



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS
MÉRIDA- VENEZUELA



**POTENCIAL NUTRICIONAL DE *Leucaena leucocephala* (Lam.) DE
Wit (FABACEAE) DE ACUERDO A SU COMPOSICIÓN QUÍMICA Y
ESTUDIO DE LA ECOTOXICIDAD SOBRE *Artemia salina***

www.bdigital.ula.ve

Autora:

Br. Annelsy Molina

C.I: V-25.468.965

Tutor:

Dr. Tomas Visbal

Mérida, diciembre de 2022



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS
MÉRIDA- VENEZUELA



POTENCIAL NUTRICIONAL DE *Leucaena leucocephala* (Lam.) DE Wit
(FABACEAE) DE ACUERDO A SU COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ESTUDIO DE
LA ECOTOXICIDAD SOBRE *Artemia salina*

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de

Licenciada en Bioanálisis

Autora:

Br. Annelsy Molina

C.I: V-25.468.965

Tutor:

Dr. Tomas Visbal

Mérida, diciembre de 2022

DEDICATORIA

Primeramente, a Dios, por permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi vida. Gracias a Él que me regala entendimiento y fortaleza para seguir con mis metas.

Mi mamá Elsy Azuaje, por todo el esfuerzo, dedicación, sacrificio, el apoyo incondicional, en este largo camino y gracias por estar siempre presente en cada logro.

Mi papá Antonio Ramón Molina, por su apoyo incondicional, sacrificio y por siempre estar a mi lado.

Mi abuela Isidra, que desde el cielo me sigues acompañando en este gran logro.

Gracias a ustedes por tanto esfuerzo que han hecho hacia mí, los amo.

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

A Dios, primeramente, por guiarme y acompañarme a lo largo de mi carrera universitaria, por darme salud, sabiduría y por ponerme en este camino personas increíbles que hicieron que todo fuese posible.

A la Ilustre Universidad de Los Andes, en especial la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por permitirme formarme académicamente, donde conocí excelentes profesores y compañeros.

Al Departamento de Ciencia de Los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis por haberme permitido realizar este trabajo de investigación en sus instalaciones y culminar mi parte experimental.

A mi Tutor el profesor Tomas Visbal, le agradezco por aceptarme ser su tesista, por su paciencia, dedicación, compromiso, por sus conocimientos, enseñanzas y orientación durante todo el desarrollo de este trabajo de investigación.

A la profesora Marielba Morillo, por su ayuda, colaboración, compromiso, asesoramiento, y sus conocimientos los cuales han sido de gran importancia para la realización de esta investigación.

A la profesora Rosa Alba Vielma, por su atención, apoyo, colaboración y compromiso al presente trabajo de investigación.

A la profesora Bertha Santiago por su apoyo, compromiso y sugerencias necesarias para la realización de este trabajo de investigación.

A los profesores de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, gracias por cada enseñanza, por compartir sus conocimientos, dedicación y cariño, sin ustedes no hubiese podido lograr lo que hoy tengo por conocimiento.

A mamá y papá, gracias primeramente por darme la vida y por darme educación, por siempre contar con su apoyo en todo momento y quienes han creído en mí siempre. Son el mejor ejemplo a seguir y el pilar fundamental para poderlo lograr.

Agradezco a todos mis compañeros Ulandinos, especialmente a mis amigas que siempre me han brindado su apoyo, cariño y una mano amiga.

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
RESUMEN	xii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: EL PROBLEMA	3
Planteamiento del problema	3
Justificación e importancia de la investigación	5
Objetivos de la investigación	6
<i>Objetivo general</i>	6
<i>Objetivos específicos</i>	6
Alcances y limitaciones de la investigación	6
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	8
Trabajos previos	8
Antecedentes históricos o epistemológicos del género <i>Leucaena</i>	11
Bases teóricas	12
Familia Fabaceae	12
<i>Descripción botánica de la familia Fabaceae</i>	12
<i>Taxonomía de la familia Fabaceae</i>	13
<i>Distribución de la familia Fabaceae</i>	13
<i>Usos de la familia Fabaceae</i>	13
Genero <i>Leucaena</i>	14
<i>Descripción botánica del género Leucaena</i>	14
<i>Taxonomía del género Leucaena</i>	14
<i>Distribución del género Leucaena</i>	14
<i>Usos del género Leucaena</i>	14
Especie <i>Leucaena leucocephala</i>	15
<i>Descripción botánica de Leucaena leucocephala</i>	15

<i>Taxonomía de Leucaena leucocephala</i>	15
<i>Distribución de Leucaena leucocephala</i>	16
<i>Usos de Leucaena leucocephala</i>	16
<i>Composición química de Leucaena leucocephala</i>	16
Metabolitos primarios	18
Determinación de metabolitos Primarios	18
<i>Análisis proximal</i>	18
<i>Determinación del contenido de humedad</i>	18
<i>Determinación de cenizas totales</i>	18
<i>Determinación del contenido de grasas</i>	18
<i>Determinación del contenido de proteínas (Método de micro Kjehdal)</i>	19
<i>Determinación del contenido de extractos no nitrogenados</i>	19
Productos naturales o metabolitos secundarios	19
Clasificación de los productos naturales o metabolitos secundarios	19
<i>Terpenos</i>	19
<i>Saponinas</i>	20
<i>Fenoles</i>	21
<i>Flavonoides</i>	22
<i>Taninos</i>	22
<i>Quinonas</i>	23
<i>Alcaloides</i>	23
<i>Extractos Vegetales</i>	24
Obtención de los extractos vegetales	24
<i>Maceración</i>	24
<i>Extracción continua (Método de Soxhlet).</i>	24
<i>Percolación</i>	25
<i>Decocción</i>	25
<i>Infusión</i>	25
<i>Digestión</i>	25
Determinación de metabolitos secundarios	25
<i>Tamizaje Fitoquímico</i>	25

<i>Ensayo de Wagner</i>	25
<i>Ensayo de Dragendorff</i>	26
<i>Ensayo de Borntrager</i>	26
<i>Ensayo de la Espuma</i>	26
<i>Ensayo de Shinoda</i>	26
<i>Ensayo de Liebermann-Burchard</i>	26
<i>Ensayo de Baljet</i>	26
<i>Ensayo de la gelatina</i>	26
<i>Ensayo de FeCl₃</i>	27
Toxicidad	27
Toxicidad del género <i>Leucaena</i>	27
Determinación de toxicidad sobre <i>Artemia salina</i>	28
Definición operacional de términos	29
<i>Macronutrientes</i>	29
<i>Micronutrientes</i>	29
<i>Metabolito</i>	30
<i>Extractos</i>	30
<i>Forraje</i>	30
<i>Toxicidad</i>	30
<i>Mortalidad</i>	30
<i>Letalidad</i>	30
<i>Dosis letal 50</i>	30
Operacionalización de las variables	30
Hipótesis	31
<i>Hipótesis alternativa (HA)</i>	31
<i>Hipótesis nula (H0)</i>	31
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO	33
Tipo de investigación	33
Diseño de investigación	33
Población y muestra	33
<i>Unidad de investigación</i>	33

<i>Selección del tamaño de la muestra</i>	33
Sistema de variables	34
Instrumento de recolección de datos	34
Procedimiento de la investigación	34
<i>Recolección y preparación del material vegetal</i>	34
<i>Análisis proximal de la Leucaena leucocephala</i>	36
<i>Análisis fitoquímico de Leucaena leucocephala</i>	41
<i>Evaluación de la toxicidad sobre nauplios de Artemia salina</i>	43
Diseño de análisis	48
Variables estadísticas	48
Sistematización de los resultados	48
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES	50
Análisis proximal de la harina de <i>Leucaena leucocephala</i>	50
Determinación del % de rendimiento de los extractos etanólico, diclorometano y hexanoico de la <i>Leucaena leucocephala</i>	51
Estudio fitoquímico de extractos de las partes aéreas de <i>Leucaena leucocephala</i>	52
Toxicidad del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>Leucaena leucocephala</i> frente a <i>Artemia salina</i>	55
Análisis Probit de la determinación de la toxicidad del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>Leucaena leucocephala</i> frente a <i>Artemia salina</i>	56
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	58
Conclusiones	58
Recomendaciones	59
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº		Pág.
1	Hojas, frutos y flores de <i>Leucaena leucocephala</i>	15
2	Estructura química de los terpenos	20
3	Estructura química de los saponinas	21
4	Estructura química de las fenoles	21
5	Estructura química de los flavonoides	22
6	Estructura química de las taninos	22
7	Estructura química de los quinonas	23
8	Estructura química de los alcaloides	23
9	Estructura de la mimosina	28
10	Artrópodo de <i>Artemia salina</i>	28
11	Planta <i>Leucaena leucocephala</i>	35
12	Váucher de la muestra de <i>Leucaena leucocephala</i> , depositada en el Herbario MERF	35
13	Material vegetal recolectado	36
14	Secado del material vegetal	36
15	Enfriamiento de la muestra en desecador	37
16	Quema de la muestra	38
17	Digestión de proteínas	39
18	Destilación y titulación	40
19	Determinación de grasas	41
20	Preparación de los extractos de las partes aéreas de <i>Leucaena leucocephala</i>	42
21	Protocolo para la determinación de ecotoxicidad en <i>Artemia salina</i>	44
22	Preparación del agua de mar artificial	45
23	Eclosión de los quistes de <i>Artemia salina</i>	46
24	Preparación de las placas de microtitulación	47
25	Contaje de letalidad de nauplios de <i>Artemia salina</i>	47
26	Resultados obtenidos en el análisis fitoquímico preliminar	53

ÍNDICE DE TABLAS

N°		Pág.
1	Composición química proximal de la harina de guaje en base húmeda	9
2	Composición química (%) de diferentes partes de <i>Leucaena leucocephala</i> (% de materia seca)	17
3	Contenidos (%) de proteína de diversas partes de la planta <i>Leucaena leucocephala</i>	17
4	Operacionalización de la variable dependiente e independiente	32
5	Preparación del agua de mar artificial, usada en el cultivo y eclosión de los quistes del crustáceo <i>Artemia salina</i>	45
6	Clasificación de toxicidad según CYTED	48
7	Variables estadísticas según la naturaleza, escala de medida e indicadores estadísticos	49
8	Composición química proximal de la harina de <i>Leucaena leucocephala</i>	50
9	Resultados obtenidos del porcentaje de rendimiento	52
10	Estudio fitoquímico de los extractos de las partes aéreas de <i>Leucaena leucocephala</i>	52
11	Cuantificación de la DL ₅₀ de los extractos etanólicos de las partes aéreas de <i>L. leucocephala</i> y los controles sobre <i>Artemia salina</i>	55
12	Información de convergencia	56
13	Estimación de parámetro	57
14	Covarianzas y correlaciones de estimaciones de parámetro	5
15	Pruebas de chi-cuadrado	5



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS
MÉRIDA- VENEZUELA



POTENCIAL NUTRICIONAL DE *Leucaena leucocephala* (Lam.) DE Wit
(FABACEAE) DE ACUERDO A SU COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ESTUDIO DE
LA ECOTOXICIDAD SOBRE *Artemia salina*

Autora: Br. Annelsy Molina

Tutor: Dr. Tomas Visbal

Resumen

Leucaena leucocephala (Lam.) de Wit (Fabaceae), es una planta arbustiva que posee un alto contenido de proteínas, carbohidratos, fibra cruda, lípidos y minerales, así como también metabolitos secundarios, lo que le confiere un gran valor nutricional. Aunque, también posee algunos componentes que suelen generar efectos tóxicos para quienes la consumen en altas concentraciones. El objetivo de la presente investigación fue determinar la composición química de esta especie y la actividad ecotóxica del extracto etanólico de la misma sobre *Artemia salina*. Los resultados revelaron que la harina de *L. leucocephala* tenía alto contenido de carbohidratos (66,7 %) y proteínas (24,33 %), con menor porcentaje de cenizas, humedad y lípidos. En cuanto al análisis fitoquímico de las partes aéreas de la planta, en el extracto hexanólico se identificó solamente esteroides. En el extracto diclorometanico y etanólico se identificaron esteroides, terpenos, polifenoles y saponinas, además de alta concentración de alcaloides y flavonoides únicamente para el extracto etanólico. Con respecto a la toxicidad, se obtuvo que la DL_{50} del extracto etanólico de las partes aéreas de *L. leucocephala* fue moderadamente tóxica frente a *Artemia salina*.

Palabras Clave: *Leucaena leucocephala*, potencial nutricional, fitoquímico, ecotóxica y *Artemia salina*.

INTRODUCCIÓN

Actualmente un tercio de la población mundial enfrenta problemas de seguridad alimentaria. En respuesta a ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) han impulsado la investigación en torno a nuevas fuentes de alimentación nutricional (García, 2019). De hecho, entre las principales especies vegetales que se usan como fuente alimentaria, se encuentran las plantas pertenecientes a la familia Leguminosae. En la actualidad las leguminosas son uno de los alimentos de origen vegetal de mayor consumo en dietas de los países en vías de desarrollo (Astiasaran y Martínez, 2000); ya que constituye aproximadamente 730 géneros y unas 19.400 especies, lo que la convierte en la tercera familia con mayor riqueza de especies (Cabañas, Luz, Lamothe y Domínguez, 2005).

En los países latinoamericanos el género *Leucaena* son las más utilizadas para la alimentación de los rumiantes en las áreas de pastoreo, los bancos de proteínas y los sistemas de corte y acarreo, debido fundamentalmente a su rápida adaptación a condiciones contrastantes de clima y suelo, sobresaliente composición nutricional, además de presentar buena persistencia al pastoreo (Solorio y Solorio, 2008).

No obstante, en algunos países, las puntas de las vainas más las hojas tiernas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, se usan comúnmente como vegetales comestibles y contornos de varios alimentos picantes, sean frescas o hervidas (Burawar y cols., 2016). Además, se ha utilizado con múltiples propiedades, por lo que se conoce como una planta milagrosa. Las puntas de las vainas *L. leucocephala* se han utilizado tradicionalmente para aliviar la diarrea. Las semillas de esta planta tienen propiedades medicinales de amplio espectro que incluyen actividades antiproliferativas, quimioprotectoras contra el cáncer, antihelmínticas, antidiabéticas, para controlar el dolor de estómago y antibacterianas (Syamsudin, 2010). Asimismo, tanto las hojas jóvenes como las maduras se utilizan como alimento para animales, dietas para peces y aves, porque tienen un alto contenido nutritivo como proteínas crudas, grasas, carbohidratos y constituyentes químicos importantes (Orwa y cols., 2009).

Por el contrario, es muy conocido que esta planta es tóxica para los animales de ganado (Anderson et al., 2001) y se utiliza como agente anti-fertilizante en la medicina tradicional. Los animales domésticos o salvajes que consumen las hojas frescas de *L. leucocephala* en grandes cantidades presentan problemas de infertilidad y eventualmente mueren (Bhatia y cols., 2014). En efecto, se ha reportado que todas las partes de esta leguminosa contienen mimosina, una toxina natural a la cual se le atribuye su toxicidad. Sin embargo, este último componente ha demostrado tener actividades anticancerígenas, proliferativa e intervención en la división y diferenciación celular (Burawar y cols., 2016).

Recientemente, aunque su consumo ha aumentado, nunca antes se había documentado la ecotoxicidad en *Artemia salina*. Por lo tanto, este estudio intentó confirmar el potencial nutricional de la especie *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (Fabaceae), su composición fitoquímica y la toxicidad de los extractos etanólicos de sus partes aéreas en dicho crustáceo.

Por consiguiente, fue necesario sistematizar este proyecto de investigación según la normativa metodológica de la American Psychological Association (APA por sus siglas en inglés) según el siguiente formato: Capítulo I, denominado el problema, formado por los subtítulos: Planteamiento del Problema; Justificación de la Investigación; Objetivos de la Investigación; Alcances y Limitaciones del proyecto. Capítulo II, llamado Marco Teórico, donde se describen los Trabajos Previos; Antecedentes Históricos; Bases Teóricas, Definición de Términos, Operacionalización de las Variables e Hipótesis. Capítulo III, titulado Marco Metodológico, consta de los siguientes subtítulos: Tipo de Investigación, Diseño de la Investigación, Sistema de Variables, Instrumento de Recolección de Datos, Procedimientos o Metodología de la Investigación y Diseño de Análisis. Capítulo IV, donde se presentan los Resultados y las discusiones de la investigación. Finalmente, el Capítulo V, en el cual se puntualizan las Conclusiones y se sugieren determinadas Recomendaciones.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

El potencial nutricional es la contribución de un alimento basada en sus componentes esenciales (proteínas, lípidos, hidratos de carbono, minerales y vitaminas, entre otros) que son aportados al contenido de la dieta, dicha contribución depende del proceso de digestión y absorción del consumidor. Para aquellos nutrientes de origen vegetal existen otros factores influyentes sobre la composición química, los cuales intervienen directamente sobre su valor nutricional tales como el potencial genético de la planta, la estación de producción, climatología, características de la tierra de cultivo, fertilización y el almacenamiento (Hernández y Sastre, 1999).

Dentro de las familias botánicas con mayor potencial nutricional las Fabaceae (Leguminosae), constituyen una fuente importante de carbohidratos y proteína, mostrando un contenido elevado de fibra. Por el contrario, baja concentración de lípidos, a su vez niveles fisiológicamente relevantes en algunos minerales como calcio, hierro y magnesio, también aportan vitaminas del complejo B y ácido fólico (Perozo, 2013).

En el ámbito de la química se conoce como, composición química a todas las sustancias que forman parte de una muestra, también incluye sus respectivas concentraciones (Ucha, 2010). Los productos del metabolismo proteínas, carbohidratos, lípidos son algunos de los elementos más simples que integran un organismo o ser vivo, los cuales cumplen funciones de gran importancia en el desarrollo, supervivencia y reproducción (Youdim, 2021).

En cuanto a la composición química de diferentes partes de la planta de *Leucaena leucocephala*, la mayor cantidad de proteína cruda se encuentra en los brotes o renuevos (47,4 %), semillas maduras sin testa (45,2 %) y en semillas verdes con testa (40,1 %); por otra parte, el menor contenido de proteína corresponde a las vainas maduras sin semillas y a las semillas maduras con testa (8,2 y 9,7 % respectivamente). La fibra cruda incrementa a medida que las partes comestibles de la planta maduran con la edad, encontrándose la mayor cantidad en las vainas verdes con semillas maduras; estas partes de la planta contienen (25,4 y 35,8 %) de fibra cruda respectivamente (Adenaye, 1979; Castillo y Martínez, 2007). Además, se han identificado algunos metabolitos secundarios de

diferentes partes de la planta, tales como antocianinas, flavonoides, fenoles totales, taninos (Dago y cols., 2020; Román y cols., 2014; Verdecia y cols., 2012).

No obstante, algunos de los compuestos químicos que poseen las plantas son los responsables de propiedades tóxicas, la cual es la capacidad de alguna sustancia química de producir efectos perjudiciales sobre un ser vivo, al entrar en contacto con él (Moreno, López y Corcho, 2000). Por lo tanto, es necesario estudiar cuales componentes podrían provocar efectos graves en los organismos vivos. De tal manera, existen ensayos de toxicidad, que permiten determinar aspectos como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos evaluados por la reacción de los organismos de prueba (Ochoa y Sarmiento, 2018).

Por otro lado, para ensayos de toxicidad se emplean los crustáceos pertenecientes al género *Artemia*, ya que, son sensibles a una gran variedad de extractos y sustancias químicas de especies vegetales. Dichas pruebas consisten en exponer cierto número de larvas a diferentes concentraciones de los extractos a evaluar, para determinar la DL_{50} expresada en $\mu\text{g/mL}$, constituyendo una herramienta valiosa al ser una prueba repetible y reproducible, es rápida y se emplean pequeñas cantidades de muestras (Miranda y cols., 2016).

En los últimos años, varios autores han divulgado algunas investigaciones sobre el evento de estudio del presente trabajo, Román y col, (2014), determinaron los componentes nutricionales y antioxidante de dos especies de guaje (*Leucaena* spp) un recurso ancestral subutilizado, en este trabajo evaluaron el contenido de minerales, componentes nutricionales y antioxidantes para contribuir a la revalorización alimentaria del guaje rojo (*L. esculenta* Benth.) y verde (*L. leucocephala* Lam.). Martínez y col (2016) evaluaron los efectos de la edad de los rebrotes, época del año y especie forrajera, sobre la composición nutricional de leucaena (*Leucaena leucocephala*) y pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) asociados en un sistema silvopastoril intensivo. El contenido de proteína cruda (PC) en la asociación leucaena-pasto estrella fue superior a los requerimientos de rumiantes en pastoreo.

Dago, Milian, Calzadilla, Redonet, López y Hernández (2020), determinaron el uso potencial de *Leucaena leucocephala* Lam. (*Leucaena*) presente en sistemas agroforestales de Pinar del Río. Los resultados permitieron inferir que, en el follaje y corteza de esta

especie existe la presencia de sustancias tales como flavonoides, alcaloides, carbohidratos reductores, taninos lo cual comprueba el potencial uso de esta planta para la nutrición animal y la salud.

Después de describir la situación actual del problema, los autores de esta investigación formularon los siguientes enunciados holopráticos:

¿Cuál es la relación entre el potencial nutricional de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (Fabaceae) y su composición química, realizada en el Laboratorio de Ciencias de Los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de La Universidad de Los Andes, desde diciembre de 2019 hasta noviembre de 2022?

¿Cuál es la relación entre la composición química del extracto etanólico de las partes aéreas de *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit (Fabaceae) y la ecotoxicidad frente a nauplios de *Artemia salina*, realizada en el Laboratorio de Ciencias de Los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de La Universidad de Los Andes, desde diciembre de 2019 hasta noviembre de 2022?

Justificación e Importancia de la Investigación

La Justificación debe responder a los por qué o razones de la investigación, específicamente, estas razones pueden ser categorizadas como necesidades, curiosidades y preocupaciones, motivaciones, intereses, valores, potencialidades, oportunidades, tendencias, contradicciones (Hurtado, 2010).

Se ha determinado el interés de estudiar la *Leucaena leucocephala*, la cual tiene un amplio rango productivo y de adaptación, habilidad para prosperar en condiciones ecológicas desfavorables (Mejía, Lazo y Salinas, 2009). En cuanto a la composición nutricional de las diferentes partes de la planta, la mayor cantidad de proteína cruda se encuentra en los brotes o renuevos (47,4 %) y de fibra cruda se encuentra en las vainas verdes con semillas maduras (25,4 %). Otra de las razones de interés son los metabolitos secundarios como taninos, alcaloides, saponinas, triterpenos, esteroides, compuestos reductores, y aminoácido no proteico como la mimosina (Aponte y col, 2008).

Por otra parte, se presenta como potencialidad los componentes que conforman las partes de *L. leucocephala* y su capacidad para actuar como fuente de nutrientes en la dieta, con un alto contenido de proteína y fibra (Pilco, 2016). En el mismo orden de ideas, el análisis proximal; es el método más usado para expresar la calidad nutritiva global de un

alimento, que indica el contenido de humedad, lípidos, proteínas y cenizas, entre otros (Ayala, Centina, Capetillo, Zapata y Sandoval, 2006). Aunado a ello, el potencial nutricional es la contribución de un alimento basada en sus componentes esenciales (proteínas, lípidos, hidratos de carbono, minerales y vitaminas, entre otros) los cuales son aportados al contenido de la dieta (Hernández y Sastre, 1999).

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar el potencial nutricional de la especie *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (Fabaceae), su composición fitoquímica y la toxicidad de los extractos etanólicos de sus partes aéreas en *Artemia salina*.

Objetivos Específicos

- Determinar la composición nutricional de la especie *Leucaena leucocephala*.
- Identificar los metabolitos secundarios presentes en los extractos hexanólico, diclorometanoico y etanólico de las partes aéreas de *L. leucocephala*.
- Comprobar la toxicidad que presentan los extractos etanólicos de las partes aéreas de *L. leucocephala* frente a nauplios de *A. salina*.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Según Hurtado (2010), "el alcance de una investigación está representado por la amplitud y la profundidad del conocimiento que se quiere conocer" (p. 150). Es por ello que la profundidad del conocimiento que se pretendió fue confirmatoria, ya que se estudió una relación de causa-efecto entre el potencial nutricional de la harina *L. leucocephala* y su composición química. También, la relación entre la composición química de los extractos etanólicos de las partes aéreas de *L. leucocephala* y la toxicidad frente a nauplios de *Artemia salina*.

Durante el desarrollo de una investigación se podría presentar limitaciones que hacen referencia a los aspectos teóricos, técnicos y recursos económicos (Hernández, Fernández y Batista, 2010). En tal sentido, durante esta investigación se encontraron limitaciones de tipo teóricas, en cuanto a la accesibilidad a pocos trabajos previos. Además, en cuanto a los aspectos técnicos se presentaron fallas constantes de los servicios públicos, como electricidad, agua, internet. Asimismo, dentro de las limitaciones económicas, se tuvieron

altos costos y difícil adquisición de los reactivos como etanol, ácido sulfúrico y el éter de petróleo, que fueron utilizados para elaborar la parte experimental de dicha investigación.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Dago, Milian, Calzadilla, Redonet, López y Hernández (2020), determinaron el uso potencial de *Leucaena leucocephala* (Lam.), presente en sistemas agroforestales de Pinar del Río. El presente trabajo se desarrolló en la Universidad de Pinar del Río, durante los meses de enero a marzo de 2018, con el objetivo de determinar la presencia o no de metabolitos secundarios en el follaje y corteza de *L. leucocephala* con potencial uso en los agroecosistemas. Las muestras de las plantas fueron tomadas en un agroecosistemas de Pinar del Río para después ser trasladadas al Laboratorio de Química en la Universidad de Pinar del Río “Hermanos Saíz montes de Oca”, Cuba.

Para la preparación de los extractos, se tomaron las partes aéreas de las plantas (hojas, corteza y frutos), los cuales fueron procesados verdes en condiciones naturales, durante 72 horas y posteriormente en la estufa durante 24 horas a 60 °C para luego triturarlas finamente, a tamaño de partícula 0,8 mm. Las maceraciones se realizaron por espacio de 48 horas. Se utilizó la extracción sucesiva con solventes de polaridad creciente (acuoso, etanólico, etéreo), con la finalidad de lograr el mayor agotamiento de la droga. Para la identificación de los metabolitos secundarios se empleó el ensayo de cloruro férrico (fenoles y/o taninos), para extracto etanólico y acuosos. El reactivo empleado fue una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina.

Los resultados permitieron inferir que, en el follaje y corteza de esta especie existe la presencia de sustancias tales como flavonoides, alcaloides, carbohidratos reductores, taninos, cumarinas, mucilago y aminoácidos libres, lo cual comprueba el potencial uso de esta planta para la nutrición animal y la salud. Además, los autores obtuvieron que el follaje de la planta de *L. leucocephala* presenta mayor contenido de humedad con respecto a la corteza y fruto verde; estos parámetros indican que la corteza, y los frutos verdes pueden ser conservados por un periodo de tiempo prolongado, lo que acentúa su importancia desde el punto de vista investigativo.

Bravo, Jiménez, Mesa, Arangute y Nieva (2019), analizaron las propiedades funcionales, capacidad antioxidante de la harina de guaje (*Leucaena leucocephala*) y su

uso en la industria alimentaria. La presente investigación fue realizada con el objetivo de caracterizar la harina de guaje y proponer usos para industria alimentaria. El Guaje se deshidrató en horno de charolas a 60 °C, fue molido y tamizado en malla # 40. Se realizó un análisis químico proximal a la materia prima (proteínas, cenizas, humedad y fibra cruda (AOAC, 2000). Los resultados del análisis proximal de dicha investigación se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1.

Composición química proximal de la harina de guaje en base húmeda

Composición	Harina %
Humedad	12,87 ± 0,7
Cenizas	1,42 ± 0,09
Fibra cruda	15,14 ± 0,9
Proteínas	32,1 ± 1,2
Carbohidratos	29,91 ± 2,32
Lípidos	8,56 ± 0,89

Los investigadores lograron obtener harina de guaje con alto contenido proteico. Además, pudieron determinar que las semillas de guaje tienen mayor contenido de fibra cruda. En base a esto, afirman que el guaje es una especie de consumo con alto valor nutricional y funcional que ha sido subvalorado. Así como la harina de guaje puede ser muy prometedora para la industria alimentaria.

Santiago, Lara, Miranda, Huerta, Krishnamurthy y Muñoz, (2016), estudiaron la composición química y mineral de *Leucaena* asociada con pasto estrella durante la estación de lluvias, con el objetivo de determinar la composición química y mineral de la leucaena (*Leucaena leucocephala* Lam. de Wit) y el pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis* Vanderyst) asociados en un sistema silvopastoril intensivo a 35, 42, 49, 56, 63 y 70 días de edad de los rebrotes.

Tres lotes seleccionados aleatoriamente fueron asignados a uno de seis tratamientos que correspondieron a la edad de los rebrotes: 35, 42, 49, 56, 63 y 70 días a partir de la poda reciente de la leucaena al inicio de la época de lluvias. Las variables a evaluar fueron los porcentajes de extracto etéreo (EE), proteína cruda (PC), fibra detergente ácido (FDA),

fibra detergente neutro (FDN), calcio (Ca), magnesio (Mg), sodio (Na), potasio (K) y fósforo (P) , relación Ca:P y ppm de cobre (Cu), zinc (Zn) y hierro (Fe). Los resultados mostraron diferencias significativas, por efecto de la edad de los rebrotes para el contenido de FDN y Ca los cuales fueron mayores al día 49 mientras Na y P disminuyeron al incrementarse la edad de los rebrotes. Contrariamente, la concentración de FDA, Cu y Fe se incrementaron a mayor edad de los rebrotes.

Leucaena tuvo mayor contenido de EE, PC, Ca, Mg, Cu y Fe; pero el pasto estrella tuvo mayor contenido de FDN, FDA y relación Ca:P. Se encontraron deficiencias de Cu, Zn y P en los forrajes estudiados (Santiago y col, 2016). Los componentes celulares, extracto etéreo y proteína cruda no fueron afectados por la edad de los rebrotes en ambas especies forrajeras; sin embargo, leucaena tuvo mayor contenido de grasa y proteína que pasto estrella. Ambas especies asociadas incrementaron la disponibilidad de la proteína en la dieta. Los investigadores concluyeron que la asociación leucaena con el pasto estrella mejoró la composición química y mineral del follaje comestible.

Martínez, Reyes, Lara, Miranda, Huerta y Uribe, (2016), realizaron un trabajo de investigación, intitulado: Composición nutricional de leucaena (*Leucaena leucocephala*) y pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) asociados en un sistema silvopastoril intensivo, para determinar su calidad y disponibilidad. En el cual, se analizó la composición nutrimental del follaje de ambas forrajeras durante las épocas de nortes y secas. Mediante el análisis proximal, se determinó el contenido de materia seca (MS), materia orgánica (MO), cenizas (CEN), proteína cruda (PC), extracto etéreo (EE), fibra cruda (FC), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), hemicelulosa (HEM), celulosa (CEL) y lignina (LIG) en hojas y tallos tiernos de ambas especies (Martínez y col, 2016).

Hubo efecto de la edad de rebrote en la composición química de la leucaena asociada con pasto estrella. Los porcentajes de MS, FDN, FDA y LIG, se incrementaron a mayor edad de la planta. Contrariamente, el contenido de proteína cruda decreció con la edad de los rebrotes. Los demás componentes tuvieron variaciones leves por efecto de la edad de rebrote. La época del año también afectó la composición nutrimental de la asociación leucaena-pasto estrella, excepto para MO y PC. El contenido de MS y HEM fue mayor durante la época de nortes, mientras que los porcentajes de CEN, EE, FC, FDN, FDA, CEL

y LIG fueron mayores en el periodo seco. El contenido de PC en la asociación leucaena-pasto estrella fue superior a los requerimientos de rumiantes en pastoreo.

Verdecia y cols (2012), analizaron el valor nutritivo de *Leucaena leucocephala*, con énfasis en el contenido de metabolitos secundarios a diferentes edades de rebrote durante los dos períodos del año, se utilizó una parcela de 0,5 ha, aplicándose un corte de uniformidad a 1 m de altura del suelo al inicio de cada período. Las edades evaluadas fueron 60, 120 y 180 días. Se determinaron la proteína bruta, fraccionamiento fibroso, glucosa, fructosa, sacarosa, taninos, oligosacáridos, flavonoides, alcaloides y saponina. Se empleó un diseño en bloques al azar con tres tratamientos y cuatro repeticiones, aplicando un análisis de clasificación doble y las medias se compararon utilizando la prueba de rangos múltiples. En los resultados se puede apreciar que fenoles, taninos, alcaloides y saponinas aumentaron su contenido (43,54; 77,5; 3,05 y 10,7 g/kg respectivamente) con la edad de 180 días, mientras que la proteína bruta disminuyó con su valor más alto (31,74 %) a los 60 días, mientras que a los 120 presentó su valor más alto con 29,03 y 32,85 µg/g. Los autores concluyeron que la edad tuvo un marcado efecto en el comportamiento de los indicadores evaluados, más acentuados en el período lluvioso, al disminuir la calidad nutritiva.

Antecedentes Históricos o Epistemológicos del Género *Leucaena*

Las leguminosas son conocidas desde la antigüedad, cultivadas por diversas culturas; y según su especie, tuvieron diferentes orígenes. Constituyen un grupo de forma y estructura poco variable. Se cree que junto a los cereales fueron alimentos básicos de las poblaciones desde el periodo Neolítico, (León, 2000).

Leucaena inicialmente fue utilizada como árbol de sombra en la preservación de la fertilidad del suelo en plantaciones de café, cacao, quinina en Indonesia y África. Se utilizó como forraje de corte en Hawaii. Desde 1915, se emplea como forraje para engordar el ganado. Los datos más sobresalientes sobre la utilidad de esta especie son: resistencia a cortes sucesivos, alta producción de forraje, aceptabilidad para el ganado y excepcionalmente alto contenido de proteína cruda (Sierra, 1979).

El género *Leucaena* es originario de Sudamérica. Los Mayas y Zapotecas la conocieron hace más de 2000 años y la propagaron por esa región mucho antes de que llegasen los europeos. Se cree que la *Leucaena* como cultivo intermedio y como barrera para controlar

la erosión constituyó una fuente principal de nitrógeno fertilizante para el maíz, alimento básico de ambas civilizaciones. La *Leucaena* era tan importante para la agricultura de aquellos pueblos que incluso la incluyeron en sus pictografías. El nombre de Oaxaca, el quinto estado de México en extensión, procede de la palabra precolombina “hauxin”, que significa “el lugar donde crece la *Leucaena*” (Paredes, 1984).

Los españoles fueron los primeros en introducir la *Leucaena* en el Sudeste de Asia y en región del Pacífico meridional, durante el siglo XIX, utilizándola como forraje para los caballos transportados en sus galeones. En Hawaii, la *Leucaena* se conoce con el nombre de “Koa Haole” una versión extranjera de su hermoso árbol (*Acacia koa*). A los fines de identificación, la Universidad de Hawaii designó las distintas variedades con un prefijo con la letra "K (significando “Koa”) seguido de un número (Paredes, 1984).

Los botánicos registraron por primera vez variedades gigantes de *Leucaena* en Centroamérica en el año 1910, designándolas *Leucaena salvadorensis*. Pero, hasta hace muy poco tiempo, esta especie versátil de rápido crecimiento, fue prácticamente ignorada o su existencia se dio por sentada, desestimándose el valor real y las posibilidades que ofrece (Paredes, 1984), la cual tiene aproximadamente 24 especies de árboles y arbustos. Este género ha despertado el interés mundial por sus atributos como recurso forrajero (Mejía, Lazo, y Salinas, 2009).

Bases Teóricas

Familia Fabaceae

Es una familia del orden *fabales*, constituye aproximadamente 730 géneros y unas 19.400 especies, lo que la convierte en la tercera familia con mayor riqueza de especies después de las compuestas (*Asteraceae*) y las orquídeas (*Orchidaceae*). Esta riqueza de especies se haya particularmente concentrada en las ramas de las mimosóideas y las fabóideas, ya que contienen cerca del 9,4 % de la totalidad de las especies de las eudicotiledóneas. Se ha estimado que alrededor del 16% de todas las especies arbóreas en los bosques lluviosos neotropicales son miembros de esta familia (Cabañas, Luz, Lamothe y Domínguez, 2005).

Descripción Botánica de la Familia Fabaceae.

En esta familia se encuentran desde árboles y arbustos de porte herbáceo; las que pueden ser perennes o anuales. Sus hojas son simples; pero generalmente son compuestas

predominando las hojas trifoliadas, a veces los últimos foliolos se transforman en zarcillos. Las hojas son generalmente estipuladas. Contienen flores hermafroditas con verticilos pentámeros, solitarias o en racimos; con cáliz gamosépalo formado por cinco sépalos tiene una flor amariposada característica de las Fabaceae. Además, posee fruto (legumbre) de forma y tamaño variables y semillas características de Fabaceae con diversidad de tamaños, forma y color, algunas con cubierta dura y brillante; con colores rojas, violeta, negro, amarillo, blanco, verde entre otros (Llamas y Acedo, 2018).

Taxonomía de la Familia Fabaceae.

Nombre Científico: Fabaceae (Leguminosae)

Reino: Plantae

División: Angiospermae

Clase: Liliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae (Leguminosae)

Género: más de 700 géneros

Especie: más de 19 000 especies (Cabañas, Luz, Lamothe y Domínguez, 2005).

Distribución de la Familia Fabaceae.

Es una familia de distribución cosmopolita y se desarrolla en diversos tipos de climas. Los árboles son más frecuentes en las regiones tropicales, mientras que las hierbas y los arbustos dominan en las extratropicales, fueron seleccionadas por su buena adaptación a zonas con sequías prolongadas y suelos ácidos de baja fertilidad en varias regiones del trópico de América Latina (Duno y Cetzal, 2016).

Usos de la Familia Fabaceae.

Es de gran uso en la nutrición animal, se destaca su empleo en alimentación humana, tanto por el valor alimenticio de frutos y semillas, también se usa la planta como forraje o como especie piscícola. Además, poseen una característica generalizada de albergar en sus raíces bacterias fijadoras del nitrógeno atmosférico, asociación originada por los nódulos radicales que presenta (Castañeda, Gutiérrez, Carillo y Sotelo, 2017).

Género *Leucaena*

Leucaena nombre genérico que procede del griego *leukos*, que significa "blanco", refiriéndose al color de las flores, es un género que consta de cerca de 24 especies de árboles y arbustos, tiene frutos y semillas comestibles, usadas en alimentación forrajera animal, en abonos verdes, conservación de suelos, semillas para collares, fuente vegetal de aceite combustible para energía (García, Wencomo, Medina, Moratinos y Cova, 2009).

Descripción Botánica del Género *Leucaena*.

La describen como un árbol que puede alcanzar hasta 20 m de altura con las ramillas pubescentes, pecioladas, de 3 a 6 cm de largo, con o sin glándulas y pinnas superiores un poco más cortas que las inferiores. Flores blancas en cabezuela pedunculada globular, axilar o terminales en su mayoría aglomeradas de 1,5 a 3 cm de diámetro. Legumbres numerosas, lineales, aplanadas, membranosas. Semillas con formas aovadas y también encontrándose planas transversas (García, Wencomo, Medina, Moratinos y Cova, 2009).

Taxonomía del Género *Leucaena*.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Subfamilia: Mimosoideae

Género: *Leucaena* (García, Wencomo, Medina, Moratinos y Cova, 2009).

Distribución del Género *Leucaena*.

Este género se distribuye desde EE.UU, a Perú y Paraguay. Algunas especies como *Leucaena leucocephala*, se adapta a suelos arcillosos, pesados y salinos. Se puede establecer en suelos de mediana a alta fertilidad con pH 5,7 – 8,0. Con alturas entre 0 – 1.600 m s. n. m. En una temperatura entre 18 – 27 °C (Solorio y Solorio, 2008).

Usos del Género *Leucaena*.

En los países latinoamericanos las especies del género *Leucaena* son las más utilizadas para la alimentación de los rumiantes en las áreas de pastoreo, los bancos de proteínas y los sistemas de corte y acarreo, debido fundamentalmente a su rápida adaptación a condiciones

contrastantes de clima y suelo, sobresaliente composición nutricional, además de presentar buena persistencia al pastoreo (Solorio y Solorio, 2008).

Especie *Leucaena leucocephala*

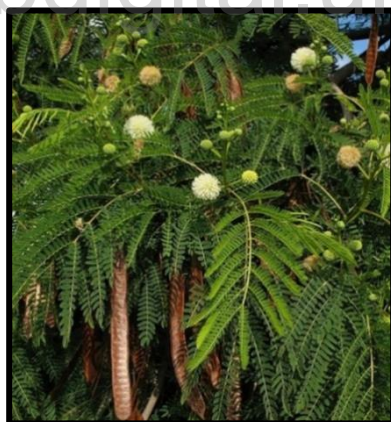
Es conocido comúnmente como leucaena, guaje (en México), huaxín (en la América Central), aroma boba, aroma mansa, barba de león, carbonero blanco, falso cují (en Venezuela) y por otros muchos nombres, es uno de los árboles leguminosos más extensamente cultivado en el mundo (Figura 1). Es uno de los arbustos que se utiliza como fuente de proteína en la alimentación de ganado bovino (Amaro, 2009).

Descripción Botánica de *Leucaena leucocephala*.

Es una leguminosa forrajera de crecimiento erecto. Las hojas son compuestas bipinnadas, divididas en pequeñas hojuelas de 8-15 mm de longitud, y provistas de 11-12 pares de éstas. Las flores son blancas y forman una masa compacta de forma globular de aproximadamente 2,5 cm de diámetro. Los frutos están constituidos por una vaina o legumbre plana y alargada de color pardo que crece en forma colgante (Guerra, Valdez, Orozco y Fuentes, 2016).

Figura 1.

Hojas, frutos y flores de Leucaena leucocephala



Taxonomía de *Leucaena leucocephala*.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Subfamilia: Mimosoideae

Género: *Leucaena*

Especie: *Leucaena leucocephala* (Amaro, 2009).

Distribución de *Leucaena leucocephala*.

Crece en diversos países de América Central y del Sur, adaptado a una gran variedad de sitios en tierras bajas en el trópico y el subtrópico, ha sido plantada en muchos países fuera de su área de distribución. Crece durante todo el año, pero prospera mejor en zonas con altas temperaturas (25- 35 °C) (Guerra, Valdez, Orozco y Fuentes, 2016).

Usos de *Leucaena leucocephala*.

Gran diversidad de usos que pueden dárseles a sus productos, entre los cuales se pueden mencionar como fuente de leña y madera, su papel en el control de la erosión y conservación del suelo, la recuperación de terrenos agrícolas, reforestación, capacidad para proveer sombra para otras plantas, forrajes para rumiantes, la flor como aceites esenciales aromáticos, las semillas como piezas de joyería en la India, también uso medicinal contra las amebas y la viruela (Zárate, 1987).

Composición Química de *Leucaena leucocephala*.

Las hojas constituyen un excelente forraje de materia fresca y seca, proteínas, calcio, potasio y vitaminas. Tienen un porcentaje de digestibilidad de 60 a 70 %. Dependiendo de los minerales disponibles del suelo, es una buena fuente de calcio, fósforo y potasio. Sin embargo, pueden contener una gran variedad de componentes químicos naturales los cuales son capaces de inducir efectos adversos en animales que consumen estas plantas. La presencia de algunos de estos componentes en la *L. leucocephala*, podría explicar en parte la toxicidad derivada de su consumo gracias los taninos, compuestos fenólicos y mimosina. Una limitación que pudiera estar en la planta es la existencia de cantidades apreciables de taninos en las hojas (Mejía, Lazo, y Salinas, 2009).

En la Tabla 2 se puede apreciar que la mayor cantidad de proteína cruda se encuentra en los brotes o renuevos (47,4 %) y en semilla verde con testa (40,1 %).

Tabla 2

Composición química (%) de diferentes partes de *Leucaena leucocephala* (% de materia seca)

Parte de la planta	Materia Seca	Proteína cruda	Fibra cruda	Ceniza Total	Extracto libre de nitrógeno
Brote o renuevo	25,5	47,4	18,8	6,1	27,7
Hojas tiernas	26,9	31,3	12,8	8,2	45,8
Hojas maduras	33,0	26,8	14,4	9,0	46,9
Semilla verde	30,5	33,7	13,5	4,6	43,6
Semilla verde con testa	47,9	12,8	21,5	4,3	61,1
Semilla verde sin testa	41,8	40,5	3,4	8,6	35,6
Semilla madura	86,4	32,6	35,8	5,2	20,9
Vaina madura con semilla	85,6	23,4	17,4	4,9	51,5
Vaina madura sin semilla	84,9	8,2	15,4	8,7	66,8

Fuente: Mejía, Lazo, y Salinas (2009).

Por otra parte, el menor contenido de proteína corresponde a las vainas maduras sin semillas (8,2 %). Además, los altos contenidos de proteínas que presentan esta leguminosa y como varían según la parte de la planta (Tabla 3).

Tabla 3

Contenidos (%) de proteína de diversas partes de la planta *Leucaena leucocephala*

Partes de la planta	Proteína (%)
Planta entera	23,14
Hojas	27,34
Tallos finos	11,95
Tallos gruesos	9,06

Fuente: Mejía, Lazo, y Salinas (2009).

Se ha sugerido que la toxicidad derivada de la *L. leucocephala* es debido a un aminoácido no proteico denominado mimosina, el cual se encuentra en todas las partes del arbusto. Fue aislado por primera vez de la planta denominada *Mimosa púdica*, de allí su nombre. Este aminoácido representa otra de las limitaciones para ser utilizada como única fuente de proteína para animales. El contenido de mimosina en la legumbre oscila entre 2 – 5 %. La mayor concentración de mimosina en la planta se presenta en las partes tiernas en activo crecimiento (Mejía, Lazo, y Salinas, 2009).

Metabolitos Primarios

Son compuestos producidos por casi todas las plantas por ser esenciales para los procesos bioquímicos que controlan el crecimiento, diferenciación celular, la fotosíntesis, la respiración, asimilación de nutrientes, la maduración de los frutos, etc. En otras palabras, son indispensables para la vida de la planta (y los microorganismos). Estas sustancias incluyen carbohidratos, glucósidos, aminoácidos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y vitaminas. Algunos son componentes básicos de la alimentación humana (Marcano y Hasegawa, 2002).

Determinación de Metabolitos Primarios.

Análisis Proximal. Es el sistema más confiable para determinar los componentes principales de un alimento. Hace posible el análisis de humedad, cenizas, grasas, proteínas, y carbohidratos (Boscan, 1996).

Determinación del contenido de Humedad. Es uno de los análisis más sencillos de realizar, se puede conocer a través de diferentes técnicas. Entre ellas se tienen métodos gravimétricos directos, métodos volumétricos y métodos indirectos. El método gravimétrico directo se fundamenta en la evaporación del agua de una muestra de peso conocido, para luego pesar el residuo. La evaporación se realiza por la técnica de desecación en estufa, a presión normal y a una temperatura de 100 °C, hasta obtener un peso constante (Boscan, 1996).

Determinación de cenizas totales. El contenido de cenizas de un alimento es determinado por combustión- incineración en una mufla a 450-500 °C. El residuo de esta combustión contiene los elementos minerales totales del alimento. El análisis de cenizas no proporciona información sobre minerales individuales. Luego de terminar este paso, se debe pesar el restante y por diferencia calcular el porcentaje de cenizas (Ortiz, 2004).

Determinación del contenido de grasas. Para la determinación de grasa cruda se pueden utilizar varios métodos: métodos gravimétricos, métodos volumétricos y métodos instrumentales. El método gravimétrico consiste en utilizar un solvente adecuado (éter de petróleo) para extraer la grasa. Luego se evapora el solvente y se determina la grasa por peso del extracto seco. Algunos de los métodos utilizados son Soxhlet, Goldfish, entre otros (Ortiz, 2004).

Determinación del contenido de proteínas (Método de Micro Kjehdal). Este método consiste en la oxidación de los compuestos orgánicos, empleando ácido sulfúrico concentrado, el cual la digiere convirtiéndola en CO₂, H₂O y amonio (NH₄). El amoniaco liberado por una solución de sosa caustica es extraído por una corriente de vapor de agua, a fin de ser recuperado en una solución tampón de ácido bórico, y luego se realiza la titulación por una solución de ácido clorhídrico de concentración conocida (0,02 N) (Boscan, 1996).

Determinación del contenido de extractos no nitrogenados. Los carbohidratos o extractos libres de nitrógeno se pueden calcular por diferencia de peso. Se calculan los porcentajes de humedad, cenizas, grasas, proteínas y la diferencia de la sumatoria de estos con respecto al 100 % representa el porcentaje de carbohidratos (López y Soto, 2008).

Productos Naturales o Metabolitos Secundarios.

Los seres vivos son capaces de sintetizar una gran variedad de compuestos, pero se define “producto natural o metabolito secundario”, que se usa como sinónimo, aquel que es propio de una especie, se le conoce también como producto químico y en la mayoría de los casos no tiene utilidad aparente para el ser que lo sintetiza. Un gran porcentaje de los principios activos está comprendido dentro de estos metabolitos secundarios, que son compuestos químicos de estructuras relativamente complejas y distribución restringida. Entre estos son comunes aquellos con funciones defensivas contra insectos, bacterias, hongos, como lo son los alcaloides, aminoácidos no proteicos, esteroides, fenoles, flavonoides, cumarinas, quinonas, taninos y terpenoides (Marcano y Hasegawa, 2002).

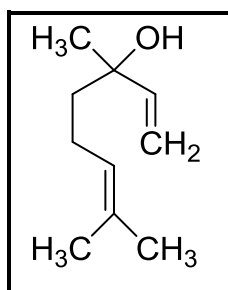
Clasificación de los productos naturales o metabolitos secundarios. Esta clasificación puede hacerse de acuerdo con sus estructuras, su bioformación, la fuente de producción o su acción biológica. La cantidad de metabolitos secundarios se puede encontrar elevado o moderado dependiendo de las diversas estructuras de la planta, en esta especie se halla taninos, saponinas, alcaloides, flavonoides, entre otros (Marcano y Hasegawa, 2002). Algunos de ellos se describen a continuación:

Terpenos. Los terpenos o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40.000 moléculas diferentes). Son compuestos a menudo no saturados formados por carbono, hidrógeno y oxígeno de estructura no aromática (Figura 2), que se encuentran sobre todo en los aceites esenciales y en las resinas. Son

metabolitos secundarios formados mediante la ruta del ácido mevalónico. En su estructura la cadena de carbono está constituida por la unión de dos moléculas o más de isopreno, que es considerado como un hemiterpeno. Son muy numerosos y de estructura diversa, se pueden encontrar en formas sencillas o estructuras más complejas saponinas y aceites esenciales (Canape, 2018).

Figura 2.

Estructura química de los terpenos.

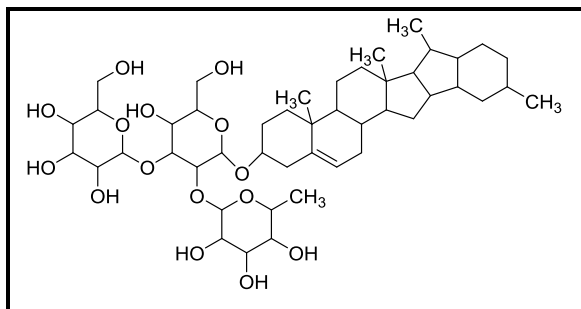


Dentro de los terpenos se clasifica por el número de isoprenos que contienen, son: hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}) y poliisoprenoides (C_{50}) (Canape, 2018).

Saponinas. Las saponinas se originan por la ruta de la acetilcoenzima vía ácido mevalónico y escualeno. Estructuralmente las saponinas o glúcidos son compuestos orgánicos que contienen uno o varios azúcares (Figura 3). Se clasifican como esteroidales o triterpénicos, dependiendo de la naturaleza de la aglicona. Las saponinas por hidrólisis ácida o enzimática dan origen a una sustancia libre de los azúcares, formando así la sapogenina. Las saponinas al agitarse en agua producen abundante espuma. Debido a esta propiedad, a las plantas que las contienen se les usa como jabón (Canape, 2018).

Figura 3.

Estructura química de las saponinas.

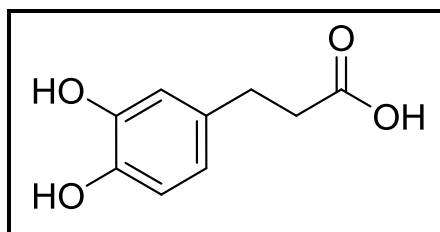


Se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal, especialmente entre las legumbres. Se han utilizado como antitusivos y expectorantes, antiinflamatorios, analgésicos, venotónicos, antihemorroidales y adaptógenos, además se presume que poseen actividad antiviral, citotóxica (antitumoral) (Canepa, 2018).

Fenoles. Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenil propanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo (Figura 4) (García y Pérez, 2009). Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido shiquímico, responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas. A partir de eritrosa-4-P y de ácido fosfoenolpirúvico se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de ácido shiquímico y, derivados de éste, aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina). De igual manera, la ruta del ácido malónico, es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, pero es poco empleada en plantas superiores (García y Pérez, 2009). Dentro de los fenoles existe una subclase en donde se encuentran:

Figura 4.

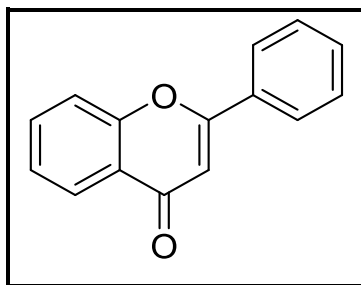
Estructura química de los fenoles



Flavonoides. Tienen como estructura base, un esqueleto de C6-C3-C6 que puede sufrir posteriormente muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales (Figura 5), siendo una familia muy diversa, pero se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua. Suponen aproximadamente la mitad de los compuestos fenólicos presentes en las plantas. Se cree que juegan un papel muy importante en la defensa contra el cáncer (Marcano y Hasegawa, 2002).

Figura 5.

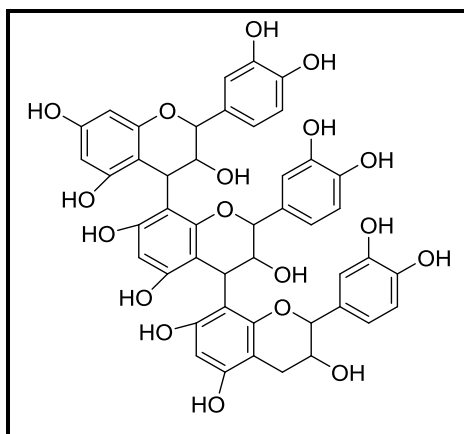
Estructura química de los flavonoides.



Taninos. Las plantas presentan una mezcla compleja de compuestos fenólicos y entre ellos los flavonoides poliméricos de alto peso molecular y estructuras mal definidas que por hidrólisis producen antocianidinas y flavanoles. Este grupo de sustancias se conoce como proantocianidinas y forma parte de los llamados taninos condensados (Figura 6). Estas sustancias son de origen vegetal, no nitrogenadas, solubles en agua, alcohol y acetona (Marcano y Hasegawa, 2002).

Figura 6.

Estructura química de los taninos.

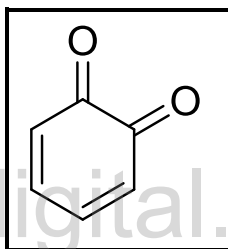


Quinonas. Las quinonas son isómeros de la ciclohexanodiona o bien un derivado de los mismos (Figura 7). Los dos isómeros son la orto-benzoquinona (o-benzoquinona), que es la 1,2-diona, y la para-quinona (p-benzoquinona), que es la 1,4-diona. La para-benzoquinona es la forma oxidada de la hidroquinona y la orto-benzoquinona es la forma oxidada del catecol (1,2-dihidroxibenceno).

Las quinonas son anillos aromáticos con dos funciones: se ubican en la naturaleza y son causantes del color marrón que se produce en las frutas cuando se dañan. Poseen una alta reactividad, formando complejo con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas y anulando su función. Debido a esto, el potencial antimicrobiano de este grupo es amplio (Castillo y Martínez, 2007).

Figura 7.

Estructura química de las quinonas.

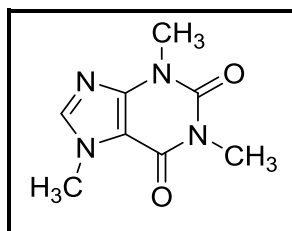


Constituyen un grupo de pigmentos vegetales y animales. Son compuestos coloreados, desde el amarillo al casi negro, aunque la mayoría son amarillas, naranjas o rojas. Estas están ampliamente representadas, bien sea como núcleo principal de una estructura o formando parte de moléculas complejas aromáticas o aromáticas-alifáticas y a veces diméricas (Marcano y Hasegawa, 2002).

Alcaloides. Reciben esta denominación, los compuestos nitrogenados heterocíclicos procedentes del metabolismo de aminoácidos (Figura 8) (García y Pérez, 2009).

Figura 8.

Estructura química de los alcaloides.



En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas la mayoría de ellas consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajante muscular, tranquilizante, antitusivos o analgésicos. Pertenecen a este grupo, entre otras sustancias, la morfina, la heroína y la cocaína (García y Pérez, 2009).

Extractos Vegetales

Son compuestos producidos de la obtención de sustancias biológicamente activas presentes en los tejidos de plantas, por el uso de un solvente (alcohol, agua, mezcla de estos u otro solvente selectivo) y un proceso de extracción adecuado. De una misma planta, dependiendo de la parte de ella utilizada, del solvente y de la técnica de extracción, podremos obtener una diferente gama de sustancias (Lizcano y Vergara, 2008).

Obtención de los Extractos Vegetales. Los extractos son preparados por métodos apropiados usando solventes adecuados. Pueden ser mezclados diferentes lotes de tejido vegetal previo a la extracción. El tejido vegetal a ser extraído debe someterse a un tratamiento preliminar, como, inactivación de enzimas, molienda o trituración. Además, las materias indeseables deben ser eliminadas antes de la extracción. Los extractos crudos de plantas son aquellos que se obtienen mediante operaciones sencillas, sin modificaciones, es decir sin aislar algunos de sus componentes. Existen diferentes métodos para obtener extractos de las plantas y corteza de frutos (Tituaña, 2013).

Maceración. Es un método de extracción sólido-líquido siendo la materia prima el material vegetal que contiene los principios activos solubles en el solvente que se emplea. Se generan dos productos que pueden emplearse de acuerdo al objetivo de su uso, el sólido sin los principios activos y el propio extracto. Es el proceso más simple de extracción y debe estar protegido de la luz para evitar posibles reacciones. Para lograrlo se coloca el material vegetal en forma de trozos o polvo, según sea la conveniencia, en un recipiente lleno del solvente y se deja reposar por varios días, con agitación frecuente hasta completar la extracción del material vegetal. Al final de este período se cuela y el resto sólido se exprime hasta lograr quitar el líquido remanente (Tituaña, 2013).

Extracción continua (Método de Soxhlet). Es un método en caliente, que se desarrolla empleando solventes con puntos de ebullición bajo, para evitar la degradación de la muestra. Este método es conveniente para obtener extractos crudos de las plantas. El

material seco se posa en una cámara central y el solvente se hace evaporar en caliente, en un recipiente inferior, el vapor del solvente asciende al condensador y gotea sobre el material vegetal (Bruneton, 2001).

Percolación. Es el método más utilizado para la preparación de tinturas y extractos fluidos. El percolador es un recipiente cónico y somete a una ligera presión a los materiales colocados en él. Es una extracción completa de principios activos y es posible conocer la concentración exacta (Carrión y García, 2010).

Decocción. En este procedimiento se hierve la materia vegetal en agua por un tiempo variable (según sea la planta o el principio activo a extraer). Una vez hecha la decocción se enfría, se cuela y se añade suficiente agua fría a través de la materia vegetal hasta obtener el volumen deseado (Carrión y García, 2010).

Infusión. Es el proceso en cual se somete las partes de la planta a utilizar previamente humedecida al contacto con el solvente a una temperatura igual a la de ebullición del agua, se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se filtra mediante un tamiz o papel de filtro (Carrión y García, 2010).

Digestión. Es una forma de maceración, con ligero calentamiento durante el proceso de extracción, siempre que esta temperatura no altere los principios activos del material vegetal. Este proceso se aplica con aquellas partes más duras, o que contienen sustancias poco solubles (Carrión y García, 2010).

Determinación de Metabolitos Secundarios.

Tamizaje Fitoquímico. El tamizaje fitoquímico permite detectar los metabolitos secundarios presentes en las especies vegetales. Es una prueba cualitativa y su fundamento son las reacciones químicas, ya sea de precipitación o colorimétricas. La aparición de un precipitado o cambio de color indica la presencia de algún metabolito. Estos metabolitos pueden ser: aceites esenciales, ácidos grasos, alcaloides, cumarinas, esteroides, flavonoides, saponinas, taninos y triterpenos, entre otros (Quispillo, 2013).

Ensayo de Wagner. Permite identificar alcaloides de los extractos de la planta, se le añade ácido se calienta suavemente y dejar enfriar. Luego se le añade gotas del reactivo de Wagner, si se observa los precipitados y un color marrón indica que la reacción es positiva (Quispillo, 2013).

Ensayo de Dragendorff. Esta prueba determina alcaloides de los extractos de la planta, que se mezclaran con ácido clorhídrico, en ausencia del solvente orgánico se mezcla con una gota de reactivo. Si se observa opalescencia, turbidez definida y precipitado coposo, entonces se considera positiva (Soto, 2015).

Ensayo de Borntrager. Es útil para detectar la presencia de quinonas. Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo, el ensayo se considera positivo (naftaquinona y antraquinona). Un ensayo no excluye la presencia de quinonas, ya que pueden encontrarse en forma de glicósidos, siendo necesaria la hidrólisis previa de los mismos para su posterior detección (Soto, 2015).

Ensayo de la Espuma. Permite reconocer la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroideal como triterpénica. El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de 2 minutos (Canepa, 2018).

Ensayo de Shinoda. Permite reconocer la presencia de flavonoides. Se trata con limaduras de magnesio, se le aplica calor y luego agregar unas gotas de ácido clorhídrico concentrado por las paredes. El ensayo se considera positivo cuando se colorea de amarillo, naranja, rojo, rosa, rosa-azul a violeta (Canepa, 2018).

Ensayo de Liebermann-Burchard. Este ensayo permite identificar la presencia de triterpenos y compuestos esteroidales. Observándose cambios de coloración de azul a azul verdoso para compuestos esteroidales. Mientras que para los triterpenoides color rojo, rosado o púrpura indicando positivo (Soto, 2015)

Ensayo de Baljet. Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamientos lactónicos, en particular cumarinas, aunque otros compuestos láctonicos pueden dar también positivo este ensayo. En estas condiciones se considera la presencia de esta familia de compuestos por la aparición de una coloración y un precipitado rojo (Quispillo, 2013).

Ensayo de la gelatina. Esta prueba permite detectar taninos, ya que estos poseen la propiedad de reaccionar con las proteínas presentes en el reactivo gelatina-sal y formar un precipitado de color blanco (Ochoa y Sarmiento, 2018). Si al tratar el extracto con solución al 1 % de gelatina en NaCl al 1 %, se produce la precipitación, el extracto contiene taninos (Marcano y Hasegawa, 2002).

Ensayo de $FeCl_3$. Los compuestos fenólicos se detectan por la coloración parda que producen en presencia de una solución de cloruro férrico al 1 %. Para ello el extracto total es evaporado a sequedad y filtrado antes de la reacción con cloruro férrico. Si los fenoles están presentes producen una coloración marrón (Marcano y Hasegawa, 2002).

Toxicidad

La toxicidad es la capacidad inherente de una sustancia química de producir efectos adversos en los organismos vivos. Tales efectos de deterioro pueden ser de tipo funcional, lesiones patológicas que afectan el funcionamiento del organismo y reducen su capacidad de respuesta a factores de riesgo o estrés. De acuerdo con el tiempo de exposición para que se llegue a manifestar el efecto tóxico o de la duración del mismo, éstos se dividen en dos grupos: agudos y crónicos (Klaassen, 2008).

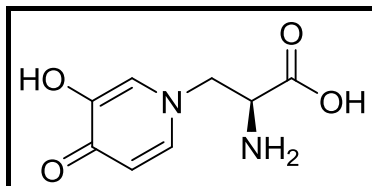
La toxicidad aguda o inmediata produce efectos tóxicos observados con una exposición única de corta duración (menos de 24 horas en animales de laboratorio). Se percibe por medio de la dosis o concentración letal 50 (DL_{50} o CL_{50}), los efectos irritantes y corrosivos para la piel y ojos y la sensibilización. Por su parte, la toxicidad crónica o a largo plazo se refiere a los efectos tóxicos observados luego de la administración de una sustancia tóxica por períodos entre 6 meses y 2 años, y al menos en tres dosis distintas. Se clasifica en positiva o negativa según la presencia o ausencia del efecto y se consideran los siguientes efectos: neurotoxicidad, genotoxicidad, carcinogenicidad, efectos reproductivos, entre otros (Córdoba, 2000).

Toxicidad del género *Leucaena*.

Las semillas y hojas de *Leucaena* contienen ácido β -[N-(3-hidroxi-4-oxipiridil)]- α -aminopropiónico; L-mimosina o mimosina, (Figura 9) aminoácido no proteico tóxico para los mamíferos (García, 2019). Las manifestaciones clínicas de toxicidad por ingerir *Leucaena* incluyen alopecia, mal estado corporal, infertilidad, bajo peso al nacer, disfunción de la glándula tiroides, formación de cataratas, toxicidad en el hígado, riñón y sistema nervioso central. Estos síntomas se han reportado en una amplia gama de especies, incluidos los humanos, rumiantes domésticos, caballos, roedores y pollos. En los animales se puede presentar bocio. Los efectos sobre la reproducción incluyen mortalidad embrionaria precoz y muerte perinatal. La toxicosis puede ser aguda o crónica y conllevar incluso a la muerte (Valle y Lucas, 2000).

Figura 9.

Estructura de la mimosina.



Determinación de toxicidad sobre Artemia salina.

Artemia salina, es un artrópodo, crustáceo, acuático primitivo, también llamado camarón amarillo, son camarones minúsculos de cuerpo blando, de color carmelita y transparente a la luz. Está conformado por tres segmentos que corresponden a cabeza, tórax y abdomen, miden alrededor de 10 mm, y su color depende de las concentraciones de sal, se desarrollan en lagos y estanques con altas concentraciones de sal, además, sobreviven en aguas con deficiencia de oxígeno (Figura 10). El crustáceo de *A. salina* vive en aguas hipersalinas, salobres y pueden crecer a temperaturas entre 6 y 35 °C, se alimentan de algas y bacterias, además son fuentes de alimento para peces, pájaros y varios invertebrados. Las hembras producen huevos que, en condiciones externas favorables, eclosionan produciendo larvas de un tamaño aproximado de 1 mm. Los huevos también pueden formar quistes y permanecer en esta forma por un año o más. La *Artemia* en condiciones favorables, se convierten en adultos transcurridas 6 a 8 semanas, alcanzando un tamaño promedio de 7 mm (Pino y Lazo, 2010).

Figura 10.

Artrópodo de Artemia salina



Fuente: Rosa (2014).

Los nauplios o larvas de este crustáceo, actúan como un indicador natural en la presencia de toxicidad en las fuentes donde se desarrollan, estos son altamente sensibles a una gran variedad de sustancias químicas y extractos de plantas con actividad biológicas, por lo tanto, son útiles para medir el potencial tóxico de una sustancia. Este organismo también es empleado como indicador en estudios ambientales, tamizajes de toxinas ambientales y naturales (Melo, Ortega y Rico, 2021). Están constituido por especies como *Artemia salina* Leach, *Artemia urmiana*, *Artemia persimilis* Piccinelli y *Prosdocimi*, *Artemia franciscana* (Pino y Lazo, 2010).

Este bioensayo de toxicidad *in vivo* es un método rápido, simple y de bajo costo, y ha presentado una buena correlación con la citotoxicidad de algunas líneas celulares tumorales, sin embargo, no representa un medio eficaz para la predicción de la actividad antitumoral (Pino y Lazo, 2010). El procedimiento consiste, en exponer los compuestos activos y los extractos naturales, a los nauplios de *A. salina* para determinar valores de dosis letal 50 (DL₅₀), de los cuales se considera como extractos tóxicos, aquellos con una $DL_{50} \leq 30 \mu/L$. Los valores obtenidos de DL₅₀ no advierte una actividad fisiológica o biológica en particular, solo son indicadores de toxicidad a nivel celular que pueden orientar investigaciones más específicas (Melo, Ortega y Rico, 2021).

Definición Operacional de Términos

Macronutrientes

Son considerados macronutrientes aquellos compuestos o nutrientes que el organismo necesita en cantidades relativamente grandes para el buen funcionamiento, se incluyen en esta categoría las proteínas, los hidratos de carbono simples y complejos, y los lípidos. También suelen ser llamados nutrientes proveedores de energía (FAO, 2015).

Micronutrientes

Son compuestos o nutrientes que el organismo necesita en cantidades relativamente menores. Estos no proveen energía al organismo sino son imprescindibles para facilitar muchas reacciones químicas que ocurren en el cuerpo. Se incluye en esta categoría los minerales y vitaminas, también suelen ser llamados oligonutrientes (Teijón, Garrido, Blanco, Villaverde, Mendoza y Ramírez, 2006).

Metabolito

Son sustancias originadas por la transformación metabólica de los alimentos en el interior de las células o de los seres vivos, se puede referir al producto que queda después de la descomposición de un fármaco por parte del cuerpo. El primer metabolito de la ruta suele denominarse sustrato; el último, metabolito final o producto, y el resto, metabolitos intermediarios (Gil, 2010).

Extractos

Es una la sustancia obtenida de una parte de la materia prima que ha pasado o ha atravesado procedimientos químicos, a menudo usando un solvente como etanol o agua. Con la finalidad de lograr la purificación máxima del mismo en donde se logre la obtención de las bases químicas más importantes o la esencial (Carrión y García, 2010).

Forraje

Son plantas que la consumen los herbívoros y rumiantes, debe tener cierto valor nutritivo y estar disponible para los animales. Cualquier planta con las siguientes características, puede considerarse forrajera: Tener aceptabilidad por los animales, estar accesible y que constituya una fuente importante de nutrientes (Lima, 2004).

Toxicidad

Es la capacidad de alguna sustancia química de producir efectos perjudiciales sobre un ser vivo, al entrar en contacto con él (Moreno, López y Corcho, 2000).

Mortalidad

Expresa la dinámica de las muertes acaecidas en las poblaciones a través del tiempo y el espacio, y sólo permite comparaciones en este nivel de análisis (Moreno, y col., 2000).

Letalidad

Es la proporción de casos de una enfermedad que resultan mortales con respecto al total de casos en un periodo especificado (Moreno y col., 2000).

Dosis letal 50

Es la dosis que causa la muerte al 50 % de los individuos que la reciben (García, Valverde, Agudo, Novales y Luque, 2019).

Operacionalización de las Variables

La operacionalización de las variables se emplea en la investigación científica para designar al proceso mediante el cual se transforma la variable de conceptos abstractos a

términos concretos, observables y medibles, es decir, dimensiones e indicadores; por lo general se representa en un cuadro (Arias, 2006). En esta investigación se medirán la variables dependientes e independientes que no admiten valores intermedios (discretas) y algunas continuas con dimensiones politómicas. El nivel de medición será nominal, los indicadores derivaran de las bases teóricas. El proceso de la operacionalización de las variables garantizará que los objetivos propuestos sean alcanzados (Tabla 4).

Hipótesis

Hipótesis Alternativa (HA)

Estudios realizados sobre la especie *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (Fabaceae) perteneciente al género *Leucaena* han demostrado el alto potencial nutricional de sus partes aéreas, además de presentar una gran variedad de compuestos químicos que se relacionan con efectos farmacológicos y los usos que se le atribuyen en distintas partes del mundo. Por lo tanto, es posible que las partes aéreas de esta especie recolectadas en el estado Mérida-Venezuela, presenten interés nutricional, así como presencia de taninos, alcaloides, saponinas, triterpenos, esteroides y flavonoides en los diferentes extractos. Igualmente, el extracto etanólico obtenido de las partes aéreas de la misma, podría presentar actividad biológica sobre *Artemia salina*.

Hipótesis Nula (H0)

Estudios realizados sobre la especie *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (Fabaceae) perteneciente al género *Leucaena* han demostrado el alto potencial nutricional de sus partes aéreas, además de presentar una gran variedad de compuestos químicos que se relacionan con efectos farmacológicos y los usos que se le atribuyen en distintas partes del mundo. Por lo tanto, es posible que las partes aéreas de esta especie recolectadas en el estado Mérida-Venezuela, no presenten interés nutricional, así como ausencia de taninos, alcaloides, saponinas, triterpenos, esteroides y flavonoides en los diferentes extractos. Igualmente, el extracto etanólico obtenido de las partes aéreas de la misma no podría presentar actividad biológica sobre *Artemia salina*.

Tabla 4.

Operacionalización de la Variable Dependiente e Independiente

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional ¿Cómo se mide?	Dimensiones	Indicador
Composición nutricional	Independiente Cuantitativa Continua	La composición nutricional es la contribución de un alimento basada en sus componentes esenciales (proteínas, lípidos, hidratos de carbono, minerales, vitaminas, entre otros) que son aportados al contenido de la dieta (Hernández y Sastre, 1999).	Se mide a través del análisis proximal, el cual nos da un valor general de los componentes nutricionales de la planta (AOAC, 2000).	Presencia de humedad, proteínas, lípidos, carbohidratos y minerales (cenizas).	Porcentaje de humedad, proteínas, lípidos, carbohidratos y cenizas.
Composición química	Independiente Cualitativa Nominal	Son todas aquellas sustancias que se producen durante el metabolismo de las plantas, también conocidas como metabolitos (Ayala, 2006).	A través del tamizaje fitoquímico que nos permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta (Bruneton, 2001).	Presencia de terpenos, compuestos fenólicos, alcaloides, quinonas, entre otros.	Aparición de precipitados, coloración, espuma y fluorescencia.
Toxicidad frente a <i>Artemia salina</i>	Dependiente Cuantitativa Continua	Es un ensayo que permite evaluar la toxicidad de extractos y productos aislados de plantas sobre larvas de <i>Artemia salina</i> , que son sensibles a gran variedad de compuestos químicos (Jaramillo y col., 2016).	Mediante la exposición de los nauplios de <i>Artemia salina</i> a los extractos naturales, para determinar valores de dosis letal 50 (DL ₅₀).	Extremadamente tóxico. Altamente tóxico. Moderadamente tóxico Ligeramente tóxico Prácticamente no tóxico Relativamente inocuo	% de letalidad Valores de DL ₅₀

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

Hurtado (2010), expresa que "El tipo de investigación se refiere a la clase de estudio que se va a llevar a cabo. Orienta sobre la finalidad general del estudio y sobre la manera de recoger los datos necesarios. En tal sentido, los tipos de investigación pueden ser: exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa" (p.195). Luego de analizar los conceptos de cada uno de los tipos de investigación, se determinó que la presente fue de tipo confirmatoria, ya que, se confirmó la relación entre el potencial nutricional, la composición química y la toxicidad de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (Fabaceae).

Diseño de Investigación

El diseño de investigación comprende las estrategias necesarias para recolectar los datos. Específicamente, se consideran estrategias relacionadas con el dónde, cuándo y la amplitud de la información que se recolectará (Hurtado, 2010). Con respecto al dónde, el diseño fue experimental. Asume un diseño experimental porque se manipuló la variable independiente para lograr efecto en la variable dependiente. Con respecto al cuándo o temporalidad, fue contemporánea y transeccional porque se estudió el evento en el presente y en un único momento en el tiempo. En relación a la amplitud, se consideró unieventual debido a que se analizó una variable dependiente y una independiente.

Población y muestra

Unidad de Investigación

Según Hurtado (2010), la población es el conjunto de seres que poseen características o eventos de interés, enmarcados dentro de criterios de inclusión, que según su extensión, puede ser finita o infinita, requiriéndose la selección de una muestra. En correspondencia con el enunciado anterior, la población de la presente investigación se presentó infinita, la cual correspondió a la planta *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (Fabaceae).

Selección del tamaño de la muestra

La muestra es un subconjunto representativo de un universo o población (Arias, 2006). Además, existe la muestra de tipo no probabilística, cuya selección no depende de que

todas las partes tengan la misma probabilidad de ser elegidas, sino queda a consideración del investigador (Hernández y cols., 2010). Por lo tanto, la muestra de esta investigación estuvo integrada por la recolección de 1 Kg aproximadamente de hojas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (Fabaceae).

Sistema de Variables

Las variables relacionadas con el propósito de esta investigación fueron las siguientes: Variable dependiente (VD): Toxicidad frente a *Artemia salina* (VI): Potencial nutricional y composición química de *Leucaena leucocephala*. Estas variables correspondieron a los núcleos semánticos del problema de investigación y a la vez, permitieron la verificación del fenómeno de estudio en la unidad de investigación.

Instrumento de Recolección de Datos

"Un instrumento permite recolectar los datos para medirlos posteriormente, a través de modelos matemáticos" (Pérez, 2009). Por lo cual, el instrumento de recolección de los datos fueron tablas de resultados y listas de cotejo, las cuales son una herramienta que indica la presencia o no de un aspecto o conducta que son medidas y/o visualizadas (Arias, 2006).

Procedimiento de la Investigación

Recolección y Preparación del Material Vegetal

Las partes aéreas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit se recolectaron en la Parroquia Domingo Peña, Sector Campo de Oro, detrás del IAHULA. A una altitud de 1630 m.s.n.m. Se podó la planta, garantizando que el material vegetal no estuviera seco ni deteriorado. Se tomó aproximadamente un kilogramo (1 Kg) de partes aéreas de la planta. Luego las hojas se resguardaron en una bolsa plástica para su almacenamiento y traslado (Figura 11).

La planta fue identificada botánicamente por el Prof. Pablo Meléndez González, Director- Curador Herbario MERF, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Igualmente, se depositó una muestra para el váucher en el herbario MERF "Dr. Luis Enrique Ruiz Terán" de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Municipio Libertador Estado Mérida (Figura 12). El resto del material recolectado, fue llevado al Departamento de Ciencias de Los Alimentos de la

Facultad de Farmacia y Bioanálisis de La Universidad de Los Andes, para su posterior análisis (Figura 13).

Figura 11.

Planta Leucaena leucocephala



Figura 12.

Váucher de la muestra de Leucaena leucocephala, depositada en el Herbario MERF

 UNIVERSIDAD DE LOS ANDES FACULTAD DE FARMACIA MÉRIDA - VENEZUELA HERBARIO	Fecha: 22-08-2022	Colectore Annelsy Molina	Número: 01
	DET.: Dr. Pablo Meléndez		
LEGUMINOSAE (MIMOSOIDEAE)			
<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) Dewitt Tiene hojas compuestas bipinnadas, divididas en pequeñas hojuelas, 8-10 mm. Flores blancas de forma globular de aproximadamente 2,5 cm. y frutos constituidos por vaina o legumbres planas y alargadas de color pardo. Localidad. Venezuela, Edo. Mérida, Municipio Libertador, Parroquia Domingo Pena, sector Campo de Oro, detrás del I.A.H.U.L.A Altitud. 1630 m.s.n.m. aproximadamente			

Figura 13.

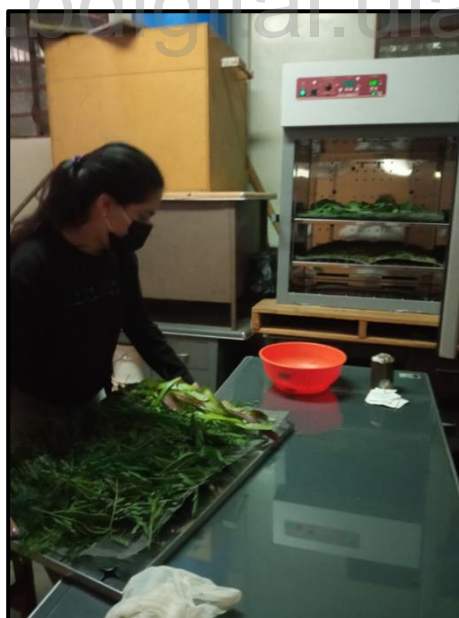
Material vegetal recolectado



El material vegetal recolectado se secó en estufa a 45 °C por 24 horas (Figura 14). Posteriormente, se molió y peso en la balanza electrónica Danver Instruments modelo XE-4100, del cual se obtuvo 312, 2 g de material seco y molido. Este se almaceno en un lugar seco y a temperatura ambiente.

Figura 14.

Secado del material vegetal



Análisis Proximal de la Leucaena leucocephala

Se realizó en el Departamento de Ciencias de los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, bajo la supervisión del Dr. Tomas Visbal y la Dra. Marielba Morillo.

Procedimiento.

Determinación de Humedad. Para la determinación de la humedad se pesaron tres porciones de muestra previamente molida, en capsulas de vidrio, cuyos pesos fueron 3,1496 g, 3,343 g y 3,113 g. Luego se colocaron las muestras en una estufa a 100 ± 5 °C por 24 horas. Posteriormente, se dejó enfriar las muestras en un desecador (Figura 15). Seguidamente se pesó nuevamente la materia prima desecada hasta que no hubo diferencia de peso entre las dos últimas mediciones (peso constante) (AOAC, 2000).

Cálculos

$$\% H = \left(\frac{PCM - PCF}{PM} \right) * 100$$

Dónde:

% H= Contenido de humedad.

PCM= Peso del crisol con muestra (g)

PCF= Peso del crisol final (g)

PM= Peso de la muestra (g)

Figura 15.

Enfriamiento de la muestra en desecador



Determinación de Cenizas. En un crisol de porcelana, se colocaron 3,43, 3,1301 y 2,9645 g de la muestra seca, la cual fue carbonizada en un mechero bajo campana de extracción (Figura 16). Luego se colocó el crisol en una mufla y se incineró a 600 °C por

24 horas, hasta la obtención de cenizas. Se dejó enfriar y se colocó en un desecador. Finalmente, se pesó nuevamente el crisol conteniendo la ceniza (AOAC, 2000).

Cálculos

$$\% C = \left(\frac{PCF - PCV}{PM} \right) * 100$$

Dónde:

% C= Contenido de ceniza

PCF= Peso del crisol final (g).

PCV= Peso del crisol vacío (g).

PM= Peso de la muestra (g).

Figura 16.

Quema de la muestra



Determinación de Proteínas. Se pesaron 0,1 g de muestra, se sometió a digestión con ácido sulfúrico concentrado (96 a 98 %) y catalizador (sulfato cúprico pentahidratado + sulfato de sodio) esta mezcla se colocó en tubos para digestión y se llevó a un digestor electrónico, hasta que la muestra se digirió completamente (la muestra se tornó color verde esmeralda claro) (Figura 17).

Seguidamente se procedió a llevar la muestra a un microdestilador. En el equipo el contenido de nitrógeno total bajo la forma de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, reaccionó con una solución concentrada de hidróxido de sodio (40 %), el amoníaco liberado se recolectó en una

solución al 4 % (ácido bórico), originando borato de amonio, que se tituló directamente con ácido clorhídrico 0,02 N, usando el indicador de Tashiro (Figura 18) (AOAC, 2000).

Cálculos

$$\% N = \frac{VG_{HCl} * N * 14}{10 * PM}$$

$$\% P = \% N * \text{Factor } 6,25$$

Dónde:

% N= Nitrógeno en la muestra

% P= Proteína cruda

VG_{HCl} = Volumen de Ácido clorhídrico (mL) gastado en la titulación

N= Normalidad del ácido estándar

PM= Peso de la muestra (g)

Figura 17.

Digestión de proteínas



Figura 18.

Destilación y titulación



Determinación de Grasas.

Método de extracción de grasa con equipo VELP 148. Tres gramos de muestra se colocaron en un cartucho de algodón (celulosa). Posteriormente, se pesó las copas de extracción con perlas de vidrio (PBV) (previamente limpias, rotuladas y taradas). Seguidamente, se procedió a montar las muestras en el equipo, conectando los adaptadores metálicos a los cartuchos de algodón y se colocaron en la parte imantada, según se rotularon, se orientaron las palancas frontales en posición de inmersión, se le agregó 50 mL de éter de petróleo a las copas de extracción y se colocaron centradas en el plato correspondiente, una vez rotuladas. Se cerró el sistema con la palanca de sellado (Figura 19).

Cálculos

$$\%G = \frac{PBG - PBV}{PM} * 100$$

Dónde:

%G= Contenido de lípidos crudos

PBV= Peso del balón vacío limpio y seco (g)

PBG= Peso del balón con grasa (g)

PM= Peso de la muestra (g)

Figura 19.

Determinación de grasas



Seguidamente, se procedió a iniciar el programa N° 1, comenzando el tiempo de inmersión (30 min.) de la muestra. Cuando terminó el tiempo de inmersión, el equipo produjo una alarma y se procedió a bajar las palancas frontales y se colocó el equipo en lavado (60 min.) Al terminar el tiempo de lavado, el equipo nuevamente avisó. Se procedió a colocar las palancas frontales en recuperación ($\pm$ 30 min.), dando un giro hacia la derecha de las llaves para recuperar el solvente. Finalizada la recolección del solvente que depende del tiempo de acuerdo a la muestra, se abrió el sistema de sellado hermético llevando las copas de extracción a la estufa a 100 °C durante 10-15 min., luego estas se colocaron en el desecador por un tiempo de 30 min., antes de proceder a pesar (PBG) y obtener el extracto graso (Vielma, 2018).

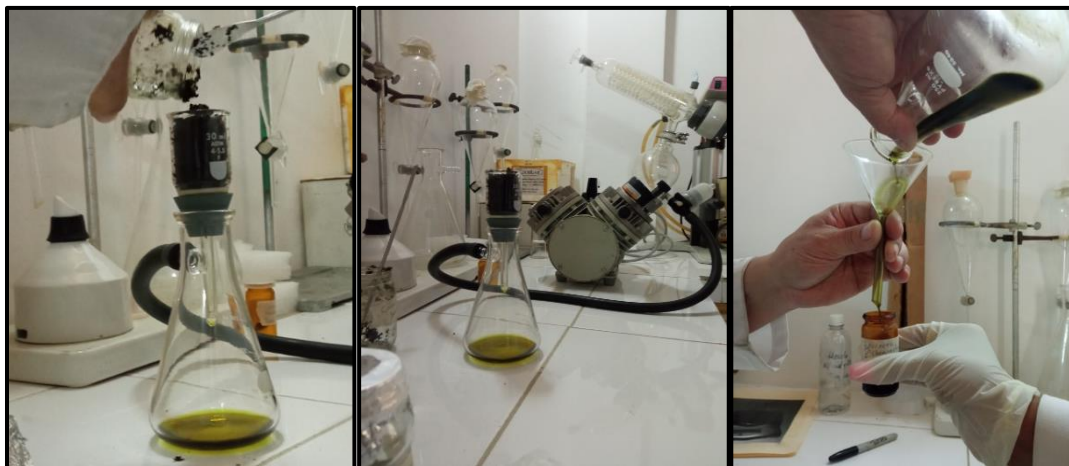
Análisis Fitoquímico de *Leucaena leucocephala*

Se realizó la preparación de los extractos etanólicos, hexanólicos y en diclorometano (DCM) en el Departamento de Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, bajo la supervisión de la Dra. Marielba Morillo y Dr. Tomas Visbal. Del material seco y molido, se tomaron tres porciones de la materia vegetal en tres envases de vidrio por separado para cada uno de los solventes. La cantidad de muestra se obtuvo por

diferencia de peso (extracto etanólico: 19,62 g; seguido del extracto diclorometano: 12,20 g y extracto hexanoico: 11,28 g) (Figura 20).

Figura 20.

*Preparación de los extractos de las partes aéreas de *Leucaena leucocephala**



El extracto se obtuvo por el método de maceración, en el cual se agregaron por separado 30, 40 y 50 mL de solvente Hexano, Diclorometano y Etanol, respectivamente. Posteriormente, se llevaron a la estufa, protegidos de la luz durante tres días consecutivos. Luego se filtraron y se evaporaron para recuperar los solventes, cada uno de los extractos se almacenaron en frascos herméticamente tapados, previamente rotulados y tarados. Para la identificación cualitativa de los grupos de metabolitos secundarios presentes en cada extracto, se procedió como sigue:

Alcaloides (Ensayo de Dragendorff, Wagner y Mayer). Del extracto etanólico se pesaron 100 mg y se le adicionaron 10 mL de HCl al 10 %. Seguidamente el tubo de reaccion se colocó en baño de maria hasta ebullición por 30 minutos. Luego, el contenido del tubo se filtró. El material obtenido se distribuyó en 3 tubos de ensayo para cada uno de los ensayos para la determinación de alcaloides. A cada fracción separada se adicionó unas gotas del reactivo correspondiente (Dragendorff, Wagner y Mayer). Se observó la positividad de la prueba mediante la aparición de turbidez o precipitado en cada uno de los tubos.

Terpenos y/o esteroides (Ensayo de Lieberman-Buchard). Los tres extractos se disolvieron en 0,5 mL de diclorometano o cloroformo. A cada uno de estos se les añadió

0,5 mL de anhídrido acético. Posteriormente se le adicionó cuidadosamente por las paredes del tubo gotas de ácido sulfúrico concentrado. La prueba se consideró positiva mediante la presencia de una coloración roja (*terpenos*) y verde (*esteroles*).

Saponinas (Prueba de la espuma). De cada uno de los extractos se colocó una pequeña cantidad en un tubo de ensayo y se les adicionó 1 mL de agua. Este se agitó vigorosamente durante 1 minuto, con la finalidad de generar espuma. Luego, se midió la altura de la espuma, en milímetros, al principio y 5 minutos después de haber dejado en reposo. La positividad de la prueba para saponinas se consideró positiva según la altura alcanzada por la espuma transcurrido el tiempo de reposo. Se interpretó como pobre (negativa), si la altura es aproximadamente de 3 mm, de 6 mm moderada y mayor o igual a 8 mm abundante.

Polifenoles (Prueba de FeCl_3). Los extractos diclorometanoico y etanólico se disolvieron en 1 mL de solución alcohólica, a la cual se le agregó una gota de solución acuosa de cloruro férrico al 10 %. La formación de color azul o verde indicó la presencia de fenoles.

Taninos (Prueba de la gelatina). El extracto etanólico se disolvió en agua. Esta se puso en contacto con una solución de gelatina al 10 %. Se esperaba la presencia de un precipitado o la ruptura de la gelatina, para considerar la prueba positiva. La ausencia de la misma, se consideró negativo para taninos.

Flavonoides (Ensayo de Shinoda). Los extractos se disolvieron en etanol. Luego, se les añadió algunas virutas de Mg. Seguidamente, se añadieron unas gotas de HCl concentrado, cuidadosamente por la pared del tubo. La prueba se consideró positiva por la aparición de coloraciones rojo o naranja.

Quinonas (Ensayo de Borntrager). Al extracto etanólico disuelto en etanol, se le adicionó 2 gotas de hidróxido de amonio al 25 %. Después de dos minutos, se esperaba un viraje de color a rojo en presencia de quinonas.

Evaluación de la toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina*

La determinación de la toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina* se realizó en el Departamento de Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, bajo la supervisión del Dr. Tomas Visbal y la Dra. Marielba Morillo. En la Figura 21, se

muestra el procedimiento para la determinación de la toxicidad de los extractos etanólicos de *Leucaena leucocephala*, sobre nauplios de *Artemia salina*.

Figura 21.

Protocolo para la determinación de ecotoxicidad en Artemia salina

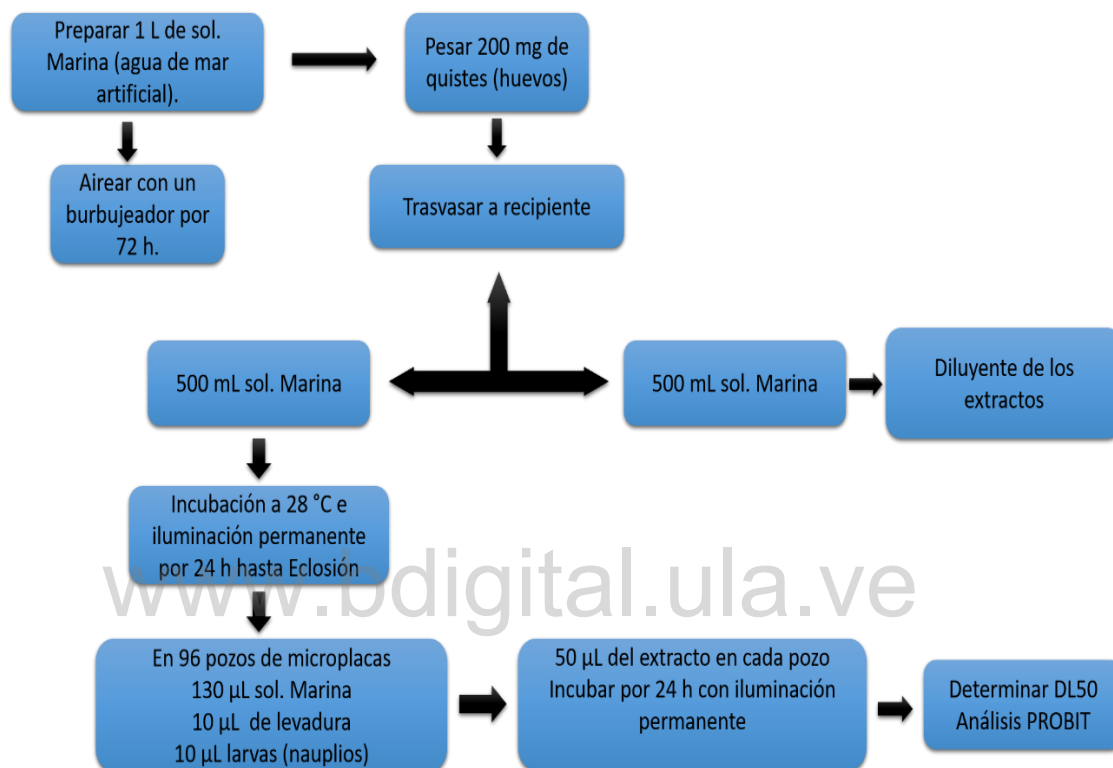


Figura 22.

Preparación del agua de mar artificial

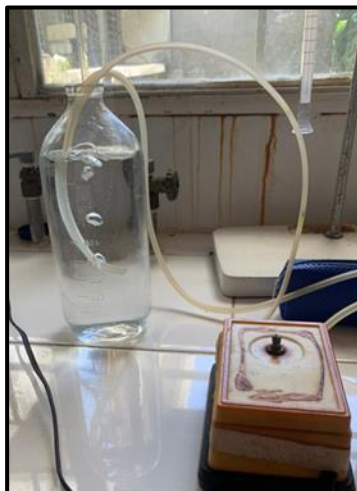


Tabla 5.

Preparación del agua de mar artificial, usada en el cultivo y eclosión de los quistes del crustáceo Artemia salina

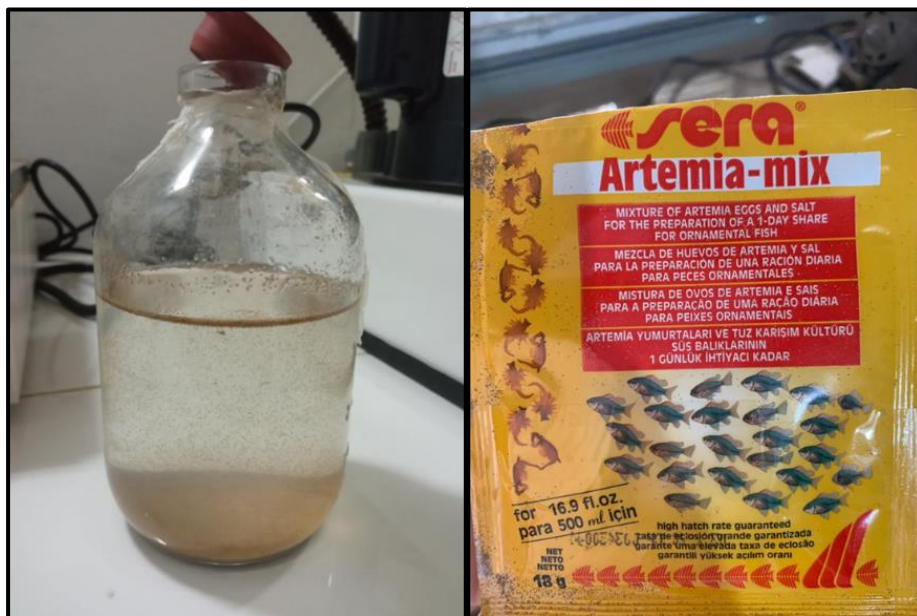
Sales	g/L
Cloruro de sodio (NaCl)	27,65
Sulfato de magnesio hexahidratado ($MgSO_4 \cdot 6H_2O$)	14,29
Cloruro de magnesio hexahidratado ($MgCl \cdot 6H_2O$)	5,18
Cloruro de potasio (KCl)	0,697
Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$)	0,143
Carbonado de sodio (Na_2CO_3)	0,035
Cloruro de calcio $CaCl_2$	1,54
Agua destilada estéril	1000 mL

Fuente: (Kester y cols., 1967).

Eclosión de los quistes. Una vez transcurrido el tiempo de aireación de la solución marina, se dividió la solución en dos recipientes (erlenmeyer) con 500 mL aproximadamente en cada uno; en uno de los erlenmeyer, se añadió entre 150-200 mg de quistes, manteniendo una temperatura constante de 28 ± 2 °C por 48 horas (tiempo necesario para su eclosión) (Figura 23). La solución marina contenida en el otro erlenmeyer, se utilizó como diluyente para extractos y llenado de las placas (ambos recipientes se mantuvieron con aireación constante).

Figura 23.

Eclosión de los quistes de Artemia salina



Ensayo de toxicidad general

El bioensayo se realizó en placas de microtitulación de 96 pozos; a cada pozo se le adiciono 130 μL de solución salina (aireada), para luego colocar en cada pozo, aproximadamente, quince (15) larvas con ayuda de una micropipeta. Para facilitar la atrapada de los nauplios, para tal fin, se iluminó un sector del envase que contenían las mismas, hasta concentrar las larvas en esa zona y facilitar su recolección (aprovechando su fototropismo). El volumen agregado de solución marina con larvas, fue de 10 μL . Posteriormente a cada pozo se le añadió 10 μL de levadura comercial (5 mg/mL). Estas placas fueron incubadas en un área con iluminación permanentemente por 24 horas, para excitar su actividad metabólica.

Transcurrido el tiempo de incubación, se colocaron 50 μL de cada dilución de extracto etanólico de *L. leucocephala* a evaluar, a distintas concentraciones (5; 25; 250; 750; 1250; 2500 $\mu\text{g/mL}$). El extracto usado para el ensayo debe ser el etanólico, ya que el etanol es considerado como un solvente polar, el cual es capaz, por presentar un grupo OH en su estructura química, de formar puentes de hidrogeno y disociarse con el agua. Los extractos se diluyeron en dimetilsulfóxido (DMSO) y solución marina (1:9). Se incluyó, además, un grupo control negativo (con todos los elementos del ensayo, excepto la muestra a ensayar)

y un grupo control positivo Dodecil sulfato de sodio [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{O}\text{SO}_3\text{Na}$] (DSS 10 %), con seis replicas para cada grupo (Figura 24).

Figura 24.

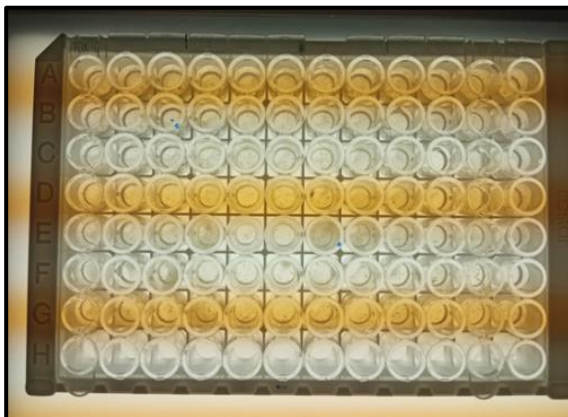
Preparación de las placas de microtitulación



Durante el bioensayo se registraron el número de nauplios puestos inicialmente en cada pozo (nauplios vivos: NV), y al cabo de 24 horas de contacto con los extractos ensayados se realizó el conteo del número de nauplios muertos (NM) para determinar el porcentaje (%) de letalidad y la dosis letal 50 (DL_{50}) (Figura 25).

Figura 25.

Contaje de letalidad de nauplios de Artemia salina



Además, se calculó el porcentaje de letalidad mediante la ecuación (Apu, Khatun, Bhuyan y Liza, 2013).

$$\% \text{ letalidad} = \left(\frac{NM}{NV} \right) * 100$$

Dónde:

NM: Número de nauplios muertos

NV: Número de nauplios vivos

Finalmente, la DL_{50} de los extractos y de los blancos evaluados se clasificó según la toxicidad, tomando como referencia las recomendaciones del programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) (Tabla 6).

Tabla 6.

Clasificación de toxicidad según CYTED

Categoría	Concentración DL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Extremadamente toxico</i>	<i>1-10</i>
<i>Altamente toxico</i>	<i>10-100</i>
<i>Moderadamente toxico</i>	<i>100-500</i>
<i>Ligeramente toxico</i>	<i>500-1000</i>
<i>Prácticamente no toxico</i>	<i>1000-1500</i>
<i>Relativamente inocuo</i>	<i>>1500</i>

Fuente: (Sánchez y Neira, 2005).

Diseño de Análisis

Los datos recolectados fueron analizados a través de enfoque cuantitativo. Asimismo, el dato fue medido numéricamente con la finalidad de ser analizados por medio de modelos matemáticos (Palella y Martins, 2012). La naturaleza de las variables que se midieron fue de tipo cualitativa o cuantitativa.

Por tal motivo, las variables cualitativas se midieron mediante una escala nominal y ordinal. Por el contrario, las variables cuantitativas se midieron mediante una escala de intervalo y de razón.

Variables Estadísticas

Las variables estadísticas de esta investigación serán clasificadas desde su naturaleza y escala de medida. El fin es identificar el indicador estadístico pertinente (Tabla 7).

Sistematización de los Resultados

Igualmente, en el presente estudio los datos obtenidos en las mediciones permitieron elaborar tablas para el análisis correspondiente para este fin. Esta información se trasladó a un archivo de Microsoft excel versión 2016. Una vez generada la base de datos, se determinó el % de letalidad, para el cálculo de DL_{50} . Además, se realizó un análisis de regresión PROBIT, para tal fin, se utilizó el programa estadístico IBM SPSS versión 25.

Tabla 7.

Variables estadísticas según la naturaleza, escala de medida e indicadores estadísticos.

Variables	Tipo de variables			Escala de medida				Indicador Estadístico
	Cualitativa	Cuantitativa		Nominal	Ordinal	Intervalo	Razón	
		Discreta	Continua					
Potencial nutricional	No	No	Si	No	No	Si	No	Frecuencias absolutas y valores relativos Medidas de tendencia central y dispersión
Toxicidad	No	Si	No	No	No	Si	No	Frecuencias absolutas y porcentajes Medidas de tendencia central y dispersión

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Análisis proximal de la harina de *Leucaena leucocephala*

Se llevó a cabo una serie de pruebas para conocer la composición química proximal de la harina de *Leucaena leucocephala* (Tabla 8). El análisis bromatológico reveló que la harina de *L. leucocephala*, en base seca, tiene en promedio 24,33 % de proteínas, un alto contenido de carbohidratos 66,7 % y cenizas de 7,22%. Además, se pudo determinar que la harina de *Leucaena* presentó un bajo contenido de lípidos y humedad.

Tabla 8.

Composición química proximal de la harina de Leucaena leucocephala

Composición	%
Humedad	0,78 ± 0,04
Cenizas	7,22 ± 0,23
Proteínas	24,33 ± 0,31
Lípidos	0,96 ± 0,07
Carbohidratos	66,7

Los datos son expresados como el promedio de las observaciones ± su desviación estándar con n=3.

De acuerdo a la composición química de la harina de *L. leucocephala* en base húmeda reportada por Bravo y cols. (2019), los resultados del análisis proximal fueron % de: Humedad 12,87; Cenizas 1,42; Proteínas 32,1; Carbohidratos 29,91 y Lípidos 8,56; en base seca, estos resultados serían 36,84 % de proteínas, 1,63 % de cenizas, 34,33 % de carbohidratos y 9,82% de lípidos. Igualmente, García (2019), obtuvo 8,26 % de humedad, 5,23 % de ceniza y 33,27 % de proteínas en base húmeda, lo cual corresponde a un 36,27 % de proteína y 5,70 % de ceniza en base seca. Se pudo notar una gran diferencia entre los valores reportados en ambas investigaciones del contenido de proteínas, cenizas, lípidos y carbohidratos, en relación al presente estudio.

Asimismo, García y cols. (2008), obtuvieron 26,36 % de proteína cruda y 7,85 % de cenizas del follaje de diecinueve accesiones de *L. leucocephala*. Al igual que Arias (2007), quien obtuvo valores de proteína cruda superiores a los de este trabajo, alcanzando un máximo de 32,12 %. No obstante, estos resultados se relacionan con los reportados por Chamorro (2002), en % de proteína cruda en *L. leucocephala* (21,50 %), Pinto y cols. (2004), con 20,1 % de proteína cruda, Torres y cols. (2005), quienes reportaron 23 % y 24,4 % de proteína cruda de *L. leucocephala* y a los reportado por

Bravo (2019), obtuvo 21,27 % de proteína cruda y 5,37 % de ceniza. También, Urdaneta, Razz y Clavero (1998), obtuvieron 24,75% de proteína cruda y 7,96 % de ceniza. Un informe elaborado por el National Academic Science planteó valores entre 20 % y 24 % de proteína cruda en *Leucaena* (Machado y cols., 1978).

La variación en la composición nutricional en la *Leucaena* depende de factores genéticos, del perfil de aminoácidos esenciales, tiempo de almacenamiento, proceso de cocinado, de sustancias anti-nutricionales, las condiciones climáticas y geológicas, lo cual hace que las propiedades nutricionales de la leguminosa sean diferentes (Bravo y cols., 2019).

La edad tiene un marcado efecto sobre los valores nutricionales de la planta, más acentuados en el período lluvioso, al disminuir la calidad nutritiva, al incrementarse la fracción fibrosa, decrecimiento de la proteína y aumento del contenido de metabolitos secundarios. La disminución de los niveles de proteína con la edad puede deberse a los cambios fisiológicos y anatómicos que ocurren al envejecer la planta, lo cual está relacionado con la reducción de la síntesis de compuestos proteicos, debido al decrecimiento de la cantidad de hojas e incremento de la proporción de tallos. En efecto, provoca la disminución de la proporción del contenido celular citoplasmático; se reduce el lumen celular con sus componentes solubles y se incrementan los fibrosos (Verdecía y cols., 2012).

Adejumo y Ademosun (1985) y Carranco y cols. (1994), señalaron que a medida que avanza el grado de maduración de la vaina de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit., existe un incremento de los elementos estructurales, especialmente la lignina, ocasionando una correlación negativa entre la lignificación y los contenidos de proteína cruda, así como la digestibilidad. Por lo tanto, el grado de maduración de las vainas afecta el contenido de proteínas crudas y materia seca, obteniéndose una disminución significativa de la proteína y un incremento de la materia seca a medida que avanza la maduración de la vaina.

Determinación del % de rendimiento de los extractos etanólico, diclorometano y hexanoico de la *Leucaena leucocephala*

Para la determinación del % de rendimiento se utilizó la siguiente formula:

$$\% R = \frac{\text{Peso final del extracto obtenido}}{\text{Peso inicial de la muestra}} * 100$$

Tabla 9.*Resultados obtenidos del porcentaje de rendimiento*

	EE	EDCM	EH
Peso inicial (g)	19,62	12,20	11,28
Peso final (g)	0,76	0,28	0,092
% R	3,87	2,29	0,815

EE: extracto etanólico, EDCM: extracto diclorometano, EH: extracto hexanoico, % R: porcentaje de rendimiento.

Estudio fitoquímico de extractos de las partes aéreas de *Leucaena leucocephala*

Se llevó a cabo una serie de ensayos químicos para conocer cualitativamente los compuestos químicos presentes en los diferentes extractos hexanólicos, etanólico y diclorometanoico de las partes aéreas de *Leucaena leucocephala* (Tabla 10).

Tabla 10.*Estudio fitoquímico de los extractos de las partes aéreas de *Leucaena leucocephala**

Metabolitos secundarios	Pruebas	Extracto		
		Hexanoico	Diclorometanoico	Etanólico
Alcaloides	Dragendorff Wagner Mayer	nd	Nd	+++
Esteroles	Liebermann-Burchard	+++	+	+
Terpenos	Liebermann-Burchard	nd	+	+
Polifenoles	FeCl ₃	nd	+	+
Flavonoides	Shinoda	nd	-	+++
Saponinas	Prueba de la Espuma	-	+	+
Taninos	Prueba de la Gelatina	nd	Nd	-
Quinonas	Prueba de NH ₄ OH 25%	nd	Nd	-

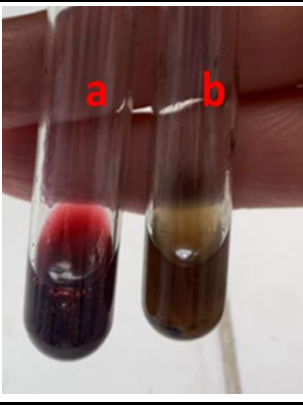
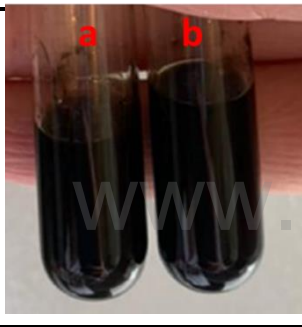
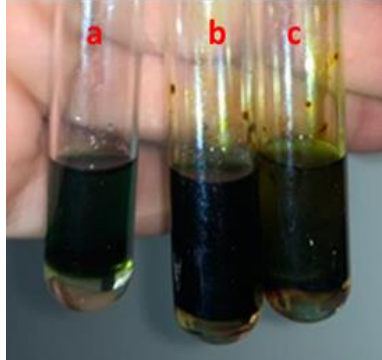
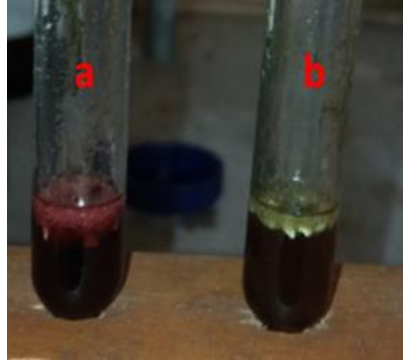
+++ Muy abundante, ++ abundante, + presente en poca concentración, -: ausente; nd= no determinado

El análisis fitoquímico preliminar reveló la presencia de varios metabolitos secundarios de interés biológico y a su vez se evidenció la alta variabilidad de compuestos presentes en los diferentes extractos, donde se observó una importante presencia de esteroles en el extracto hexanólico, aunque fue el único determinado para este extracto. Asimismo, se identificó la presencia, además de esteroles, de terpenos, polifenoles y saponinas en el extracto diclorometanoico. No obstante, el extracto etanólico fue el que presentó mayor contenido de metabolitos secundarios, entre los cuales se determinaron, alcaloides, esteroles, terpenos, polifenoles, alta cantidad de

flavonoides y saponinas. En ninguno de los extractos obtenidos se identificaron taninos, ni quinonas (Figura 26).

Figura 26.

Resultados obtenidos en el análisis fitoquímico preliminar.

		
Alcaloides Ex. Etanólico	Terpenos a. Ex. Etanólico b. Ex. DCM	Quinonas Ex. Etanólico
		
Polifenoles a. Ex. DCM b. Ex. Etanólico	Taninos Ex. Etanólico	Saponinas a. Ex. DCM b. Ex. Etanólico c. Ex. Hexanólico
		
Esteroles a. Ex. Hexanólico b. Ex. DCM c. Etanólico	Flavonoides a. Ex. Etanólico b. Ex. DCM	

Ex.: Extracto; DCM: Diclorometanoico

Los resultados del análisis fitoquímico de la presente investigación difieren de los reportados por Dago y cols. (2020), quienes a partir del tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso del follaje de *Leucaena leucocephala*, identificaron la presencia de alcaloides, aminoácidos, aminos, azúcares reductores, fenoles, taninos y flavonoides en el extracto a base de alcohol, no siendo así para los demás extractos que solo había presencia de aceites y grasas para el etéreo, además de fenoles y mucilagos para el acuoso.

Igualmente, Román y cols. (2014), estudiaron dos especies de *Leucaena*, hallando mayores concentraciones de compuestos fenólicos, antocianinas y flavonoides en *L. esculenta*, mientras que *L. leucocephala* (Lam), presentó niveles mayores de taninos condensados. Además, García (2019) encontró flavonoides en extracto metanólico. Sin embargo, presentó cantidades inferiores de fenoles.

Verdecía y cols. (2012), demostraron que la concentración de los metabolitos secundarios de *Leucaena leucocephala* varía durante el período lluvioso y la edad de la planta. Los autores reportaron un aumento en la concentración de flavonoides, alcaloides y saponinas, y disminución de taninos. Los investigadores afirman que las concentraciones de alcaloides encontrados en esta especie son cantidades importantes. Asimismo, encontraron que los niveles de taninos no permanecían estáticos y que, a su vez, las cantidades se encontraban relacionadas negativamente con la edad.

Chanwitheesuk y cols. (2005), analizaron semillas de *Leucaena leucocephala* de Tailandia reportando una concentración menor de taninos como de fenoles, estas diferencias podrían deberse al contenido de humedad en las muestras, a la metodología de análisis y al lugar de origen. En investigaciones de diferentes variedades de frijol cultivado en América y África se describe la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, antocianinas y taninos condensados (proantocianidinas). Los mecanismos de acción de cada fitoquímico en frijol se desconocen, pero el efecto sinérgico de estos bioactivos lo convierten en un alimento con propiedades funcionales notables por su calidad nutricional y el alto contenido de componentes antioxidantes (Duarte, 2012).

Sin embargo, el alto contenido de compuestos fenólicos en *Leucaena*, podría explicar la elevada actividad sequestradora de radicales libres (García, 2019), la cual fluctúa en función a la especie de *Leucaena* spp. Esto, podría deberse a factores genéticos y ambientales (Román y cols., 2014). Por lo tanto, se confirma que, a menor concentración de compuestos fenólicos totales es menor la capacidad antioxidante. En

efecto, *Leucaena leucocephala* es una especie de consumo subvalorado de alto valor nutricional y funcional (Dago y cols., 2020).

Toxicidad del extracto etanólico de las partes aéreas de *Leucaena leucocephala* frente a *Artemia salina*

La actividad ecotóxica fue evaluada mediante el porcentaje de letalidad que presentó los nauplios de *Artemia salina* frente a diferentes concentraciones del extracto etanólico de las partes aéreas de *Leucaena leucocephala*. A través de este método se logró determinar la DL₅₀ del extracto.

En la Tabla 11, se presentan los resultados de la cuantificación de la DL₅₀ de los extractos etanólicos de las partes aéreas de *L. leucocephala* y los controles sobre *Artemia salina*, obtenido por análisis de regresión Probit.

Según los datos obtenidos, el extracto etanólico de las partes aéreas de *L. leucocephala* resultaron ser moderadamente tóxicos según el CYTED, encontrándose en una concentración entre 100 y 500 ppm.

Tabla 11.

Cuantificación de la DL₅₀ de los extractos etanólicos de las partes aéreas de L. leucocephala y los controles sobre Artemia salina.

Extracto	DL ₅₀ (ppm)	Límite de confianza (95 %) ppm		Categoría según el CYTED
		Límite inferior	Límite superior	
Partes aéreas	498,658	341,692	649,718	Moderadamente tóxico
DMSO	-	-	-	Inocuo
DDSS	23,372	13,507	28,026	Altamente tóxico

DL₅₀: Dosis letal₅₀; signo (-): valores muy altos; DMSO: Dimetilsulfoxido; DDSS: Dodecil sulfato de sodio.

De La Cruz y cols. (2022), determinaron la actividad ecotóxica de extractos diclorometano: metanol de *Leucaena collinsii*, ensayado en *Artemia salina*. En cuyo estudio obtuvieron un extracto levemente tóxico frente a dicho crustáceo, con una DL₅₀ de 820,50 ± 40 µg/mL. Los autores relacionan la toxicidad a la presencia de triterpenoides identificados en el extracto. Además, esta diferencia también puede deberse al tipo de extractos analizados. En contraposición, Martínez y cols. (2011), determinaron la actividad citotóxica *in vivo* de extracto etanólico de las hojas de *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae), por medio del bioensayo sobre "camarones de mar" (*Artemia salina*). El extracto crudo mostró menor toxicidad (Concentración Letal 50 >

1.000 µg/mL), mientras que la fracción de los alcaloides totales mostró alta toxicidad ($CL_{50} < 500$ µg/mL). Los autores afirman que la actividad citotóxica reportada se debe al efecto sinérgico del conjunto de metabolitos secundarios que pudieron evidenciarse en la planta y a los cuales también se les reconoce esta actividad (alcaloides y terpenos), que explica así la toxicidad mostrada por la fracción de los alcaloides totales.

En correspondencia con la presente investigación, la presencia de altas concentraciones de alcaloides, así como de polifenoles y terpenos identificados en *L. leucocephala*, pudiese explicar el grado de toxicidad alcanzado en el ensayo. En efecto, según Bun y col. (2009), la elevada actividad ecotóxica frente a nauplios de *Artemia salina* se ha asociado a altas concentraciones de alcaloides presentes en los extractos. A su vez, Jaramillo y col. (2016), también relacionaron el efecto citotóxico sobre el crustáceo *Artemia salina*, con la presencia de alcaloides en extractos de plantas, quienes observaron que, a mayor concentración de alcaloides en los extractos, mayor toxicidad.

No obstante, son muy pocos los trabajos que se han publicado sobre la ecotoxicidad de la *Leucaena* frente a *A. salina*. Aunque muchos compuestos, incluidos los de análisis proximal, han sido aislados e identificados en esta especie, hay pocos estudios que se relacionan con los efectos biológicos de tipo tóxico, sobre todo de los compuestos alcaloides. Por lo tanto, este estudio representa un avance en la investigación de la toxicidad de *Leucaena*, ya que los ensayos con *A. salina* son utilizados como vía inicial de tamizaje ecotóxico *in vivo* de extractos, fracciones y compuestos depurados, con el fin de discriminar aquellas muestras de elevada toxicidad, debido a que presenta buena correlación con la ecotoxicidad *in vitro* (Martínez y cols., 2011).

Análisis Probit de la determinación de la Toxicidad del extracto etanólico de las partes aéreas de *Leucaena leucocephala* frente a *Artemia salina*

La estimación del parámetro fue estadísticamente significativa ($< 0,05$), con una correlación Chi-cuadrado 0,376 (p-valor = 0,540). La información del análisis Probit se encuentra reflejada en las Tablas 12 a la 15.

Tabla 12.

Información de convergencia

	Número de iteraciones	Se ha encontrado la solución óptima
PROBIT	20	No ^a

a. Las estimaciones de parámetro no han convergido.

Tabla 13.
Estimación de parámetro

	Parámetro	Estimación	Desv. Error	Z	Sig.	Intervalo de confianza de 95 %	
						Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a	mg/mL	6,599	1,818	3,629	,000	3,035	10,162
	Intersección	-17,802	5,028	-3,541	,000	-22,830	-12,774

a. Modelo PROBIT: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo 10,000 base.)

Tabla 14.
Covarianzas y correlaciones de estimaciones de parámetro

		mg/mL	Respuesta natural
PROBIT	mg/mL	3,306	-0,106
	Respuesta natural	-0,029	0,022

Covarianzas (abajo) y correlaciones (arriba).

Tabla 15.
Pruebas de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	g ^b	Sig.
PROBIT	Prueba de bondad de ajuste de Pearson	0,376	1	0,540 ^a

^a Puesto que el nivel de significación es mayor que ,500, no se utiliza el factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

^b Las estadísticas basadas en casos individuales difieren de las estadísticas basadas en casos agregados.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- El análisis proximal realizado a la harina de *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit para medir su composición nutricional, indicó los siguientes valores: carbohidratos 66,7 %, proteínas 24,33 %, cenizas 7,22 %, lípidos 0,96 % y humedad 0,78 %; lo cual concuerda con lo reportado por García y cols. (2008).
- A través del tamizaje fitoquímico se detectaron metabolitos secundarios entre los que destacan alcaloides, esteroides, terpenos, polifenoles, flavonoides y saponinas.
- La exposición de los nauplios de *Artemia salina* al extracto etanólico de las partes aéreas de *L. leucocephala*, resultó ser moderadamente tóxico, según el CYTED.

www.bdigital.ula.ve

Recomendaciones

La presente investigación deja una pauta de partida para investigaciones futuras dentro del Departamento de Ciencias de los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Con base en los resultados obtenidos se recomienda:

Evaluar las propiedades funcionales de la harina de *Leucaena leucocephala*, así como determinar el porcentaje de mimosina presente en la planta.

Realizar estudios de la actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de *L. Leucocephala*, entre otros.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

- Adejumo, J. y Ademosun, A. (1985). Effects of planting distance, cutting frequency and height on dry matter yield and nutritive value of *Leucaena leucocephala* sown alone and in mixture with *Panicum maximum*. **J. Anim. Prod. Research.**, 5 (2), 209-221.
- Adenaye, J. (1979). A note on the nutrient and mineral Composition of *Leucaena leucocephala* in Western Nigeria. **An. FeedScib. Tech.**, (4), 221-225.
- Amaro, O. (2009). *Entomofauna en Leucaena leucocephala (Lam.) de Wit asociada con gramíneas pratenses: Caracterización de la comunidad insectil en Leucaena-Panicum* (Tesis Doctoral). Universidad Agraria de La Habana, La Habana.
- Anderson, R., Anderson, T., Nisbet, D., Kibbe, A., Elrod, D. y Wilkinson, G. (2001). Drought associated poisoning of cattle in South Texas by the high quality forage legume *Leucaena leucocephala*. **Vet. Hum. Toxicol.**, 43(2), 95-6.
- AOAC. (2000). **Official Methods of Analysis**. 17ed. USA-Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists.
- Aponte, M., Calderón, M., Delgado, A., Herrera, I., Jiménez, Y., Ramírez, Z., Rojas, J., y Toro, Y. (2008). **Fitoquímicos**. Caracas: ECOSis.
- Apu, S., Khatun, F., Buyhan, S., y Liza, M. (2013). Assessment of cytotoxic activity of two medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) as an experimental tool. **Internat. J. of Pharmaceut. Scienc. Research.**, 4 (21), 1125-1130.
- Arias, F. (2006). *El Proyecto de Investigación. En Introducción a la Metodología Científica*. (5ª Ed). Caracas, Venezuela: Editorial Episteme.
- Arias, L. (2007). *Caracterización nutricional de dos arreglos silvopastoriles de Pennisetum purpureum o Panicum maximum asociadas con Leucaena leucocephala y Gliricidia sepium con novillas en pastoreo en el Alto Magdalena*. (Tesis de Maestría). Universidad de La Salle, Bogotá.
- Astiasaran, A. y Martínez, A. (2000). **Alimentos: Composición y Propiedades**. Madrid: Mc Graw-Hill Interamericana.
- Ayala, A., Cetina, R., Capetillo, C., Zapata, C., y Sandoval, C. (2006). **Composición Química – Nutricional de Árboles Forrajeros**. México: Sargarpa.

- Bhatia, H., Manhas, R., Kumar, K. y Magotra, R. (2014). Traditional knowledge on poisonous plants of Udhampur district of Jammu and Kashmir, India. **J. Ethnopharmacol.**, 152 (1), 207-16.
- Boscan, L. (1996). **Prácticas de Ciencias de los Alimentos, parte 1: Análisis de los alimentos**. Mérida, Venezuela: Publicaciones Universidad de Los Andes.
- Bravo, J. (2019). *Implementación y valoración nutricional de bancos de proteína para la alimentación de rumiantes en la provincia de Loja*. (Tesis en Medicina Veterinaria). Universidad Nacional de Loja, Ecuador.
- Bravo, H., Jiménez, S., Mesa, L., Arangute, A. y Nieva, A. (2019). Propiedades funcionales, capacidad antioxidante de la harina de guaje (*Leucaena leucocephala*) y su uso en la industria alimentaria. **Rev. Tecnológ. Agrobioalim.**, 3 (1), 1-7.
- Bruneton, J. (2001). **Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales**. Zaragoza: Acribia.
- Bun, S., Laget, M., Chae, A., Bun, H., Oliver, E., y Elias, R. (2009). Cytotoxic Activity of alkaloids isolated From *Stephania rotunda*, *in vitro* citotoxic activity of cepharanthine. **Phytoth. Res.**, 2 (1), 587-590.
- Burawat, J., Uabandit, N., Sripanidkulchai, B., Nualkaew, S. y Iamsaard, S. (2016). Antioxidant Capacity and Acute Testicular Toxicity of *Leucaena leucocephala* Aqueous Shoot Tips Plus Young Leaves Extracts. **Internat. J. Morphol.**, 34 (2), 514-521.
- Cabañas, M., Luz, M., Lamothe, A., y Domínguez, Y. (2005). **Prácticas de Botánicas Morfológica y Sistemática**. Bogotá: Instituto de Investigación de Pastos y Forrajes.
- Canepa, F. (2018). *Evaluación química del fruto de Charán*. (Tesis de Grado). Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.
- Carranco, M., Arellano, F., Pérez, F., Mercado, I. y Herrera, E. (1994). Nota sobre la composición química de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. como posible recurso forrajero. **Rev. Cubana Cienc. Agríc.**, 28, 355.
- Carrión, A. y García, C. (2010). *Preparación de extractos vegetales determinación de eficiencia de metódica* (Tesis De Grado). Universidad de Cuenca, Ecuador.
- Castañeda, R., Gutiérrez, H., Carrillo, E., y Sotelo, A. (2017). Leguminosas (Fabáceae) silvestres de uso medicinal del distrito de Lircay, Provincia de Angaraes

- (Huancavelical, Perú). **Bol. Latinoam. Car. Plant. Medic. Aromat**, 16 (2), 136-149.
- Castillo, E. y Martínez, I. (2007). **Manual de Fitoterapia**. España: Editorial Elsevier Masson.
- Chamarro, D. (2002). *Importancia de la proteína en la nutrición de rumiantes con énfasis en la utilización de proteínas de especies arbóreas*. Seminario - Taller Internacional sobre manejo de la proteína en producción de ganado bovino. Ibagué: CORPOICA.
- Chanwitheesuk, A., Terrawutgulrag, A. y Rakariyatham, N. (2005). Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. **Food. Chem.**, 92 (3), 491-7, 2005.
- Córdoba, P. (2000). **Toxicología**. 4ta. edición. Bogotá: Editorial El Manual Moderno.
- Dago, Y., Milian, J., Reyes, K., Redonet, M., López, Y. y Hernández, L. (2020). Uso potencial de *Leucaena leucocephala* Lam. (leucaena) presente en sistemas agroforestales de Pinar del Río. **Rev. Cub. Cienc. Forest.**, 8(1), 154-162
- De La Cruz, L., Hernández, M., Monroy, I., Rivas, C., Verde, M., González, V. y Viveros, E. (2022). Biological Activities of Seven Medicinal Plants Used in Chiapas, México. **Plants.**, 11, 1790. <https://doi.org/10.3390/plants11141790>
- Duarte, C., Bigonha, M., De morais, L., De Oliveira, R., Brunoro, N., Ramírez, L. y Machado, R. (2012). Nutritional and Bioactive Compounds of Bean: Benefits to Human Health. **Internat. J. Morphol.**, 5: 233-258.
- Duno, R., y Cetzal, W. (2016). **Fabáceae (Leguminosae) en la Península de Yucatán**. México. Conacyt.
- FAO. (2015). Organización de las Naciones Unidas para La Alimentación y La Agricultura.
- García¹, D., Wencomo, H., Gonzalez, M., Medina, M., Cova, L. y Spengler, I. (2008). Evaluación de diecinueve accesiones de *Leucaena leucocephala* basada en la calidad nutritiva del forraje. **Zootec. Trop.**, 26 (1), 9-18.
- García, G. y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. **Reduca.**, 2 (3), 119-145.
- García, D.E., Wencomo, H.B., Medina, G.M., Moratinos, P y Cova, L. (2009). Caracterización de la calidad nutritiva de 53 accesiones del género *Leucaena* en condiciones tropicales. **Past. Forraj.**, 32 (1), 1-16.

- García, E., Valverde, E., Agudo, M., Novales, J., y Luque, M. (2019). Toxicología clínica. **Farm. Hospital.**, 43 (2), 667-668.
- García, G. (2019). *Desarrollo de una harina de semilla de guaje Leucaena esculenta para uso alimenticio*. (Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria). Universidad Autónoma Chapingo, México.
- Gil, A. (2010). **Tratado de Nutrición**. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Guerra, D., Valdez, C., Orozco, D. y Fuentes, H. (2016). **Guía para la Identificación de especies de árboles y arbustos comunes en el agropaisaje de Guatemala**. Guatemala: Editorial Servi Prensa.
- Hernández, M. y Sastre, A. (1999). **Tratado de nutrición**. Madrid: Editorial Díaz de Santos.
- Hernández, Fernández, C., y Batista, L. (2010). Capítulo III. Planteamiento del problema cuantitativo. En *Metodología de la Investigación*. (5ta ed., pp. 41). México: Mc Graw Hill.
- Holmes, J. (1981). Toxicity of *Leucaena leucocephala* for steers in the wet tropics. **Trop. Anita. Hlth. Prod.**, 13, 94-100.
- Hurtado, J. (2010). *El “para qué”, o los objetivos de la Investigación. En: el proyecto de investigación. Comprensión holística de la Metodología y la Investigación*. Caracas, Ediciones Quirón.
- Jaramillo, C., Jaramillo, A., D’ Armas, H., Troccoli, L. y Rojas, L. (2016). Concentraciones de alcaloides, glucósidos cianogénicos, polifenoles y saponinas en plantas medicinales seleccionadas en Ecuador y su relación con la toxicidad aguda contra *Artemia salina*. **Rev. Biol. Trop.**, 64 (3), 1171-1184
- Klaassen C.D., ed. (2008). **Casarett and Doull’s Toxicology: The Basic Science of Poisons**. (7th ed.) New York: McGraw-Hill.
- León, J. (2000). **Botánica de los cultivos tropicales**. Costa Rica: Editorial Agroamérica.
- Lima, E.C.(2004). *Análisis bromatológico de cinco forrajeras introducida para determinar su aporte en la alimentación del ganado* (Tesis De Grado). Universidades Mayor de San Andrés, Bolivia.
- Lizcano, A. y Vergara, J. (2008). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanolicos y aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperometes feruginea, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicata*

- frente a microorganismos patógenos y fitopatogenos (Tesis De Grado). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- López, S., y Soto, M. (2008). *Estudio preliminar de la composición proximal, química y nutricional de cálices de flor de Jamaica (Hibiscus sabdariffa L.) recolectados en los años 2006 y 2007* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León. Nicaragua.
- Llamas, F. y Acedo, C. (2018). Las leguminosas (Leguminosae o Fabáceae) una síntesis de las clasificaciones, taxonomía y filogenia de la familia a lo largo del tiempo. **Phytoh. Res.**, 3 (1), 32-45 doi:10.18002/ambioc.VOI145542.
- Machado, R., Milagros, M., Menéndez, J. y García, R. (1978). Leucaena (*Leucaena leucocephala* - Lam de Wit). **Past. Forraj.**, 1, 321-334.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). Productos naturales. En D. Marcano y Hasegawa., *Fitoquímica orgánica* (pp. 30-32). Venezuela: Torino.
- Martínez, M., Reyes, A., Lara, A., Miranda, L., Huerta, M., y Uribe, M. (2016). Composición nutricional de leucaena asociada con pasto estrella en Huasteca Potosina de México. **Rev. Mex. Cienc. Agric.**, 7 (16), 1-14.
- Martínez, D., Ocampo, J. y Galvis, A. (2011). Actividad antibacteriana y citotoxicidad in vivo de extractos etanólicos de *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae). **Rev. Cuban. Plant. Medicin.**, 16 (4), 313-323.
- Mejía, J., Lazo, I., y Salinas, C. (2009). *Determinación del valor nutricional de Leucaena (Leucaena leucocephala) cruda, lavada y con sulfato ferroso al 0.5% y 1% en raciones para pollos de engorde* (Tesis de Grado).Universidad de Salvador, Salvador.
- Melo, K., Ortega, L. y Rico, I. (2021). **Ensayo Artemias**. Colombia: Universidad de Magdalena.
- Miranda, L.G., Núñez, M. y Rodríguez, J.A. (2016). Utilización de un método In vitro para evaluar la toxicidad de chaya, una planta nutritiva utilizada en medicina tradicional para la disminución del colesterol. **Investig. Desarr. Cienc. Tecnol. Aliment.**, 1 (1), 546-558.
- Moreno, A., López, S., y Corcho, A. (2000). Principales medidas epidemiológicas. **Sal. Públ. Méx.**, 42 (4), 337-341.
- Ochoa, L. y Sarmiento, A. (2018). *Estudio Fitoquímico de la especie vegetal Bucquetia glutinosa (L. f.) DC. (Melastomataceae) y evaluación de su actividad biológica.*

- (Trabajo de Grado). Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, Colombia.
- Ortiz, A. (2004). *Determinación de la composición química proximal y fibra dietaria de 43 variedades criollas de maíz de 7 Municipios del Sureste del Estado de Hidalgo* (Tesis de Grado). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R. y Anthony, S. (2009). ***Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0***. Nairobi, World Agroforestry Centre.
- Palella, S., y Martins, F. (2012). ***Metodología de la Investigación***. Caracas, Venezuela: FEDUPEL.
- Paredes, A. (1984). ***Leucaena leucocephala***. Santo Domingo: Universidad Nacional Pedro Enríquez Ureña.
- Pérez A (2009). ***Pasos para la Elaboración del Anteproyecto de Investigación. En Guía Metodológica para Anteproyectos de Investigación*** (2 ed., pp. 54-57). Caracas: FEDUPEL.
- Perozo, A. (2013). ***Manejo de pastos y forrajes tropicales***. Venezuela: Editorial Astro Data.
- Pilco, J. (2016). *Utilización de la harina de Leucaena leucocephala (Leucaena) en la alimentación de conejos neozelandés en la etapa de crecimiento-engorde* (Tesis de Grado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador
- Pino, O., y Lazo, F. (2010). Ensayo de *Artemia*: Útil Herramienta de Trabajo Para Ecotoxicológicos y Químicos de Producto Naturales. ***Rev. Protec. Veg.***, 22 (1), 35-41.
- Pinto, R.; Gómez, H.; Martínez, B.; Hernández, A.; Medina, F.; Ortega, L. y Ramírez, L. (2004). Especies forrajeras utilizadas bajo silvo-pastoreo en el centro de Chiapas. ***Avanc. Investig. Agropec.***, 8 (2): 1-11.
- Quispillo, J.M. (2013). *Separación, purificación y posible identificación de metabolitos secundarios del Escobillon Rojo (Callistemon speciosus)*. (Tesis de Grado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador.
- Román, N., García, M., Castillo, A., Castellano, J., y Jiménez, A. (2014). Componentes nutricionales y antioxidantes de dos especies de guaje (*Leucaena* spp): recurso ancestral subutilizado. ***Rev. Chapingo. Ser. Hortic.***, 20 (2), 2-8.

- Rosa, A. (abril, 2014). Canal de mascotas. (En línea): Disponible en: https://www.canalmascotas.com/artemia-salina-para-alimentar-a-los-peces/#disqus_thread
- Sánchez, L., y Neira, A. (2005). Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava* L y *Psidium guineense* Sw. **Cult. Cientif.**, 2, 40-45.
- Santiago, I., Lara, A., Miranda, A., Huerta, M., Krishnamurthy, L y Muñoz, J. (2016). Composición química y mineral de leucaena asociada con pasto estrella durante la estación de lluvias. **Rev. Mex. Cien. Agric.**, 7 (16) 1-16.
- Sierra, O. (1979). *Introducción de 90 variedades de Leucaena*. Costa Rica: Editorial Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas.
- Solorio, F., y Solorio, B. (2008). Manual de manejo agronómico de *Leucaena leucocephala*. México: Fundación Michoacan.
- Soto, M.R. (2015). Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L., y *Piper aduncum* L., procedente de la región Amazonas. **Scientia.**, 7 (2), 136-139.
- Syamsudin, R. (2010). Antidiabetic activity of active fractions of *Leucaena leucocephala* (Lmk) Dewit seeds in experiment model. **Eur. J. Sci. Res.**, 43(3), 384-91.
- Teijón, J., Garrido, A., Blanco, B., Villaverde, C., Mendoza, C. y Ramírez, J. (2006). **Fundamentos de bioquímica metabólica**. Madrid: Editorial Tébar.
- Tituaña, G. (2013). *Estudio del proceso de obtención de extractos de plantas medicinales* (Tesis de Grado). Universidad Técnica de Ambato, Ecuador.
- Torres, R., Chacón, E., Armas, S. y Espinoza, F. (2005). Efecto de los patrones de siembra sobre la producción de proteína cruda en bancos de *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit. **Zootecnia. Trop.**, 23 (1): 27-38.
- Ucha, F. (2010). Composición química. *Definiciones ABC*, 3 (1), 1-9.
- Valle, P. y Lucas, B. (2000). **Toxicología de alimentos**. México. PAHO.
- Verdecia, D., Herrera, H., Ramírez, J., Leonard, I., Álvarez, Y., Bazán, Y., Arceo, Y., Bodas, R., Andrés, S., Álvarez, J., Giráldez, F., y López, S. (2012). Valor nutritivo de *Leucaena leucocephala*, con énfasis en el contenido de metabolitos secundarios. **REDVET.**, 13 (11), 1-10.
- Vielma, A. (2018). Determinación de grasa cruda. En: *Prácticas de Ciencia de los alimentos*. Mérida: Universidad de Los Andes.

Youdim, A. (diciembre, 2021). Manual MSD Introducción a la nutrición. Recuperado de <https://www.msdmanuals.com/es/hogar/trastornosnutricionales/introducci%C3%B3n-a-la-nutrici%C3%B3n/introducci%C3%B3n-a-la-nutrici%C3%B3n>.

Zarate, S. (1987). *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit subsp.glabrata. **Rev. Protec. Veg.**, 3 (1), 5-11.

www.bdigital.ula.ve