L. 2000. Determinación de factores antinutricionales en leñosas forrajeras del Chaco árido argentino. Memorias IV Taller Internacional "Los árboles y arbustos en la ganadería tropical". EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba. Tomo I, p. 71
- Salawu, M.B.; Acamovic, T.; Stewart, C.S. & Maasdorp, B. 1997. Assesment of the nutritive value of *Calliandra calothyrsus*. Its chemical composition and the influence of tannins, picecolic acid and polyethyleneglycol on *in vitro* organic matter digestibility. *Anim. Feed Sci. Technol.* 69:219
- Simón, L. 1998. Del monocultivo de pastos al silvopastoreo: la experiencia de la EEPF "Indio Hatuey". En: Los árboles en la ganadería. Tomo I. Silvopastoreo. (Ed. L. Simón). EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba. p. 9
- Simón, L.; Cáceres, O.; Santana, H.; Hernández, I.; Iglesias, J.; Duquesne, P. Delgado, R. & Docazal, G. 1992. Resultados obtenidos en la alimentación de bovinos y ovinos con *Albizia lebbbeck* Benth. VI Encuentro Técnico de la Filial Territorial de ACPA. Matanzas, Cuba. (Mimeo)
- Simón, L.; Hernández, I. & Ojeda, F. 1998. Protagonismo de los árboles en los sistemas silvopastoriles. En: Los árboles en la ganadería. Tomo I. Silvopastoreo. (Ed. L. Simón). EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba. p. 28
- Sotelo, Ángela; Soto, M. & Lucas, B. 1996. Comparative studies of the alkaloids composition of two Mexican *Erythrina* species and nutritive value of the detoxified seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41:2340
- Steward, J.L.; Allison, G.E. & Simons, A.J. 1996. *Gliricidia sepium*. Genetic resources for farmers. Oxford Forestry Institute. Oxford, UK. 125 p.
- Xiangrui, Z. & Hongsheng, L. 2001. Composition and medical value of mulberry leaves. In: Mulberry for animal feeding in China. (Eds. Jian, L.; Yuyin, C.; Sánchez, M. & Xingmeng, L.). Hangzhou, China. 75 p.
- Zhishen, J.; Jianming, W. & Mengsheng, T. 1996. Determination of Rutin and Quercetin from mulberry leaves extract by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Chinese Journal of Chromatography*. 14 (6):489-491

Recibido el 9 de septiembre del 2003

Aceptado el 9 de octubre del 2003