



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



**POTENCIAL NUTRICIONAL DE *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. DE
ACUERDO A SU COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ESTUDIO DE LA
TOXICIDAD SOBRE *Artemia salina***

**Trabajo de Grado presentado como requisito para optar por el título de
Licenciada en Bioanálisis**

Autora:

Elisa M. Salazar C.

C.I: V-26.168.356

Tutor:

Dr. Tomas E. Visbal B.

Mérida, Noviembre de 2023

Dedicatoria

A mi Padre, por enseñarme a andar en la vida sin pisar a nadie. Gracias por ser mi amigo, te admiro y te respeto.

A mi Madre, por su fortaleza y, que nunca ha dejado de orar por mí. Gracias mamá, por hacerme todoterreno.

A mis hermanas, una al lado de la otra, o a kilómetros de distancia pero, siempre juntas.

A mi Abuela Elisa, eres el ángel que me tocó en vida y lo serás siempre. Me gustan todos los pedacitos de mí que se parecen a ti.

A mi Abuelo Victor, mi estrella en el cielo. La parte de mi vida en la que te tuve siempre será mi favorita.

A mi Tía Nilda, por ser siempre ese rayito de luz y esperanza en mi vida.

A mi Padrino JR, va por ti que te fuiste al cielo creyendo ciegamente en mí. Guardo tu sonrisa y tus lindos ojos en mi memoria eternamente.

Y, finalmente a la persona más fuerte que he podido conocer: Yo. Gracias, ¡volviste!

Elisa Salazar

Agradecimientos

A ti mi Dios, por ser mi fuerza y mi escudo, por estar conmigo en cada paso y no abandonarme.

A nuestra ilustre Universidad de Los Andes (ULA) especialmente, a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

Asimismo, quisiera expresar mi gratitud y admiración a todas las personas que contribuyeron con el desarrollo de mi investigación, a mi tutor el Prof. Tomas Visbal, la Dra. Marielba Morillo y la Dra. Rosa Vielma por su paciencia, por compartir sus conocimientos de manera profesional e invaluable, por su dedicación perseverancia y tolerancia.

Gracias infinitas a mis padres, por su amor incondicional y su apoyo moral. Han sido y seguirán siendo el pilar de este logro y los que vendrán.

A todos mis amigos y compañeros, Daryana B., Yesica C., Anna C., Abigail I., Patricia N., Rusmary G., Vanessa A., Nelvis A., Nailyn P., Maite Q., Froilana V. y, a todos aquellos que en algún momento formaron parte de este viaje. Gracias por ser mi red de apoyo, mi equipo de aliento y, lo más importante, una parte de la familia que yo elegí durante este largo y retador camino.

A todos, gratitud infinita.

Elisa Salazar

Tabla de Contenido

Contenido	Pág.
Tabla de Figuras	viii
Índice de Tablas	x
Resumen	xi
Introducción	1
Capítulo I	
El Problema	3
Planteamiento del Problema	3
Justificación e Importancia de la Investigación	6
Objetivos de la Investigación	7
Objetivo General	7
Objetivos Específicos	7
Alcances y Limitaciones de la Investigación	8
Capítulo II	
Marco Teórico	9
Trabajos Previos	9
Antecedentes Históricos	12
Bases Teóricas	13
Familia Fabaceae o Leguminosae	13
Filogenia de la Familia Fabaceae	14
Género <i>Gliricidia</i>	14
Especie <i>Gliricidia sepium</i> (Jacq.) Kunth ex Walp.	15
Taxonomía de <i>Gliricidia sepium</i> (Jacq.) Kunth ex Walp.	15
Descripción Botánica de <i>Gliricidia sepium</i> (Jacq.) Kunth ex Walp.	16
Origen y Extensión de <i>Gliricidia sepium</i> (Jacq.) Kunth ex Walp.	18
Usos de <i>Gliricidia Sepium</i> (Jacq.) Kunth ex Walp.	18
Composición Química y Valor Nutricional de <i>Gliricidia sepium</i> (Jacq.) Kunth ex Walp.	19

Metabolitos Primarios	24
Determinación de Metabolitos Primarios	24
Análisis Proximal	24
Humedad	24
Ceniza	25
Contenido de Lípidos	25
Proteínas	26
Fibra Cruda	26
Extracto no nitrogenado	27
Productos Naturales	27
Metabolitos Secundarios	27
Terpenos	28
Compuestos Fenólicos	29
Quinonas	29
Cumarinas	29
Lignina	30
Flavonoides	30
Taninos	31
Glicósidos	31
Saponinas	32
Alcaloides	33
Extracto Vegetal	33
Obtención de los Extractos Vegetales	34
Métodos Continuos	34
Método de Soxhlet	34
Percolación	35
Métodos Discontinuos	35
Maceración	35
Infusión	35
Digestión	35

Tamizaje Fitoquímico	35
Ensayo de Lierbermann–Burchard	36
Ensayo de Dragendorff	36
Ensayo de Wagner y Mayer	36
Ensayo de Cloruro Férrico	36
Ensayo de Shinoda	36
Ensayo de la Espuma	36
Ensayo de la Gelatina	37
Ensayo del Hidróxido de Amonio	37
Toxicidad del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>Gliricidia sepium</i> (Jacq.) Kunth ex Walp. sobre <i>Artemia salina</i>	37
Definición Operacional de Términos	39
Operacionalización de las Variables de Investigación	41
Hipótesis	43
Hipótesis Nula	43
Capítulo III	
Marco Metodológico	44
Tipo de Investigación	44
Diseño de Investigación	44
Población y Muestra	45
Sistema de Variables	45
Instrumento de Recolección de Datos	46
Procedimientos de la Investigación	46
Recolección del Material Vegetal	46
Tratamiento del Material Vegetal	47
Análisis Proximal de <i>Gliricidia sepium</i>	48
Obtención de los Extractos Vegetales	54
Tamizaje Fitoquímico	55
Valoración de toxicidad sobre <i>Artemia salina</i>	57
Estudio estadístico	61

Capítulo IV	
Resultados y Discusión	62
Capítulo V	
Conclusiones y Recomendaciones	67
Conclusiones	67
Recomendaciones	68
Bibliohemerografía	69

www.bdigital.ula.ve

Tabla de Figuras

Figuras	Pág.
Figura 1. Árbol de <i>Gliricidia sepium</i> (Jacq.) Kunth ex Walp.	16
Figura 2. Hojas, flores, frutos y semillas de <i>G. sepium</i> (Jacq.) Kunth ex Walp.	17
Figura 3. Componentes químicos principales en hojas de <i>G. sepium</i> (Jacq.) Kunth ex Walp.	23
Figura 4. Principales metabolitos secundarios aislados de corteza y madera de <i>G. sepium</i> (Jacq.) Kunth ex Walp.	23
Figura 5. Estructura química del estigmasterol y el sitosterol	28
Figura 6. Estructura química de la antraquinona	29
Figura 7. Estructura química del psoraleno	30
Figura 8. Estructura química de los alcoholes coniferílico, cumarílico y sinapílico	30
Figura 9. Estructura química de la flavona	31
Figura 10. Estructura química de los taninos hidrolizables	32
Figura 11. Estructura química de las saponinas	32
Figura 12. Nauplios de <i>Artemia salina</i>	39
Figura 13. Recolección y pesaje de las hojas de <i>G. sepium</i>	46
Figura 14. Váucher de la identificación botánica de la muestra	47
Figura 15. Secado, molienda y almacenamiento del material vegetal	48
Figura 16. Pesado, calentamiento y enfriamiento de las muestras para la determinación de humedad	49
Figura 17. Calcinación sobre mechero, incineración y obtención de cenizas blancas	50
Figura 18. Proceso de digestión de proteínas en el equipo Micro Kjeldahl	
Figura 19. Destilación de las muestras para la determinación de proteínas	52
Figura 20. Titulación con ácido clorhídrico al 0,02 N	52
Figura 21. Preparación de las muestras para la determinación de grasa cruda	53
Figura 22. Equipo de extracción semiautomático, programa n.º 1	54

Figura 23. Procedimiento de extracción discontinua para la obtención de los extractos vegetales	55
Figura 24. Preparación del agua de mar artificial	58
Figura 25. Preparación de los quistes de <i>Artemia salina</i>	58
Figura 26. Imagen ampliada de la eclosión de los quistes a nauplios de <i>Artemia salina</i>	59
Figura 27. Preparación de las placas de microtitulación	60
Figura 28. Conteo del número de nauplios muertos	60

www.bdigital.ula.ve

Índice de Tablas

Tablas	Pág.
Tabla 1. Taxonomía de <i>G. sepium</i> (Jacq.) Kunth ex Walp.	16
Tabla 2. Composición bromatológica del follaje de <i>G. sepium</i> (Jacq.) Kunth ex Walp.	20
Tabla 3. Composición mineral de <i>G. sepium</i> , reportados por diferentes autores	21
Tabla 4. Tamizaje fitoquímico en hojas de <i>G. sepium</i> (Jacq.) Kunth ex Walp.	22
Tabla 5. Alcaloides que se pueden aislar de algunas especies de plantas	33
Tabla 6. Taxonomía de la especie <i>Artemia salina</i>	38
Tabla 7. Definición operacional de variables	42
Tabla 8. Clasificación de toxicidad según el CYTED	61
Tabla 9. Composición nutricional de las partes aéreas de <i>G. sepium</i>	62
Tabla 10. Tamizaje fitoquímico de los extractos de las hojas de <i>G. sepium</i>	64
Tabla 11. Cuantificación de la DL ₅₀ del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>G. sepium</i> , y los controles sobre <i>Artemia salina</i>	65



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



POTENCIAL NUTRICIONAL DE *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. DE ACUERDO A SU COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ESTUDIO DE LA TOXICIDAD SOBRE *Artemia salina*

Trabajo de Grado

Autora:

Elisa M. Salazar C.

C.I: V-26.168.356

Tutor:

Dr. Tomas E. Visbal B.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue confirmar la relación que existe entre el potencial nutricional y la composición química de *Gliricidia sepium* (Jacq.) kunth ex Walp., así como, la toxicidad de los extractos de las partes aéreas sobre *Artemia salina*. Se examinaron las hojas para determinar su composición química y toxicidad. Se realizó un análisis proximal, tamizaje fitoquímico y bioensayo de letalidad de las partes aéreas de *G. sepium*, leguminosa arbórea originaria de Centro América y norte de Sur América, perteneciente a la familia de las Fabáceas. La harina de las hojas secas reveló un contenido de proteína (26,45%), ceniza (8,25%), carbohidratos (64,6%), humedad (0,39%) y lípidos (0,35%). El tamizaje fitoquímico evidenció la presencia de esteroides en los extractos etanólico, diclorometano y hexanoico; terpenos, polifenoles y flavonoides en los extractos etanólico y diclorometano; y, alcaloides y taninos en el extracto etanólico. La actividad tóxica se evaluó a través de la DL₅₀ del extracto etanólico de las partes aéreas de *G. sepium*, siendo >1500 µg/mL, clasificándose como relativamente inocuo para *Artemia salina*. En términos generales, los resultados obtenidos sugieren que la materia seca de *G. sepium* podrían ser una alternativa para ser usada en la alimentación bovina, por su alto contenido proteico; los extractos de las partes aéreas podrían ser usados en el control de plagas y además, puede tener un uso potencial como agente antioxidante y antifúngico natural.

Palabras claves: *Gliricidia sepium*, composición química, toxicidad y *Artemia salina*.

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad hasta la época actual, el hombre ha utilizado, con mayor o menor profusión, especies de plantas con fines alimenticios o terapéuticos. Sin embargo, para estudiar el potencial nutricional en las plantas, es necesario determinar sus constituyentes químicos, entre estos, el contenido proteico es de gran relevancia así como, la presencia de agentes tóxicos o metabolitos secundarios.

Para tal efecto, por medio de diversas técnicas como el análisis proximal se pueden determinar por ejemplo, porcentajes de grasa y proteínas en los alimentos (Ayala et al., 2006). Además, el tamizaje fitoquímico permite la identificación de los metabolitos secundarios presentes, a través de reacciones y análisis químicos (Castillo y Martínez, 2021).

Por otro lado, las plantas arbóreas y arbustivas han tenido un papel preponderante por sus considerables niveles proteicos, valor nutritivo, naturaleza multipropósito y amplio margen de adaptación a climas y suelos. El trópico americano contiene muchas especies con potencial forrajero, entre las que se destacan las integrantes de la familia Leguminosae (Llamas y Acedo, 2016).

La familia de las Fabaceae o Leguminosae, se extiende casi por todo el planeta siendo así, la segunda familia más importante de las plantas cultivadas después de la familia de las gramíneas que incluye los cereales. Las leguminosas de grano representan el 27% de la producción agrícola mundial y proporcionan el 33% de la proteína de la dieta consumida por los seres humanos, mientras que los pastos y leguminosas forrajeras constituyen parte vital de la alimentación animal (Llamas y Acedo, 2016).

Específicamente la especie *G. sepium*, reconocida localmente con el nombre común de Matarratón, es una de las especies forrajeras de gran estima por su importancia en la dieta animal. Aunado a esto, ésta especie se considera el mejor protector de los cacaotales y el café, por su sombra y por su acción fertilizadora del suelo como fuente de nitrógeno. Al mismo tiempo, posee ciertos constituyentes químicos a los cuales se les atribuyen sus propiedades biocidas, rodenticidas e insecticidas (Urdaneta et al., 2014).

Por consiguiente, el objetivo de esta investigación es confirmar la relación que existe entre el potencial nutricional y la composición química de *Gliricidia sepium* (Jacq.) kunth ex Walp., así como, la toxicidad de los extractos de las partes aéreas sobre *Artemia salina*.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

El Problema

Planteamiento del Problema

A nivel mundial existe la necesidad de determinar el potencial nutricional de los recursos alimenticios disponibles localmente, dentro de estos recursos se ha dado particular importancia a los árboles y arbustos forrajeros (Hurtado et al., 2012). La especie vegetal *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. es un árbol caducifolio con copas irregulares y amplia cobertura de follaje, además, particularmente sus hojas son de fácil digestión comparadas con otras plantas leguminosas tropicales. En las costas de México y regiones tropicales de Sudamérica y Asia se utiliza como forraje en la alimentación animal debido a que las hojas tienen un alto contenido de proteínas (Cobián, 2007).

Por otra parte, el potencial nutricional es el conjunto de nutrientes y propiedades que posee una planta con beneficios en la nutrición de un organismo, asegurando la conservación y crecimiento del mismo. Según las Directrices del Codex (1997), cualquier representación que afirme, que una materia prima posee propiedades nutritivas particulares, no sólo en relación con su valor energético, contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos, sino además, con su contenido de vitaminas y minerales, se conoce como propiedad nutricional.

El sistema más antiguo para determinar el contenido de nutrimentos o potencial nutritivo de los alimentos se denomina análisis proximal. Este análisis inmediato permite cuantificar el contenido de materia seca, proteína cruda, extracto etéreo, ceniza, fibra cruda y extracto libre de nitrógeno (Ayala et al., 2006).

Con respecto al análisis fitoquímico, este permite hacer una discriminación de las plantas en términos de su composición química para estudiar la actividad biológica de la especie en cuestión; su objetivo, es determinar la presencia o ausencia de los

principales grupos de metabolitos en una especie vegetal (Carvajal et al., 2009).

Ahora bien, las plantas presentan dentro de su proceso de síntesis dos rutas metabólicas, una donde sintetizan metabolitos primarios que son los necesarios para el desarrollo de la propia planta como son las proteínas, lípidos, carbohidratos y algunos micronutrientes y, otra ruta donde sintetizan metabolitos secundarios. En tal sentido, los metabolitos secundarios se definen como compuestos químicos de estructuras relativamente complejas y distribución restringida, presentes en especies vegetales que no son requeridos en procesos fisiológicos normales de crecimiento (Prashant et al., 2011). Estos metabolitos pueden ser alcaloides, polifenoles, quinonas, esteroides, triterpenos, flavonoides, taninos, saponinas, entre otros (Riveros et al., 2002).

En los últimos años, se ha venido presentando un detrimento en el rendimiento de producción alimentaria especialmente en la industria de la ganadería, puesto que, ha sido afectada por diversos factores como el acceso a fuentes de proteína debido a su alto costo, problemas a los cuales se ven enfrentados la mayoría de los productores agropecuarios de escasos recursos. De ahí que, se viene considerando el uso de fuentes alternativas de proteína en la alimentación de ganado, principalmente fuentes de origen vegetal, por ejemplo, en la actualidad la formulación de ensilaje con la adición de diferentes especies vegetales, se ha planteado como un tema de investigación con alto potencial de aplicabilidad en el sector agroindustrial (Utria et al., 2023).

Por otro lado, un estudio realizado por Mejía (2019), refiere que *G. sepium* contiene alrededor de 32% de proteína bruta, que puede ser utilizada como alimento para rumiantes y monogástricos. Por tal motivo, el uso del matarratón en fincas ganaderas puede tener varios fines; para alimentación, cercas vivas y captura carbono que se producen en los mismos sistemas productivos, con ello, reduciendo la contaminación ambiental provocada por los gases del efecto invernadero. Aparte de ello, esta especie vegetal posee propiedades antimicrobianas que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas durante el ensilaje, mejorando el nivel de proteína final (Utria et al., 2023).

Por lo tanto, la inclusión del matarratón podría contribuir a optimizar la sustentabilidad en los agroecosistemas tropicales, ayudando a mejorar la calidad de la dieta para los animales; además, de representar una opción viable para el control

biológico de insectos y plagas a través del uso de extractos para tal fin. A partir de lo expuesto, se formulan las siguientes interrogantes:

¿Cuál será la relación entre el potencial nutricional y la composición química de *Gliricidia sepium* (Jacq.) kunth ex Walp.? y ¿Cuál será la relación entre la composición química y la toxicidad de los extractos de las partes aéreas de *Gliricidia sepium* (Jacq.) kunth ex Walp. sobre nauplios de *Artemia salina*?

www.bdigital.ula.ve

Justificación e Importancia de la Investigación

La importancia de *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. se apoya en la variedad de usos que esta planta puede ofrecer, sobre todo su utilidad como alternativa alimenticia en bovinos, ovinos y caprinos, ya que como se ha descrito anteriormente ésta leguminosa posee un gran potencial de proteínas, minerales, vitaminas y carbohidratos (González et al., 2014). Por lo tanto, el autor de esta investigación identificó como uno de los motivos de interés, las enfermedades nutricionales que se producen por falta de alimentos y raciones mal equilibradas en la proporción de nutrientes, debido a que, la carencia de proteínas y vitaminas en la dieta de los animales genera retrasos en los procesos metabólicos y en el crecimiento (Castello, 1993).

Atendiendo a estas consideraciones, se decidió focalizar el interés sobre el estudio del potencial nutricional de la especie *Gliricidia sepium* debido a los estudios previos que reportan un elevado contenido nutritivo. Sin embargo, cabe resaltar el hecho de que existen muchas especies vegetales encontradas en la Región Andina, de aquí que, es necesario expandir el abanico de opciones utilizando esta especie no solo como alternativa alimenticia para algunos animales sino también como tratamiento de algunas enfermedades, al aprovechar sus componentes o principios activos, lo que implicaría el aporte social, que sería la principal razón por la cual esta investigación tiene relevancia y se justifica la realización de la misma.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la relación que existe entre el potencial nutricional y la composición química de *Gliricidia sepium* (Jacq.) kunth ex Walp., así como, la toxicidad de los extractos de las partes aéreas sobre *Artemia salina*.

Objetivos Específicos

- Analizar la composición nutricional (humedad, proteína, grasa, ceniza y extracto no nitrogenado) de *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp.
- Determinar la composición química de los extractos hexanoico, diclorometano y etanólico de las partes aéreas de *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp.
- Valorar la toxicidad del extracto etanólico de las partes aéreas de *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. sobre *Artemia salina*.

www.bdigital.ula.ve

Alcances y Limitaciones de la Investigación

En cuanto a la profundidad del conocimiento que se pretendió adquirir durante este estudio fue confirmar el potencial nutricional de *Gliricidia sepium* (Jacq.) kunth ex Walp. de acuerdo a su composición química y toxicidad de los extractos de las partes aéreas sobre *Artemia salina*.

Sin embargo, debido al elevado costo de la vida en el país, la universidad no escapa de esta realidad, obteniendo investigaciones limitadas. Es por esto que, las mayores limitaciones presentadas fueron la adquisición de algunos reactivos debido a su costo y disponibilidad, fallas constantes de la electricidad y los gastos que implicaron la materialización de este trabajo de investigación (papelería, transporte entre otros). No obstante, esto no significó una dificultad para la realización de la misma.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO II

Marco Teórico

Trabajos Previos

Gliricidia sepium, es una especie arbórea que presenta diversas alternativas de uso, entre éstas, permiten mejorar la producción ganadera, el manejo en el control de plagas y enfermedades en diversos cultivos, apoya en la fijación simbiótica de nitrógeno y por ende, presenta diversos servicios ecosistémicos importantes. En ese sentido, una investigación realizada por Jiménez et al. (2022), estuvo basada en identificar el uso de las especies arbóreas forrajeras en tres fincas pecuarias en el valle Macanacú del municipio Guisa, provincia Granma, Cuba. Se realizó el inventario de las especies arbóreas forrajeras existentes. Se caracterizaron las especies presentes, según su uso y servicios ofrecidos en la zona de estudio. Se registraron un total de 23 especies que se utilizan en los sistemas ganaderos. Se destaca la gran representatividad de la familia Fabaceae, con 18 % del total, por tener especies leguminosas y forrajeras, todas de gran interés pecuario. Las especies arbóreas forrajeras como *Samanea saman* (Jacq.) Merr, *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, *Guazuma ulmifolia* Lam y *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp, son las más utilizadas como fuente alimenticia para el ganado de la región.

De manera similar, Panimboza (2022), realizó una investigación con el fin de evaluar diferentes bloques multinutricionales para la ceba de ganado bovino con la utilización de especies forrajeras como suplemento en la alimentación diaria. Utilizó un diseño crossover con tres tratamientos y seis repeticiones, evaluando 6 bovinos de biotipo Brahman con un peso promedio de 350 kg, a los que se alimentó durante 70 días divididos en tres períodos con 5 días de descanso previo a cada dieta. Estos tratamientos fueron: el tratamiento 1 (pastoreo + bloque con 25% de *Guazuma ulmifolia*), el tratamiento 2 (pastoreo + bloque con 25% de *Leucaena leucocephala*) y

el tratamiento 3 (pastoreo + bloque con 25% de *Gliricidia sepium*). Se demostró que el tratamiento 3 presentó mejores resultados y aceptación tanto en la ganancia de peso con un promedio de 21.17 kg, conversión alimenticia de 5.86 kg y en palatabilidad de 61.91 kg de consumo del bloque. Se evidenció que los bloques elaborados principalmente con *G. sepium*, pueden ser considerados una alternativa de suplementación en la alimentación de ganado bovino.

Por otro lado, Alade et al. (2021), divulgaron un artículo relacionado con la composición y actividad biológica de los aceites volátiles de *Gliricidia sepium*: una planta medicinal usada en Nigeria para diversas aplicaciones. Los aceites se obtuvieron por hidrodestilación y evaluaron la toxicidad, actividad antimicrobiana y antioxidante mediante el ensayo de letalidad de *Artemia salina*, el método de difusión en agar y el método de captación del radical DPPH, respectivamente. Se identificaron un total de 43 y 44 constituyentes en los aceites de hojas y tallos, respectivamente. Los componentes mayoritarios reconocidos en el aceite de la hoja de la planta fueron hexadecatrienal (16,9 %) y pentadecanal (16,0 %), mientras que, el humuleno epóxido II (17,5 %) y el óxido de cariofileno (10,6%) dominaron en el aceite de tallo. El aceite de tallo mostró una mejor actividad antifúngica que el aceite de hoja; ambos aceites fueron tóxicos para *Artemia salina*; la hoja y los aceites de tallo tenían una concentración inhibitoria media (IC₅₀) de 84,3 µg/mL y 142,2 µg/mL, respectivamente, en el ensayo de eliminación de radicales DPPH, lo que indicó un nivel moderado actividad antioxidante. Los resultados sugieren que el aceite volátil de *G. sepium* puede encontrar un uso potencial como agente antioxidante y antifúngico natural gracias a la presencia de compuestos químicos en el tallo como el óxido de cariofileno.

También, González y Luna (2020), realizaron un estudio cuyo objetivo fue determinar la presencia de garrapatas en el hato bovino y la efectividad de un tratamiento como garrapaticida a base de hojas de *Gliricidia sepium* deshidratadas, molidas y puestas a fermentar en alcohol al 95%. Se usaron 20 vacas distribuidas en dos grupos de 10 cada uno, el primero tratado a base de extracto de *G. sepium* con 3 repeticiones y el grupo testigo que se trató con un producto químico comercial aplicando 35cc de manera tópica sobre la línea dorsal con una sola aplicación. En

consecuencia, la presencia de garrapatas medida por regiones anatómicas indica que al primer conteo hubo 14, 16, 5 y 4 garrapatas bajando a cero en el cuarto y último conteo para las regiones anatómicas anterior (papada, pecho, codo, base de pecho, paleta, perímetro torácico), posterior A (muslo, corvejón, ubre anterior a los dos lados, ingle), ventral (parte ventral, inserción de la ubre anterior, fuente de leche, y venas mamarias) y posterior B (ubre posterior, ligamento suspensor, inserción de la ubre posterior, cola e isquion) para los animales tratados con matarratón. En el caso de aplicación de Fipronil y Fluazurán pasó de una presencia de 11, 18, 8 y 4 en el primer conteo a una de 0, 1, 0 y 0 para las regiones anatómicas anterior, posterior A, ventral y posterior B, respectivamente. Por tanto, la presencia de garrapatas disminuyó notablemente después del uso de matarratón y no hubo diferencias significativas con el tratamiento a base de fipronil y fluazuron. Ya que, la efectividad del tratamiento con matarratón para cada región anatómica estudiada en los bovinos fue: Región anterior: 100%; Región posterior A: 100%; Región ventral: 87% y Región posterior B: 100% lo que indica que es altamente útil en su uso como garrapaticida.

Por otra parte, Montecé (2019), evaluó la composición química, degradabilidad y cinética ruminal *in situ* de la MS (materia seca); MO (materia orgánica); PC (proteína cruda); FDN (fibra detergente neutro) y FDA (fibra detergente ácido) del matarratón (*G. sepium*) en diferentes periodos de corte (30; 45; 60; 75; 90 y 105 días). Primero, la MS; MO y la MI (materia inorgánica), no fueron afectadas por la edad o los periodos de corte evaluados. Sin embargo, el mayor porcentaje de PC y FDN, se registró a los 30 y 60 días de corte (23,07 y 52,93%, respectivamente). A su vez, el mayor porcentaje de degradabilidad *in situ* de la MS, se obtuvo a los 105 días del periodo de corte con 24 horas de incubación (99,46%). Además, la mayor degradabilidad de la MO se registró a los 30 días del periodo de corte a las 96 horas de incubación (96,23%). Pero, los mayores valores para la degradabilidad *in situ* de la FDN y FDA, se registraron a los 45 días del periodo de corte, a las 96 horas de incubación (93,79% y 73,57, respectivamente). Por último, la mayor Degradabilidad Efectiva (DE: 2; 5 y 8% / horas) de la MS se registró a los 75 días, y la MO a los 30 días del periodo de corte. Estos resultados, sugieren utilizar el matarratón en la alimentación de rumiantes y no

rumiantes entre los 30 y 60 días de rebrote, debido a que, se obtiene el mayor porcentaje de proteína. Y, en relación a los valores obtenidos en la cinética ruminal *in situ* indican que el matarratón puede ser incluido como una alternativa en planes de alimentación animal.

Antecedentes Históricos

La curación con plantas medicinales es tan antigua como la humanidad misma. Al iniciar el siglo XIX fue un punto de inflexión en el conocimiento y uso de plantas medicinales. El descubrimiento, la justificación y el aislamiento de alcaloides de la adormidera (1806), ipecacuana (1817), strychnos (1817), quinina (1820), granada (1878) y otras plantas, luego el aislamiento de glucósidos marcó el comienzo de la investigación científica. Con la mejora de los métodos químicos, también se descubrieron otras sustancias activas de plantas medicinales como taninos, saponósidos, aceites etéricos, vitaminas, hormonas, entre otros.

Para empezar, la familia Fabaceae fue descrita en el siglo XIX por John Lindley, aunque previamente Antoine Laurent de Jussieu había descrito la familia con el nombre de Leguminosae. Es probable que las semillas de leguminosas y los granos de cereales, hayan sido los primeros alimentos utilizados por el hombre para su consumo. Ciertamente, esta selección fue probablemente muy difícil para el caso de las leguminosas; por ser una familia amplia, con aproximadamente 600 géneros, 13000 especies y con gran estima por su importancia en la dieta humana y animal, pero que se pueden considerar plantas de cierto riesgo en su consumo porque contienen factores antinutricionales (FAN) tales como taninos, saponinas y triterpenos (Scull y Savón 2011).

Mediante el uso de los ensayos químicos cualitativos del tamizaje, Scull y Savón (2011), realizaron la caracterización fitoquímica en harinas de forrajes de cinco plantas (*Cannavalia ensiformis*; canavalia, *Trichantera gigantea*; *tricantera*, *Morus alba*; y *Gliricidia sepium*) con potencialidades de uso en la alimentación animal. El estudio incluyó análisis de taninos, flavonoides, alcaloides, saponinas, aminoácidos, antocianidinas, triterpenos y/o esteroides. Se encontró que la totalidad de las harinas

contenían polifenoles, alcaloides y azúcares reductores. Los mayores niveles de alcaloides se hallaron en las harinas de matarratón. Los resultados encontrados en la caracterización fitoquímica mostraron diferentes comportamientos de los metabolitos secundarios en las distintas plantas.

Es necesario resaltar que los extractos de las hojas del matarratón, tienen potencial como biofungicidas, debido a la presencia de flavonoides con propiedades alelopáticas, destacándose su efecto sobre hongos fitopatógenos. En tal sentido, Urdaneta et al. (2014) realizaron una investigación para determinar los flavonoides presentes en el extracto etanólico de hojas de *G. sepium* empleando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se identificaron y cuantificaron los flavonoides ácido ortocumárico (28,26%), cumarina (3,71%), quercetina (2,42%), luteolina (1,07%), kaempferol (0,36%) y miricetina (0,1%). Se evaluaron in vitro tres estándares de los compuestos encontrados en mayor proporción en el extracto. Las concentraciones ensayadas fueron 0,125; 0,250 y 0,50%, de los cuales sólo la cumarina y el ácido ortocumárico ejercieron un efecto sobre la inhibición del crecimiento micelial y de la esporulación de *Colletotrichum acutatum*. El efecto de la cumarina al 0,25 y 0,5 % fue fungicida, mientras que el ácido orto-cumárico al 0,5% tuvo un efecto fungistático. Estos resultados evidencian el potencial de los extractos vegetales de *G. sepium* como biofungicida.

Bases Teóricas

Familia Fabaceae o Leguminosae

Las fabáceas (Fabaceae) o leguminosas (Leguminosae), son una familia del orden de las fabales. Reúne árboles, arbustos y hierbas perennes o anuales, fácilmente reconocibles por su fruto tipo legumbre y sus hojas compuestas y estipuladas. Es una familia de distribución cosmopolita con aproximadamente 750 géneros y unas 20.000 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 halla 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.

Asimismo, las fabáceas son la familia más representativa en los bosques tropicales lluviosos y en los bosques secos de América y África (Llamas y Acedo, 2016). Junto con los cereales y con algunas frutas y raíces tropicales, varias leguminosas han sido la base de la alimentación humana durante milenios, siendo su utilización un compañero inseparable de la evolución del ser humano (Palma y González, 2018).

Filogenia de la Familia Fabaceae

En el Grupo de Filogenia de Angiospermas APG IV (2016) se mantiene el orden Fabales que incluye Fabaceae (Leguminosae), Polygalaceae, Quillajaceae y Surianaceae. Es decir, se mantienen las mismas familias y en el caso de la familia Fabaceae también el mismo contenido. La familia Fabaceae ha sido tradicionalmente incluida en las Fabales, estrechamente emparentadas con el “core” Rosidae, uno de los principales linajes de plantas con flores (Llamas y Acedo, 2016).

Los estudios de filogenia molecular de las leguminosas han aclarado notablemente las controversias que existieron en torno a estas. Está aceptado actualmente que todas las leguminosas pertenecen a un gran grupo taxonómico, una única familia con al menos dos subgrupos o linajes que se distinguen bien tanto molecular como morfológicamente: las Papilonoideae (Fabaceae, en el sentido estricto para algunas clasificaciones precedentes) y las Mimosoideae. Además de estos dos grupos, se acomodan entre ellas, el resto de las leguminosas que forman una mezcla de gran variación morfológica y molecular y que suele tratarse como la tercera subfamilia, de este modo, este grupo se ha reconocido como Cesalpinoideae. (Llamas y Acedo, 2016).

Género *Gliricidia*

Diversos autores indican un rango natural muy amplio, es claro que *Gliricidia* es nativa solo de los climas secos estacionales, ocupando dunas de arena costera, bancos ribereños, planicies inundadas y otras áreas perturbadas. Fuera y dentro de su ámbito natural *Gliricidia* ha sido probada con éxito para una gran cantidad de usos.

Además de *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. se reconocen dos especies del género *Gliricidia*, que son menos utilizadas: *G. maculata* y *G. guatemalensis*. La primera especie es nativa de la Península de Yucatán en México, distinguiéndose de *G. sepium* por su flores blancas y por sus vainas y semillas más pequeñas. *G. guatemalensis* es una especie de zonas altas entre los 1500 y 2000 m de altitud. Es un arbusto pequeño de hasta 3m de altura, con flores rojo-purpura y hojas pequeñas redondeadas (Madreado especie de árbol de uso múltiple en América Central, 1991).

Especie Gliricidia sepium (Jacq.) Kunth ex Walp.

También conocida como Matarratón, es una especie de rápido y vigoroso crecimiento, vive de 80 a 100 años, se caracteriza por expresar grandes contenidos nutricionales. Esta planta también es conocida con los nombres de Madrecacao, Madero Negro, Piñón Cubano, Rabo de Ratón entre otros (Jiménez et al., 2013).

Esta leguminosa arbórea originaria de Centro América y norte de Sur América, pertenece a la familia de las Fabáceas y crece desde el nivel del mar hasta los 1600 m de altitud, en una amplia variedad de suelos incluyendo los ácidos con pH de 5 a 7, y erosionados, con buen crecimiento tanto en suelos livianos como en los profundos. El matarratón puede alcanzar hasta 15 m de altura con una producción de 6200 kg/ha/corte de forraje verde en época de lluvia y 800 kg/ha/corte en época seca, con cortes trimestrales (Hurtado *et al.* 2012).

Taxonomía de Gliricidia sepium (Jacq.) Kunth ex Walp.

En la Tabla 1, se muestra la clasificación taxonómica de *G. sepium*.

Tabla 1

Taxonomía de G. sepium (Jacq.) Kunth ex Walp.

Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae Lindl., 1836
Subfamilia	Papilionoideae o Faboideae
Género	<i>Gliricidia</i> Kunth, 1824
Especie	<i>Gliricidia sepium</i> (Jacq.) Kunth ex Walp.

Tomado y modificado de Lemos, 2014.

Descripción Botánica de Gliricidia sepium (Jacq.) Kunth ex Walp.

Forma. Árbol (Figura 1), arbusto caducifolio, de 2 a 15 m (hasta 20) m de altura, con un diámetro entre 25 y 60 cm (Palma y González, 2018).

Figura 1

Árbol de Gliricidia sepium (Jacq.) Kunth ex Walp.



Fuente propia

Copa / Hojas. Copa irregular. Amplia cobertura del follaje. Hojas compuestas, alternas, e imparipinnadas (1) (Figura 2). Miden de 12 a 30 cm de largo (incluyendo el

pecíolo). Compuestas por 7 a 25 folíolos opuestos, ovados a elípticos, con el margen entero. Estos árboles pierden sus hojas en la época de floración que ocurre entre los meses de febrero y marzo.

Tronco / Ramas. Tronco un poco torcido. Ramas ascendentes y luego horizontales. La forma del árbol es variable, desde erecta y recta en algunas procedencias, hasta retorcida y muy ramificada, con tallos múltiples originados cerca de la base.

Corteza. Externa es escamosa a ligeramente fisurada, pardo amarillenta a pardo grisácea y la interna es de color crema amarillenta, fibrosa, con olor y sabor a rábano. Grosor total es de 8 a 10 mm.

Flor(es). Las flores son rosadas y se agrupan en racimos densos de 10 a 20 cm de largo, situados en las axilas de las hojas caídas **(2)** (Figura 2). Cada racimo tiene de 15 a 50 flores zigomorfas, de 2 a 3 cm de largo, dulcemente perfumadas. Corola en forma de mariposa.

Figura 2

Hojas, flores, frutos y semillas de G. sepium (Jacq.) Kunth ex Walp.



Tomado y modificado de Palma y González, 2018.

Fruto(s). Vainas lineares y dehiscentes a lo largo de 2 suturas, aplanadas, de 10 a 20 cm de largo y 1 a 3 cm de ancho, agudas, péndulas, con nervadura fina, verde limón o pardo claras cuando son nuevas y oscuras al madurar **(3)** (Figura 2). Cada vaina con 3 a 10 semillas.

Semilla(s). Las semillas son pardo-amarillentas, de 7.9 a 18 mm de largo por 12 a 15 mm de ancho, casi redondas, aplanadas, de superficie lisa (4) (Figura 2). El hilo es blancuzco, ligeramente protuberante y contiguo al micrópilo. La testa es dura y ósea.

Raíz. En plantas provenientes de semillas el sistema radical es fuerte y profundo, con una raíz pivotante y raíces laterales en ángulos agudos respecto de la raíz principal. En las plantas provenientes de estacas, las raíces son superficiales.

Sexualidad. Hermafrodita (Palma y González, 2018).

Origen y Extensión de Gliricidia sepium (Jacq.) Kunth ex Walp.

Se extiende naturalmente desde el sur de México, por toda América Central hasta Colombia, Venezuela y las Guayanas. Su amplitud ecológica va de los 7° 30' de latitud sur en Panamá, hasta los 25° 30' latitud norte en el noroeste de México. Se ha introducido y naturalizado con éxito en muchas zonas tropicales: en el norte de América del Sur, hasta Brasil, en el Caribe, Hawaii, Florida (Estados Unidos), oeste de África, sureste de Asia (Tailandia, Filipinas e Indonesia) y Australia. Nativa de Centroamérica y norte de Sudamérica. Naturalizada en Cuba, Jamaica, Santo Domingo, Haití, Puerto Rico, Trinidad y Curazao (Palma y González, 2018).

Usos de Gliricidia sepium (Jacq.) Kunth ex Walp.

Es una especie considerada multipropósitos por la variedad de usos que posee, la madera es utilizada de forma artesanal, como combustible (leña, carbón), en la construcción rural y pesada, en la elaboración de implementos agrícolas y mangos para herramientas. Del mismo modo, el tronco se emplea como cerco vivo y estaca viva para soporte de especies trepadoras como la vainilla.

Es de uso medicinal al ser empleadas sus hojas, tallo y corteza en forma de emplastos y baño general como remedio (Palma y González, 2018). La decocción de las hojas ha sido usada en Mesoamérica como un expectorante y a su vez como febrífugo, lo cual ha sido aprovechado para tratar síntomas relacionados con malaria. También, esos extractos se emplean para tratar heridas y erisipelas (infecciones agudas

de la piel). Además, en Centroamérica la decocción de la corteza es usada para controlar protozoarios y dermatosis contagiosas como el impétigo y similares.

Agregando a lo anterior, las hojas en particular, el campesino las coloca dentro de sus zapatos para evitar hongos en los pies y en sitios donde duermen perros y gatos para eliminar pulgas, de igual modo, en gallineros para controlar totolates y otros. En ese mismo contexto, también es común hervir ramas de esta planta para bañar ganado con el fin de eliminarles garrapatas (Villegas et al., s.f.).

Se ha reportado el uso de las hojas y vástago como muy buen forraje para ganado (chivos, burros, vacas). Las hojas contienen un alto porcentaje de proteína cruda (18 a 30 %) y el valor de digestibilidad de la hoja seca, va de 48 a 78 %. Sin embargo, las hojas resultan venenosas para perros, caballos y ratas (Palma y González, 2018).

Al mismo tiempo, posee actividad tóxica debido a que las semillas, corteza y raíces tienen mayor contenido de sustancias tóxicas que se usan para envenenar a un particular roedor nativo de Costa Rica conocido como taltuza, el cual causa daños en campos de cultivo (Villegas et al., s.f.). Aunado a esto, le describen actividad insecticida contra el barrenador mayor de los granos (*Prostephanus truncatus*); gorgojo pinto del frijol (*Zabrotes subfasciatus*) y conchuela del frijol (*Epilachna varivestis*) (Palma y González, 2018). Es necesario resaltar, que particularmente las semillas son muy tóxicas lo cual sugiere importante potencial medicinal (Villegas et al., s.f.)

Composición Química y Valor Nutricional de Gliricidia sepium (Jacq.) Kunth ex Walp.

Gliricidia sepium, se ha venido utilizando como alternativa alimenticia en bovinos, ovinos y caprinos, ya que como se ha descrito anteriormente ésta leguminosa posee un gran potencial de proteínas, minerales, vitaminas y carbohidratos (Montecé, 2019).

Mejía (2019), explica que las hojas del matarratón tienen un alto contenido de proteína bruta (PB), el cual es variable de acuerdo con los días de corte, a mayor tiempo de corte el contenido de proteína cruda disminuye de manera gradual en las hojas, alcanzando hasta un 32% de PB a los 45 días después del corte. Del mismo modo, el investigador menciona que en el tallo, el matarratón alcanza un 10.8% de contenido de

PB, siendo menor en comparación a la hoja; el contenido de materia seca es alrededor del 22%.

En la tabla 2, se presentan valores de análisis proximales reportados por varios autores a nivel mundial.

Tabla 2

Composición bromatológica del follaje de G. sepium (Jacq.) Kunth ex Walp.

AUTOR	MS%	PC%	FC%	CNZ%
García et al. (2006)	39,5	20		9,8
Araque et al.(2006)				
3 meses	8,75	28,31		8,38
12 meses	13,39	20,64		7,40
Pavón et al. (2003)	20	24,8	18	12
Estrada (2001)	24,9	28		8,9
Otarola (1995)		20 a 27		
Palma et al. (1995)		24	24	
Pedraza (1992)				
2 meses	19,5			
6 meses	37,5			

MS: materia seca, PC: proteína cruda, FC: fibra cruda, CNZ: ceniza

Tomado y modificado de Cardozo, 2013.

De acuerdo a lo anterior, es importante señalar que la variación de la calidad nutricional, fue descrita por Araque et al. (2006) que consideró diferentes estadios de crecimiento de la planta y encontró que a medida que el rebrote madura desde 3 a 12 meses, existe un incremento ($P < 0.5$) en el contenido de la materia seca, con valores que ascienden de 8,75 a 13,39%, respectivamente. Así mismo Pedraza (1992), reportó valores ascendentes de 19,5 a 37,5 % de materia seca, cuando fue evaluada la edad de rebrote del mataradón de 60 a 180 días (Cardozo, 2013).

En la Tabla 3, se observan los valores de la composición mineral de *G. sepium* encontrados por diferentes autores.

Tabla 3*Composición mineral de G. sepium, reportados por diferentes autores*

Autor	Ca%	P%	K%	Na%	N%	Mg%	Mn ppm	Zn ppm
Duran (2004)								
6 meses	1,38	0,18	3	0,16		0,41	50	22
Macias et al. (2004)	1,43	0,21	0,97	0,03		0,38		
Araque et al. (2002)								
6 meses	0,10	0,29	2,12			0,31	27	39,24
Catie (1991)		0,27	2,83		4,49			
Murgelio (1990)	1,4	0,3	2,4		4,6	0,4		

Ca: calcio, P: fosforo, K: potasio, Na: sodio, N: nitrógeno, Mg: magnesio, Zn: zinc, pm: partes por millón.

Tomado y modificado de Cardozo, 2013.

Las concentraciones de nitrógeno hallados por los diferentes autores en las hojas de *Gliricidia sepium* no muestran diferencias significativas. Con respecto al Mg, Mn y Zn los aumentos en sus valores son directamente proporcionales a la edad de la planta. Los valores de estos elementos aumentaron ($P < 0.5$) a medida que la planta maduraba de 3 a 12 meses de edad (Cardozo, 2013).

Las investigaciones realizadas sobre esta especie no solo se centran en su potencial para el forrajeo debido a su alta concentración de proteína, sino también, por la presencia de carotenos y concentración de taninos, lo cual facilita la aceptabilidad de ésta por los animales (Edwards et al., 2012). Del tal manera, se han reportado como principales metabolitos secundarios activos (Figura 3): En hojas: cumarina simple (5), ácido melilótico (6) y un flavonol glicosidado conocido como robinetina (7) (Villegas, et al., s.f.).

Otros flavonoides identificados y cuantificados, a partir de las hojas de esta planta, son el ácido-ortocumárico y la miricetina (Urdaneta et al., 2014).

Por otro lado, Scull y Savón (2011), realizaron un estudio sobre la caracterización fitoquímica de las harinas de forrajes de diferentes plantas, entre ellas *G. sepium* con

el objetivo de determinar las diferencias en su composición química. Los resultados del tamizaje fitoquímico en las harinas foliares evidenciaron la presencia de metabolitos secundarios (Tabla 4). La totalidad de las plantas contenían polifenoles, alcaloides, azúcares reductoras y grupos amino y el 50% de ellas, saponinas. En orden descendente se hallaron otros metabolitos como antocianidinas, flavonoides y cumarinas. No se halló la presencia de quinonas y glicósidos cardiotónicos.

Tabla 4

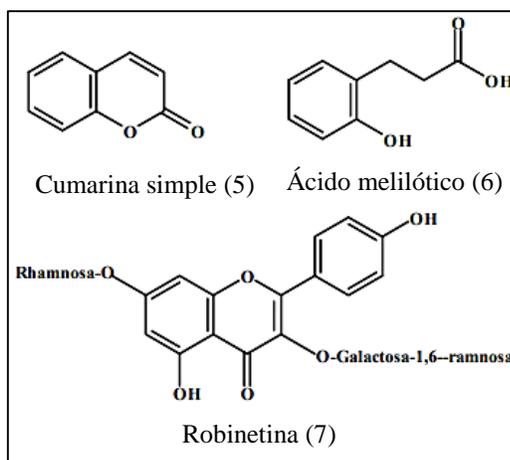
Tamizaje fitoquímico en hojas de G. sepium (Jacq.) Kunth ex Walp.

	Leguminosa. Harina de follaje					
	<i>Cannvalia ensiformis</i>	<i>Lablab purpureus</i>	<i>Trichantera gigantea</i>	<i>Stizolobium aterrimum</i>	<i>Morus alba</i>	<i>Gliricidia sepium</i>
Taninos	+	+	++	+++	++	+
Alcaloides	+	++	+	+++	+	+++
Flavonoides	-	-	-	+	-	-
Saponinas	++	-	-	++	+++	-
Triterpenos	++	+	++	++	+++	++
Antocianidinas	-	++	-	+	-	-
Azucares reductores	+	+	+	++	++	+
Cumarinas	-	-	-	-	+	-
Quinonas	-	-	-	-	-	-
Grupo amino	++	+	++	+++	++	++
Glicosidos cardiotonicos	-	-	-	-	-	-

Tomado y modificado de Scull y Savón, 2011.

Figura 3

Componentes químicos principales en hojas de *G. sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp.

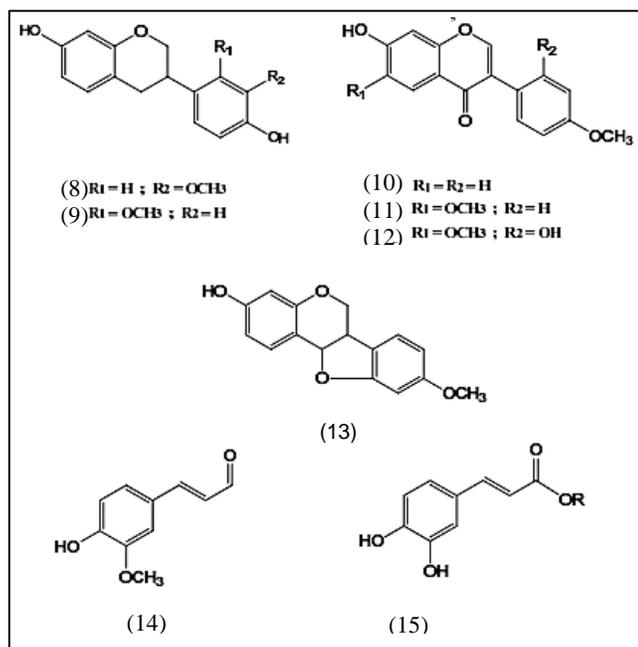


Tomado y modificado de Villegas et al., s.f.

En corteza y madera: isoflavanoides (8), (9). Isoflavonoides (10), (11) y (12). Pterocarpanos (13), aldehído ferúlico (14) y Trans-31, 41 - dihidroxicinnamic-octacosiléster (15) (Figura 4) (Villegas et al., s.f.).

Figura 4

Principales metabolitos secundarios aislados de corteza y madera de *G. sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp.



Tomado y modificado de Villegas et al., s.f.

Según Edwards et al. (2012), la presencia de taninos es reportada en los rebrotes más jóvenes para generar reservas de carbono, sin embargo, es de las leguminosas con menor producción de este tipo de metabolito. En el extracto etanólico se reportaron aceites esenciales, cumarinas simples, alcaloides, fenoles simples, flavonoides y baja concentración de saponinas y esteroides (Galindo et al., 1989). Además, Cáceres (1993) indicó que la corteza y las hojas son ricas en isoflavonoides, de manera similar, en una investigación realizada por Jurd (1976) se evidenció la presencia de robinetina en las hojas del matarratón. Sin embargo, Castillo et al (2005) y Ortiz (2010) realizaron pruebas de laboratorio en donde niegan la presencia de flavonoides.

Metabolitos Primarios

El reino vegetal produce miles de compuestos orgánicos, producto del metabolismo primario, el cual consiste en una serie estrechamente coordinada de reacciones químicas mediadas por enzimas, que tienen lugar en el organismo de las plantas, dando como resultado la síntesis y el uso de una amplia variedad de moléculas. De modo que, los compuestos esenciales para la supervivencia, crecimiento y reproducción de las plantas, se describen como metabolitos primarios, se encuentran ampliamente difundidos en la naturaleza, siendo estos los aminoácidos, ácidos grasos, carbohidratos, nucleótidos y polímeros derivados de ellos, que originan monosacáridos, proteínas, lípidos, ADN y ARN (Bosco y Butnariu, 2022).

Determinación de Metabolitos Primarios

Análisis Proximal. El sistema más antiguo para determinar el contenido de nutrimentos de los alimentos es la metodología de Weende desarrollada en el siglo 19 en Alemania, la cual es generalmente llamada el “análisis proximal” o “análisis inmediato” del alimento. Este análisis consiste en la determinación de manera general de los porcentajes de ciertos componentes de propiedades químicas o nutritivas similares las cuales son agrupadas en las siguientes determinaciones (Montecé, 2019):

Humedad. Es la magnitud que expresa la cantidad de agua en un material sólido y se puede representar en términos de una base de masa seca o de una base de masa

húmeda (Martines y Lira, 2010). El método más común para determinar el contenido de humedad es analíticamente a través de un proceso de evaporación con la ayuda del calor, sustentado en la separación del agua de la materia prima por secado en estufa a temperaturas superiores a 100 ° C, dónde hay una pérdida de peso, en el que el contenido de humedad se determina a partir del cambio de peso de la muestra después de la evaporación del agua absorbida por la estufa o mufla; correspondiendo a la diferencia de entre el peso inicial y el peso de la materia seca, este método se conoce como volatilización indirecta (Tirado et al., 2015).

Ceniza. Es un residuo inorgánico que se obtiene al incinerar la materia orgánica en un producto cualquiera, representan la fracción correspondiente a los minerales. Para tal fin, se debe incinerar una porción de muestra exacta pesada en un crisol de porcelana o platino, utilizando un horno de mufla a temperaturas entre 500 y 600 ° C alrededor de 24 horas, la matriz debe destruirse calentando suavemente al principio para carbonizar la muestra y así impedir que los lípidos y azúcares formen espuma. El análisis se da por terminado cuando el residuo está libre de partículas carbonosas (de color negro) y las cenizas presenten un color blanco o gris uniforme, el crisol se enfría en un desecador y se pesa en balanza analítica hasta peso constante (Caravaca et al., 2003). Generalmente el valor de ceniza total es necesario cuando se necesita calcular los carbohidratos (por diferencia), ya que desde el punto de vista nutricional el contenido de ceniza tiene escaso valor, salvo para proporcionar una estimación aproximada del material inorgánico (Greenfield y Southgate, 2006). Una vez determinada la materia seca y la ceniza por diferencia se puede obtener el contenido de materia orgánica (Caravaca et al., 2003).

Contenido de Lípidos. La fracción denominada extracto etéreo (EE) o grasa cruda, son las sustancias orgánicas que más energía bruta aportan, comprenden aceites, grasas y otros materiales liposolubles (Mora, 2007). Generalmente, se obtienen a partir de los métodos gravimétricos por extracción, con el empleo de solventes orgánicos como el éter de petróleo o éter etílico que solubilicen el compuesto o con una solución ácida, básica o neutra. Comúnmente, se emplea el método de Soxhlet, este procedimiento emplea un equipo diseñado de modo que la porción fresca del solvente este en contacto

con la muestra por un largo tiempo, se basa en la separación de la fracción lipídica del resto de los compuestos de la matriz y la posterior medida de la fracción separada. El solvente se elimina del balón por evaporación, quedando en este último el residuo lipídico extraído, el cual se determina por diferencia de pesada entre la masa del balón que contiene el residuo y la masa del balón vacío, previamente tarado (Zumbado, 2002). El valor obtenido es una buena aproximación del contenido de lípidos de los alimentos, aunque incluya otras sustancias (Caravaca et al., 2003).

Proteínas. Son los principales constituyentes estructurales de las células y los tejidos, es la fracción nitrogenada de los alimentos que se obtiene mediante el análisis químico, denominada proteína bruta (PB); que no es más que una determinación del nitrógeno total liberado por un proceso de digestión química (Mora, 2007). Para su determinación se utiliza el método de Kjeldahl que consiste en una mineralización del nitrógeno de una muestra de alimento mediante ácido sulfúrico concentrado en presencia de un catalizador, este tratamiento convierte el nitrógeno amínico en sal amoniacal y es recogido en una solución básica, posteriormente se realiza una titulación para determinar la cantidad de nitrógeno amoniacal y el resultado obtenido se multiplica por 6,25, con lo que se obtiene una aproximación del contenido de nitrógeno proteico existente en el alimento. Se trata de una medida aproximada, ya que no todo el nitrógeno de los alimentos se encuentra en forma de proteína (Caravaca et al., 2003).

Fibra Cruda. Es el total de polisacáridos que contienen las plantas, son carbohidratos complejos que pueden ser atacados por las enzimas de la microflora intestinal, a excepción de la lignina. Se puede determinar a través de métodos espectrofotométricos, cromatográficos y gravimétricos, este último, consiste en exponer la muestra a una digestión ácida seguida de una alcalina, al someter la muestra a dos hidrolisis sucesivas, se obtiene un residuo que contiene la fracción de celulosa asociada a lignina, además de cierta cantidad de hemicelulosa, lo que se denomina fibra cruda (FC), es un método de análisis que nos indica la cantidad de hidratos de carbono no digeribles para animales monogástricos (Zumbado, 2002; Caravaca et al., 2003; Mora, 2007).

Extracto no nitrogenado. Representa la fracción de los carbohidratos solubles, en esta categoría se encuentran el almidón, pectinas, gomas y mucílagos. Se determina por diferencia entre los valores del peso inicial de la muestra analizada y la suma de las demás fracciones obtenidas mediante los análisis anteriormente descritos (Caravaca et al., 2003).

Productos Naturales

Se trata de compuestos químicos producidos por el metabolismo secundario de los organismos vivos, encontrándose constituidos por moléculas con diferentes estructuras, propiedades y orígenes biosintéticos, que tienen utilidad tanto para el hombre como para la adaptación de las plantas al medio ambiente (Ringuelet y Viña, 2013). Los productos naturales son metabolitos secundarios que las plantas han desarrollado a lo largo de su evolución como mecanismos defensivos frente a patógenos (Ávalos y Pérez, 2009).

Metabolitos Secundarios

Son compuestos químicos sintetizados a partir de excedentes del metabolismo primario. Los productos provenientes del metabolismo primario (aminoácidos, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos) participan directamente en el crecimiento y supervivencia de las plantas, pero los metabolitos secundarios actúan como mediadores, siendo sustancias naturales que sintetizan los tejidos vegetales para protegerse de depredadores como bacterias, hongos e insectos. Estos compuestos son dentro de las características indeseables de los alimentos no convencionales, los que provocan respuestas negativas más dramáticas. Por otra parte, en los últimos tiempos se desarrolla un nuevo enfoque que se orienta hacia la exaltación de las propiedades benéficas de estos compuestos en apropiadas circunstancias (Scull y Savón, 2011).

Los metabolitos secundarios se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas, muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como

medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros (Ávalos y Pérez, 2009).

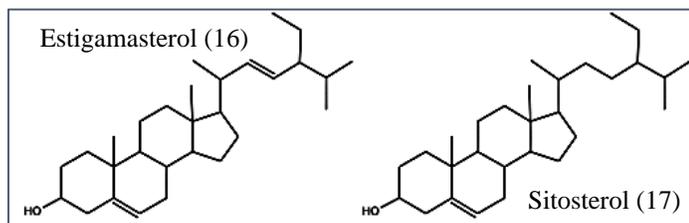
También, Ávalos y Pérez (2009), agrupan a estos compuestos secundarios en cuatro clases principales, siendo estos los terpenos, que incluyen las hormonas, pigmentos o aceites esenciales; los compuestos fenólicos, como las cumarinas, quinonas fenólicas, flavonoides, lignina, taninos entre otros; los glicósidos, destacando las saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos; por último los alcaloides. Cada metabolito cumple funciones diferentes que se incluyen a continuación:

Terpenos. Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40.000 moléculas diferentes). El isopentenil bifosfato y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP) son los precursores activados en su biosíntesis. El grupo de los terpenos, incluye hormonas (giberelinas, ácido abscísico y citoquininas), pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), esteroides (ergosterol, sitosterol, colesterol), derivados de los esteroides (glicósidos cardiacos), latex y aceites esenciales siendo estos los que proporcionan el olor y el sabor característico de las plantas (Ávalos y Pérez, 2009).

Los autores anteriormente mencionados también explican que, los terpenos derivan de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de C), clasificándolos de esta forma, por el número de unidades de isopreno que contienen. Los terpenos de 30 C se denominan triterpenos, encontrándose en este grupo esteroides y esteroides, estos últimos contienen un grupo alcohol, y es el caso de casi todos los esteroides vegetales siendo los más abundantes en las plantas el estigmasterol (**16**) y el sitosterol (**17**) (Figura 5).

Figura 5

Estructura química del estigmasterol y el sitosterol



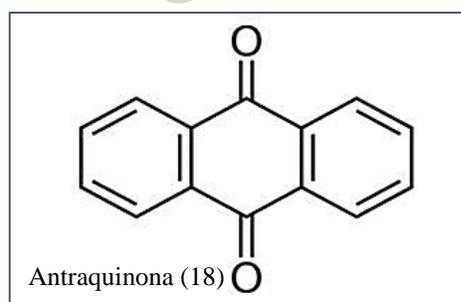
Tomado y modificado de Ávalos y Pérez, 2009.

Compuestos Fenólicos. Estas sustancias también reciben el nombre de polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo. En esta clase se incluyen las quinonas, cumarinas, lignanos, estilbenos y flavonoides; y los polímeros fenólicos, como las ligninas y los taninos, siendo estos de gran importancia en el crecimiento y reproducción de las plantas (Ávalos y Pérez, 2009). Algunos de los metabolitos anteriormente mencionados, se describen a continuación:

Quinonas. Son moléculas biológicas muy abundantes en la naturaleza que forman parte de los compuestos fenólicos, tienen una base aromática con dos grupos cetona, clasificándose según sus estructuras en benzoquinonas si son monocíclicas, naftoquinonas cuando sean bicíclicas y antraquinonas (**18**) (Figura 6) al tratarse de estructuras tricíclicas (Ochoa y Sarmiento, 2018). Se encuentran frecuentemente en la corteza o en la raíz, constituyen un grupo importante de pigmentos vegetales y animales, la mayoría posee una coloración intensa (Marcano y Hasegawa, 2002).

Figura 6

Estructura química de la antraquinona



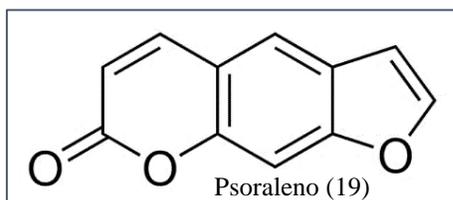
Tomado y modificado de Ávalos y Pérez, 2009.

Cumarinas. Son una diversa familia de lactonas, se han identificado en más de 800 especies de plantas. Actúan como agentes antimicrobianos y como inhibidores de germinación, a su vez, muestran fototoxicidad frente a insectos como es el caso del psoraleno (**19**) (Figura 7), una furanocumarina que se activa por la acción de la luz UV. La cumarina más simple es la bergamota, el cual es un aceite esencial que aporta aroma al tabaco de pipa y el té; las cumarinas más tóxicas son producidas por hongos, por

ejemplo, la aflatoxina producida por *Aspergillus flavus* considerándose, quizá el carcinogénico más potente de las toxinas naturales (Ávalos y Pérez, 2009).

Figura 7

Estructura química del psoraleno

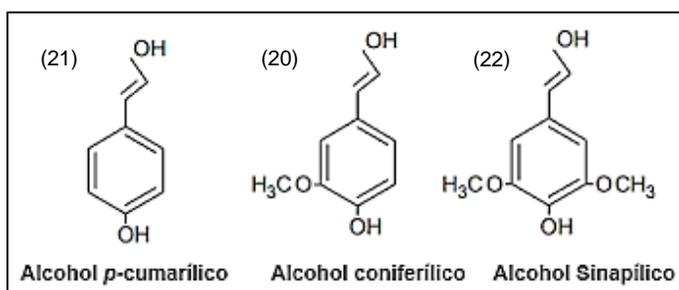


Tomado y modificado de Ávalos y Pérez, 2009.

Lignina. Según Ávalos y Pérez (2009), la describen como un polímero altamente ramificado de fenilpropanoide y se forma a partir de tres derivados del mismo: los alcoholes coniferílico (20), cumarílico (21) y sinapílico (22) (Figura 8). Es la sustancia orgánica más abundante en las plantas, después de la celulosa y su naturaleza química es la base de su dureza mecánica manifestándose en los tallos lignificados, los troncos de los árboles e imprimiendo su “carácter” a la madera. Es de gran importancia en las plantas debido a que fortalece los tallos y tejidos vasculares permitiendo el crecimiento vertical y la conducción de agua y minerales.

Figura 8

Estructura química de los alcoholes coniferílico, cumarílico y sinapílico



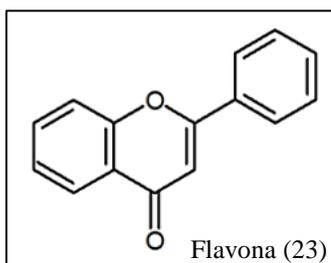
Tomado y modificado de Ávalos y Pérez, 2009.

Flavonoides. Se refiere a fenoles naturales que se pueden encontrar en forma de agliconas libres o como heterósidos. Entre sus funciones se encuentra la defensa y la pigmentación, su esqueleto carbonado contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos. Se clasifican en antocianinas

(pigmentos), flavonas (**23**) (Figura 9), flavonoles e isoflavonas. Las antocianinas son responsables de la mayoría de los colores de las flores y los frutos siendo importantes en la polinización y en la dispersión de semillas; las flavonas y flavonoles emiten longitudes de ondas más cortas invisibles al ojo humano pero, estas resultan ser atractivas para los insectos (Ávalos y Pérez, 2009).

Figura 9

Estructura química de la flavona.



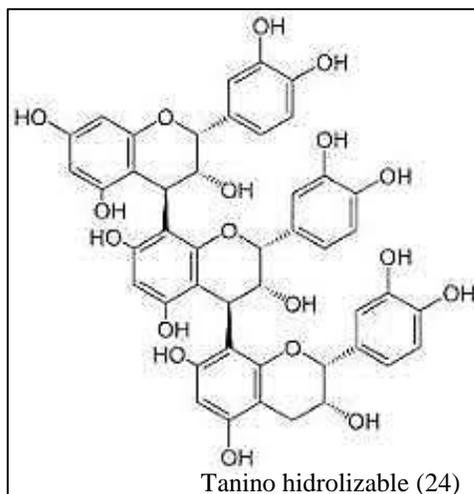
Tomado y modificado de Ávalos y Pérez, 2009.

Taninos. Según Ávalos y Pérez (2009), explican que son compuestos fenólicos poliméricos que se unen a proteínas provocando su desnaturalización. Su nombre se origina de la antigua práctica de utilizar extractos vegetales para transformar la piel animal en cuero. Existen dos categorías: taninos condensados y taninos hidrolizables (**24**) (Figura 10), estos actúan como repelentes alimenticios de muchos animales que evitan, en el caso de los mamíferos, plantas o partes de plantas que contienen altas concentraciones de taninos. Sin embargo, los taninos contenidos en el vino tinto tienen efecto beneficioso en la salud humana al bloquear la formación de endotelina-1, una molécula señal que provoca vasoconstricción.

Glicósidos. Son metabolitos vegetales muy importantes, tienen un enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardiacos y glicósidos cianogénicos (Ávalos y Pérez, 2009). De tal manera, Sierra y col., (2018), explican que estos metabolitos son utilizados por las plantas cumpliendo funciones de reserva, cuando éstas almacenan productos químicos en forma de glucósidos inactivos; es por ello que para el hombre representan una fuente de principios activos que despliegan distintas acciones terapéuticas.

Figura 10

Estructura química de los taninos hidrolizables

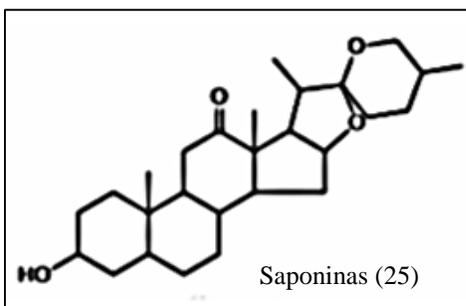


Tomado y modificado de Ávalos y Pérez, 2009.

Saponinas. Ávalos y Pérez (2009), describen a las saponinas (**25**) (Figura 11) como triterpenoides o esteroides que contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura. Se pueden presentar como agliconas, es decir, el terpeno sin el azúcar, en cuyo caso se denominan sapogeninas. La adición de un grupo hidrofílico, como lo es el azúcar a un terpenoide hidrofóbico da lugar a las propiedades surfactantes o detergentes similares al jabón que presentan las saponinas. Estas propiedades permiten su uso como un detergente natural, agente estabilizante y emulsificador en productos de limpieza y cosméticos.

Figura 11

Estructura química de las saponinas



Tomado y modificado de Ávalos y Pérez, 2009.

Alcaloides. Son una gran familia de más de 15.000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula y exhiben actividad biológica. Al menos el 20% se encuentran en plantas vasculares, la mayoría dicotiledóneas herbáceas. En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas al interactuar con neurotransmisores, siendo casi todos muy tóxicos a altas dosis. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajante muscular, tranquilizante, antitusivo o analgésico (Ávalos y Pérez, 2009).

En la Tabla 5, se muestra un resumen de las aplicaciones de algunos alcaloides.

Tabla 5

Alcaloides que se pueden aislar de algunas especies de plantas

Alcaloide	Planta	Uso
Cafeína	<i>Coffea arabica</i>	Estimulante del sistema nervioso central.
Cocaína	<i>Erythroxylon coca</i>	Anestésico tópico, estimulante del sistema nervioso central, bloqueante adrenérgico, droga de abuso.
Codeína	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésico y antitusivo.
Morfina	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésico, narcótico, droga de abuso.
Nicotina	<i>Nicotiana tabacum</i>	Tóxico, insecticida en horticultura, droga de abuso.
Escopolamina	<i>Hyoscyamus niger</i>	Narcótico, sedante.
Quinina	<i>Cinchona officinalis</i>	Tratamiento de la malaria.

Tomado y modificado de Ávalos y Pérez, 2009.

Extracto Vegetal

Son preparados concentrados de consistencia líquida, sólida o intermedia, obtenidos generalmente a partir de material vegetal desecado tratado con diferentes disolventes (etanol en diversos grados, agua u otro disolvente adecuado), escogidos en función de la mayor o menor capacidad de disolución de los principios activos, con el fin de conseguir una extracción óptima de estos (Castillo y Martínez, 2021). Estos extractos son utilizados por distintas áreas de la ciencia para investigar que compuestos están presentes en determinadas especies encontradas en la naturaleza (Castellano, 2021).

La eficacia de los extractos vegetales depende de diversos factores, entre los que destacan: especie e inclusive variedad vegetal, metodología de extracción, la calidad de las plantas, concentración utilizada, entre otros. (Castillo y Martínez, 2021).

Obtención de los extractos vegetales

Del mismo modo, Castillo y Martínez (2021) explican que a través de métodos de extracción se pueden obtener los principios activos de una planta mediante la utilización de un fluido. Los métodos de extracción con disolventes pueden ser continuos o discontinuos. Los métodos continuos son la percolación y el soxhlet, en ellos el disolvente actúa en una única dirección y permite la extracción prácticamente total de los principios activos de la droga vegetal (hojas, frutos, entre otros). Los métodos discontinuos son la maceración, la infusión, la decocción y la digestión, y en ellos el disolvente actúa en todas las direcciones sobre la droga vegetal.

Los métodos mencionados anteriormente se explican a continuación:

Métodos Continuos.

Método de Soxhlet. De acuerdo a la metodología descrita por Carroz y Gualtieri, (2015), es la técnica usada en la separación de sustancias orgánicas a partir de un material sólido (hojas, frutos, entre otros) empleando un solvente adecuado. Entre los solventes más usados en las extracciones están: Hexano, éter de petróleo, éter etílico, cloroformo, tetracloruro de carbono, alcohol etílico, metanol, entre otros. Para tal fin, se usa un aparato conocido como extractor de Soxhlet, el cual está diseñado de tal forma que permite que un mismo volumen del disolvente empelado, actúe repetidas veces sobre el material y extraiga la sustancia deseada. Al aplicar calor al balón, el disolvente hierve con suavidad y sus vapores ascienden por el lateral del cuerpo de Soxhlet, se condensan en el refrigerante y el condensado dentro del dedal que contiene el material a extraer, disolviendo las sustancias solubles en él. Esta solución es luego sifonada al balón arrastrando consigo las sustancias solubilizadas. Este proceso se repite automáticamente hasta que la extracción es completa.

Percolación. El material vegetal pulverizado se coloca en un percolador haciendo pasar continuamente el solvente a través de él, al atravesar sucesivamente las capas del material impelido por su propio peso y por la presión de la columna líquida, dicho solvente se satura de los principios solubles (Albornoz, 1980).

Métodos Discontinuos.

Maceración. Consiste en empapar la droga cruda fraccionada con el solvente para que este atraviese la estructura celular y disuelva la sustancia. El material se agita de vez en cuando por un periodo mínimo de dos días y hasta por semanas, posteriormente se decanta el líquido filtrándolo y exprimiendo el residuo (Albornoz, 1980).

Infusión. Consiste en colocar el material vegetal en un recipiente de vidrio o porcelana, sobre el cual se vierte una cantidad de agua hirviente que cubra el material y permita la acción extractiva por 10 o 15 minutos, para luego filtrar y dejar reposar, obteniendo así el extracto sin someterlo a ebullición (Castellano, 2021).

Digestión. Esta forma de maceración, involucra emplear calor moderado al material vegetal anticipadamente pulverizado, con el fin de aumentar el poder disolvente, utilizado principalmente en aquellas partes vegetales más duras, o que contienen sustancias poco solubles (Castellano, 2021).

Tamizaje Fitoquímico

Las ciencias que se relacionan con las especies vegetales, emplean el tamizaje fitoquímico o “screening” fitoquímico, como una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, el cual permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y, a partir de allí, orientar la extracción o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los compuestos químicos de mayor interés (Castillo y Martínez, 2021).

Para este estudio se debe tener en cuenta que la composición química de las plantas varía entre especies, en sus diferentes partes y de acuerdo a sus estados fenológicos, además de otros aspectos, siendo el tamizaje fitoquímico una herramienta útil en la identificación de nuevas sustancias químicas presentes en las plantas o sustancias ya

conocidas, mediante diversos métodos que pueden ser histológicos, químicos, fisicoquímicos o biológicos (Castillo y Martínez, 2021).

Algunas de las pruebas que permiten llevar a cabo el tamizaje fitoquímico son:

Ensayo de Liebermann–Burchard. Este ensayo permite identificar triterpenoides y esteroides, al darse una reacción donde el esteroide se oxida por la presencia de ácido sulfúrico que forma una molécula que contiene un doble enlace adicional, constituyendo un ensayo positivo cuando se da el cambio de coloración, las estructuras esteroidales se evidencian con una coloración verde y las estructuras triterpénicas a través de una coloración roja (Castellano, 2021).

Ensayo de Dragendorff. Esta prueba consiste en tratar el extracto vegetal con ácido clorhídrico para luego adicionar el reactivo de Dragendorff y, de esta manera obtener el precipitado anaranjado característico que revela la presencia de alcaloides (Castellano, 2021).

Ensayo de Wagner y Mayer. Los reactivos de Mayer y Wagner precipitan la mayoría de los alcaloides en medio ácido favoreciendo la formación de precipitados cristalinos de color blanco o rojo que indican presencia de alcaloides en la muestra (Castellano, 2021).

Ensayo de Cloruro Férrico. Esta prueba revela la presencia de compuestos fenólicos o taninos, al utilizar el extracto etanólico de la planta se determinan tanto fenoles como taninos, y con el extracto acuoso fundamentalmente taninos, siendo positivo el ensayo al formarse ciertas coloraciones según el tipo de compuesto (Castellano, 2021).

Ensayo de Shinoda. Este ensayo permite la identificación de flavonoides mediante la reacción del magnesio en medio ácido, que reduce el flavonoide dando lugar al producto coloreado que va del rojo al violeta (Castellano, 2021).

Ensayo de la Espuma. El ensayo consiste en agitar una solución acuosa de la muestra y, observar la formación de una espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de espesor o altura y que persista por más de 2 min, lo que indica la presencia de saponinas (Castellano, 2021).

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 al producirse turbidez o ruptura de la gelatina, lo cual indica que se ha llevado a cabo la desnaturalización de las proteínas (Castellano, 2021).

Ensayo del Hidróxido de Amonio. Mediante este ensayo se determina la presencia de quinonas al adicionar a una pequeña porción de cada extracto disuelto en etanol, unas gotas de hidróxido de amonio (NH₄OH) concentrado, siendo positiva la prueba al observar una coloración roja (Castellano, 2021).

Toxicidad del extracto etanólico de las partes aéreas de Gliricidia sepium (Jacq.) Kunth ex Walp. sobre Artemia salina

Las plantas han sido usadas desde tiempos ancestrales no sólo como forraje en la alimentación animal, sino también para el tratamiento y alivio de diversas dolencias del ser humano, es por ello, que los productos naturales están implicados en el desarrollo del 52% de nuevos medicamentos (Castillo y Martínez, 2021).

Las plantas elaboran una gran diversidad de productos químicos, algunos de estos, pueden ocasionar reacciones tóxicas a quienes la utilizan. Por tal motivo, el estudio de la química de las plantas es tan importante ya que podría provocar efectos graves en los organismos vivos, por esta razón, se utilizan ensayos de toxicidad, que permiten determinar aspectos como letalidad, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos evaluados por la reacción de los organismos de prueba (Castellano, 2021).

El test de *Artemia salina*, es un bioensayo de letalidad, muy utilizado para investigar la citotoxicidad de extractos de plantas. El género *Artemia* se engloba en el grupo de crustáceos branquiópodos anostráceos, siendo uno de los taxones más antiguos conocidos en la actualidad (Lizanda, 2019). Se conocen comúnmente como Artemias o monos de mar, y se encuentran distribuidos alrededor del mundo en aguas de elevada salinidad, en donde pueden crecer a temperaturas entre 6 y 35 °C (Castellano, 2021)

Específicamente, *Artemia salina* es un organismo que se caracteriza por poseer un cuerpo alargado y delgado, claramente segmentado, cubierto por una cutícula fina y

flexible de quitina. Anatómicamente, posee tres partes diferenciables: cabeza, tórax y abdomen, y de un color anaranjado, el cual puede variar a rojizo cuando se encuentra en aguas de elevada salinidad. Además, su aspecto y tamaño puede ser muy variables, dependiendo de las condiciones abióticas del medio, así como de la cepa o especie, aunque suele estar comprendido entre los 10 y 12 mm (Lizanda, 2019).

En la Tabla 6, se muestra la taxonomía de la especie *Artemia salina*.

Tabla 6

Taxonomía de la especie Artemia salina

Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Subfilo	Crustacea
Clase	Branchiopoda
Orden	Anostraca
Familia	Artemiidae
Género	<i>Artemia</i>
Especie	<i>Artemia salina</i>

Tomado y modificado de Castellano, 2021.

Los nauplios de *Artemia* (Figura 12), se utilizan mundialmente como alimento de peces y camarones, además, de su utilidad como organismo modelo en estudios fisiológicos, toxicológicos y ecológicos (Lizanda, 2019). Son utilizadas en las pruebas de toxicidad 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, durante 24 horas para determinar la dosis letal media (DL₅₀) expresada en µg/mL, constituyendo una herramienta valiosa al ser una prueba repetible y reproducible, que no necesita equipamiento ni entrenamiento especial, es rápida y se emplean pequeñas cantidades de muestras, además, los investigadores a través del tiempo han podido realizar modificaciones al procedimiento para mejorar el rendimiento del ensayo (Castellano, 2021).

Figura 12

Nauplios de Artemia salina



Tomado y modificado de Muñoz, 2021.

Definición Operacional de Términos

Ensilaje

Es un proceso fermentativo anaerobico de carbohidratos solubles que se encuentran en forrajes para producir ácido láctico. Se aplica para almacenar alimentos en tiempos de cosechas, llevando a cabo su conservación y mejorando propiedades tales como su palatabilidad, permitiendo llevar a cabo la mejora de la carga animal por hectárea (Utria et al., 2023).

Taxonomía

Es la ciencia que establece la clasificación a base de las relaciones filogenéticas de las plantas y la nomenclatura, en consecuencia, ordena grupos de plantas o seres vivos emparentados entre sí, poseedores de características comunes (Marzocca, 1985).

Potencial

Según el Diccionario Escolar Educativo Larousee (2011), puede definirse como aquello que dispone de potencia, es decir, capacidad para hacer algo o producir un efecto, susceptible de tener existencia.

Composición Química

Es la cantidad de nutrientes orgánicos y minerales presentes, así como la existencia de factores o constituyentes que influyen sobre la calidad de los pastos y forrajes (Montecé, 2019).

Materia Seca (MS)

Se refiere a la cantidad de alimento menos el agua contenida en dicho alimento, en otras palabras, si una muestra de alimento "X" se somete a un calor moderado (típicamente 65°C por 48 horas) de tal modo que toda el agua se evapore, lo que queda es la porción de materia seca de ese alimento (Montecé, 2019).

Fibra Detergente Neutra (FDN)

Es el valor de hemicelulosa, celulosa y lignina, obtenido de la extracción del material soluble neutro detergente y que separa el material vegetal en contenidos celulares (solubles) y en membranas celulares (insolubles) determinan que a mayor edad del follaje mayor es la cantidad de FDN (Montecé, 2019).

Fibra Detergente Ácida (FDA)

Es la parte del forraje que permanece después del tratamiento con detergentes ácidos. Está formada por Celulosa, Lignina y Sílice (no existe hemicelulosa porque está hidrolizada y se combina con la lignina). Cuando se obtiene valores altos de fibra detergente ácido, se aprecia que la digestibilidad del forraje es baja (Montecé, 2019).

Antioxidante

Alade et al. (2021), lo describen como una molécula capaz de retrasar o prevenir el deterioro, daño o destrucción provocados por la oxidación de otras moléculas.

Radicales Libres

Alade et al. (2021), indican que son átomos con un electrón libre, tienden a captar un electrón de las moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica, por lo tanto, son muy reactivos.

Dosis Letal Media (GE)

Es la cantidad de un material tóxico letal al 50 % de los organismos de la prueba (Castellano, 2021).

Operacionalización de las Variables de Investigación

Para operacionalizar el sistema de variables o el evento de estudio con el respectivo criterio de análisis, es necesario la definición conceptual y la operacional de las mismas (Hurtado, 2010). En tal sentido, las variables se operacionalizan con la finalidad de identificar los elementos y datos empíricos que expresan su presencia. En esta investigación se medirán las variables continuas con dimensiones dicotómicas y politómicas. El nivel de medición será nominal, ordinal y de intervalo, los indicadores derivarán de las bases teóricas. El proceso de la operacionalización de las variables garantizará que los objetivos propuestos sean alcanzados (Tabla 7).

www.bdigital.ula.ve

Tabla 7*Definición operacional de variables*

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional ¿Cómo se mide?	Dimensiones	Indicador
Potencial nutricional	Independiente Cuantitativa Intervalo	Según las Directrices del Codex. (1997), es el conjunto de nutrientes y propiedades que posee una planta con beneficios en la nutrición de un organismo.	Se mide a través del análisis proximal, el cual da un valor general de los componentes nutricionales de la planta (Ayala et al., 2006).	Presencia de proteínas, lípidos, carbohidratos y minerales (ceniza).	Porcentaje de proteínas, lípidos, carbohidratos y ceniza.
Composición química	Independiente Cualitativa Nominal	Comprende los ensayos de laboratorio que se efectúan para determinar los componentes químicos presentes en las plantas, con el fin de detectar los metabolitos relacionados con alguna actividad biológica (Carvajal et al., 2009).	A través del tamizaje fitoquímico que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta (Castillo y Martínez, 2021).	Presencia de terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos, alcaloides, quinonas, entre otros.	Aparición de un precipitado, turbidez, espuma o coloración.
Toxicidad sobre <i>Artemia salina</i>	Dependiente Cuantitativa Ordinal	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 media (DL ₅₀).	Extremadamente tóxico Altamente tóxico Moderadamente tóxico Ligeramente tóxico Prácticamente no tóxico Relativamente inocuo	% de letalidad Valores de DL ₅₀

Hipótesis

La especie *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp, perteneciente a la familia Fabaceae posee una gran variedad de compuestos químicos que se relacionan con los usos y efectos biológicos que se le atribuyen en distintas partes del mundo, por lo que es posible que los extractos de las partes aéreas de *G. sepium*, recolectada en el estado Mérida Venezuela, presenten alto valor nutricional, metabolitos secundarios y presenten toxicidad sobre *Artemia salina*.

Hipótesis Nula

La especie *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp, perteneciente a la familia Fabaceae posee una gran variedad de compuestos químicos que se relacionan con los usos y efectos biológicos que se le atribuyen en distintas partes del mundo, por lo que es posible que los extractos de las partes aéreas de *G. sepium*, recolectada en el estado Mérida Venezuela, no presenten alto valor nutricional, algunos metabolitos secundarios y no presenten toxicidad sobre *Artemia salina*.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

Marco Metodológico

Tipo de Investigación

El tipo de investigación tiene relación con la interrogante de estudio, en el cual se resalta lo que se quiere conocer. En tal sentido, esto marca el logro general que se desea conseguir durante el proceso de la investigación. Para identificar el tipo de investigación es importante conocer la relación que se quiere estudiar, de forma que, los tipos de investigación pueden ser: exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa (Hurtado, 2010). En particular, esta investigación es de tipo confirmatoria, debido a que tiene como propósito verificar las posibles relaciones entre eventos a partir del control de una serie de variables, por tal motivo, se confirmó la relación que existe entre el potencial nutricional y la composición química de *Gliricidia sepium* (Jacq.) kunth ex Walp., así como, la toxicidad de los extractos de las partes aéreas sobre *Artemia salina*.

Diseño de Investigación

Para recolectar los datos de una investigación con el fin de dar respuestas a las preguntas de investigación, es importante concretar las estrategias necesarias en correspondencia con el dónde, cuándo y la amplitud de la información que se recolectará (Hurtado, 2010). Esta investigación es experimental, ya que en este tipo de diseño se manipulan, de manera intencional, una o más variables independientes (causas), para analizar las consecuencias de tal manipulación sobre una o más variables dependientes (efectos) (Hernández et al., 2014).

En tal sentido, esta investigación se efectuó con un diseño experimental, debido a que la especie vegetal fue sometida a diversos tratamientos en el laboratorio para determinar su composición química y de esta manera, verificar cómo influyó sobre el

potencial nutricional de la misma. El estudio se realizó en el Laboratorio del Departamento de Ciencia de Los Alimentos, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes, en un lapso de tiempo determinado.

Población y Muestra

Según Arias (2006), la población en una investigación se refiere al conjunto de unidades que pueden ser elementos, personas o cosas pertinentes a la misma, siendo finito o infinito, del cual se desea obtener información y sobre el que se van a generar conclusiones. La población en la investigación estuvo conformada por la especie del género *Gliricidia* perteneciente a la familia Fabaceae.

Hernández et al. (2014), se refieren a la muestra como un subgrupo de la población de interés sobre el cual se recolectarán datos, y que tiene que definirse y delimitarse de antemano con precisión, además de que debe ser representativo de la población. En esta investigación la muestra estuvo representada por hojas verdes, frescas y sin signos de deterioro de *Gliricidia sepium* provenientes del Jardín de Plantas Medicinales "Dr. Luis Enrique Ruiz Terán", de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes, Mérida, estado Mérida (Venezuela).

Sistema de Variables

Las variables de esta investigación serán sistematizadas como dependiente e independiente. Hurtado (2012), explica que la variable dependiente es la que se modifica por acción de la variable independiente, por tanto constituye las consecuencias o efectos que se miden, siendo de esta manera, la variable independiente la causa que genera y explica los cambios en la variable dependiente. En esta investigación las variables independientes estuvieron representadas por el potencial nutricional y la composición química de *Gliricidia sepium* y la variable dependiente por la toxicidad sobre *Artemia salina*. Estas variables permitieron garantizar el alcance de los objetivos planteados en esta investigación.

Instrumento de Recolección de Datos

Pallela y Martins (2012), establecen que después de seleccionar el diseño de investigación y la muestra adecuada, se deben implementar técnicas o instrumentos de recolección de datos, que es cualquier recurso que le permita al investigador acercarse a los fenómenos y extraer de ellos información. La recolección de datos se realizó con cuadernos de trabajo, para llevar los registros de los resultados de cada prueba realizada, posteriormente se transfirieron a una matriz o base de datos que permitieron medir y cuantificar los resultados mediante un paquete estadístico para computadora.

Procedimientos de la Investigación

Recolección del Material Vegetal

Las partes aéreas de *Gliricidia sepium* (Jacq.) kunth ex Walp., se recolectaron del Jardín de Plantas Medicinales ``Dr. Luis Enrique Ruiz Terán``, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes, Municipio Libertador estado Mérida. Se seleccionaron 500 g aproximadamente de hojas verdes, frescas y sin signos de deterioro (Figura 13), posteriormente para su almacenamiento y traslado se resguardaron en una bolsa plástica.

Figura 13

Recolección y pesaje de las hojas de G. sepium



Se tomaron los tallos, hojas y flores para su identificación botánica y elaboración de un váucher. 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, con el número de muestra #01 (Figura 14). 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.

Figura 14

Váucher de la identificación botánica de la muestra



Tratamiento del Material Vegetal

El material vegetal recolectado fue pesado en una balanza mecánica, obteniendo un peso de 370 g de hojas verdes, frescas y sin signos de deterioro, siendo estas las partes botánicas de interés (Figura 13). Considerando la cantidad de humedad como parte del peso total, este disminuyó al eliminar dicho contenido de agua mediante el secado de la muestra en una estufa marca Shel Lab a 60 °C/24 horas, luego, se procedió a pesar el material vegetal seco en la balanza electrónica Denver instrumental XL3100, obteniendo un contenido de muestra ideal de 99,4 g de materia seca, seguidamente este

material fue molido y almacenado en una bolsa con cierre hermético en un lugar fresco y seco a temperatura ambiente (Figura 15). La muestra resultante fue utilizada para realizar los análisis correspondientes, entre ellos, el análisis proximal, tamizaje fitoquímico y la toxicidad sobre *Artemia salina*.

Figura 15

Secado, molienda y almacenamiento del material vegetal



Análisis Proximal de Gliricidia sepium

Este análisis reveló el contenido en porcentaje (%) de humedad, ceniza, proteína cruda, grasa cruda y extracto libre de nitrógeno. En tal sentido, estas determinaciones se realizaron en el Departamento de Ciencias de los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, bajo la supervisión del Dr. Tomás Visbal y la Dra. Marielba Morillo.

Determinación de Humedad. La muestra pulverizada se pesó por triplicado en capsulas de vidrio previamente taradas. Luego, las muestras se llevaron a la estufa marca Felisa precalentada a 100 ± 5 °C/24 horas, posteriormente se dejaron enfriar en un desecador (Figura 16) y, se pesaron nuevamente en una balanza analítica marca Ohaus AR2140, por último, se calcularon las diferencias de pesos y los porcentajes de humedad.

Cálculos.

$$\% H = \frac{PCM - PCF}{PM} \times 100$$

Donde:

% H = Contenido de humedad

PCM = Peso de la capsula de vidrio + muestra húmeda (g)

PCF = Peso de la capsula de vidrio + muestra seca (g)

PM = Peso de la muestra húmeda (g)

Figura 16

Pesado, calentamiento y enfriamiento de las muestras para la determinación de humedad



Determinación de Ceniza. Se realizó a través del método calcinación-incineración. Primero, la muestra pulverizada se pesó por triplicado en una balanza analítica marca Ohaus AR2140 en crisoles de porcelana. Posteriormente, las muestras fueron calcinadas sobre un triángulo de porcelana por calentamiento directo con la llama del mechero bajo campana de extracción, hasta que cesó la formación de humo. Luego, las muestras fueron incineradas en una mufla marca Lindberg/Blue modelo BF51732C-1 a 600 °C/24 horas, hasta que se obtuvieron cenizas blancas (Figura 17). Por último, se dejaron enfriar en un desecador y se pesaron nuevamente los crisoles con el contenido de ceniza.

Cálculos.

$$\% C = \frac{PCV - PCF}{PM} \times 100$$

Donde:

% C = Contenido de ceniza

PCV = Peso del crisol vacío (g)

PCF = Peso del crisol + muestra (g)

PM = Peso de la muestra (g).

Figura 17

Calcinación sobre mechero, incineración y obtención de cenizas blancas



Determinación de Proteína Cruda. Este ensayo se realizó por triplicado de muestras para la determinación del contenido de nitrógeno total a través del método Micro Kjeldahl, donde se cumplieron tres (3) etapas; procesos de digestión, destilación y titulación. Sobre un papel de celulosa se pesó 0,1 g de muestra y se introdujo en un balón aforado de 30 mL, seguidamente para el proceso de digestión se añadieron 2 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado al 98 %, 0,1 g de sulfato de cobre (CuSO_4) y 1 g de sulfato de sodio (Na_2SO_4) como catalizador, también, se agregó 3 perlas de vidrio para evitar una fuerte ebullición. Luego, esta mezcla se colocó en un digestor Micro Kjeldahl alrededor de 2 horas para asegurar una digestión completa, hasta que la muestra se tornó de un color verde claro (Figura 18). Posteriormente, las muestras se dejaron enfriar, se diluyeron con agua destilada y fueron llevadas al equipo de destilación, de modo que, el contenido de nitrógeno total bajo la forma de sulfato de amonio (NH_4) $_2\text{SO}_4$ reaccionó con 8 mL de una solución catalizadora constituida por hidróxido de sodio (NaOH) al 40 % y tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), en consecuencia,

el amoniaco liberado se recolectó en una fiola con 5 mL de solución de ácido bórico (H_3BO_3) al 4 % y tres gotas de reactivo de Tashiro (indicador), originando de este modo borato de amonio, el cual se evidenció por un cambio de color rosa o púrpura a verde (Figura 19). Por último, se tituló la solución resultante con ácido clorhídrico (HCl) al 0,02 N hasta la aparición de un color rosa o púrpura nuevamente (Figura 20).

Cálculos.

$$\% N = \frac{VG_{HCl} \times N(0,02) \times Eq. N(14)}{10 \times PM}$$

$$\% P = \% N \times F(6,25)$$

Donde:

% N = Contenido de nitrógeno

% P = Contenido de proteína cruda

VG_{HCl} = Volumen gastado de ácido clorhídrico (mL)

N = Normalidad del ácido estándar

PM = Peso de la muestra (g)

Figura 18

Proceso de digestión de proteínas en el equipo Micro Kjeldahl



Figura 19

Destilación de las muestras para la determinación de proteínas



Figura 20

Titulación con ácido clorhídrico al 0,02 N



Determinación de Grasa Cruda. Para extraer la grasa se utilizó el método mejorado de Soxhlet. Se pesaron las muestras por triplicado, luego se adicionaron a cartuchos o dedales de Soxhlet (celulosa) previamente tarados y rotulados, cubriéndolos con algodón después de ser añadida cada muestra (Figura 21). Seguidamente, se pesaron tres balones con un perla de vidrio cada uno, a los cuales se

les añadió 50 mL de éter de petróleo, de modo que, en su interior se colocaron los dedales con las muestras y se procedió a incorporar los balones en el equipo de extracción semiautomático marca Velp Scientifica SER 148, conectando los adaptadores metálicos a los dedales por la parte imantada y centradas en el plato correspondiente, cerrando el sistema con la palanca de sellado (Figura 22). Por otro lado, se seleccionó el programa n.º 1 a 110 °C, el cual inició con el tiempo de inmersión por 30 min., luego la etapa de lavado durante 60 min y una etapa de recuperación por 30 min.; y, por último recoger el solvente. Trascurrido el tiempo, se destiló el éter hasta su total evaporación, se abrió el sistema de sellado hermético, luego se llevaron los balones a la estufa a 100 °C de 10 a 15 minutos y se dejaron enfriar en el desecador. Para finalizar, se pesó cada vaso y el peso del extracto de cada muestra se determinó por diferencia de peso.

Cálculos.

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

Donde:

% G = Contenido de lípidos crudos

PBV = Peso del balón vacío (g)

PBG = Peso del balón + extracto graso (g)

PM = Peso de la muestra (g)

Figura 21

Preparación de las muestras para la determinación de grasa cruda



Figura 22

Equipo de extracción semiautomático, utilización del programa n.º 1



Determinación del Extracto Libre de Nitrógeno. Se obtuvo como la resultante de restar a 100, el valor porcentual que se calculó para cada nutriente.

Cálculos.

$$\% \text{ CH} = 100 - (\% \text{ H} + \% \text{ C} + \% \text{ P} + \% \text{ G})$$

Donde:

% CH = Contenido de carbohidratos

% H = Contenido de humedad

% P = Contenido de proteína cruda

% G = Contenido de grasa cruda

% C = Contenido de ceniza

Obtención de los Extractos Vegetales

Los extractos fueron obtenidos por un método de extracción discontinua, denominado maceración en frío. Para tal efecto, se pesaron tres porciones de muestra pulverizada, cada una de 15 g y se agregaron a tres envases de vidrio por separado, previamente rotulados. Posteriormente, se adicionaron 100 mL a cada envase de un solvente en específico, siendo usados para tal fin, el hexano, diclorometano y etanol. Seguidamente, se cubrieron las muestras con papel aluminio y se dejaron bajo campana de extracción durante setenta y dos horas. En último lugar, se filtró la materia húmeda

en un embudo con papel filtro y se recuperaron cada uno de los solventes en un envase de vidrio, se dejaron evaporar bajo campana y se procedió a cerrar herméticamente los extractos concentrados obtenidos (Figura 23). A través, de estos tres extractos se determinó la presencia o ausencia de los metabolitos secundarios.

Figura 23

Procedimiento de extracción discontinua para la obtención de los extractos vegetales



Tamizaje Fitoquímico

Permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta (Castillo y Martínez, 2021). Por ello, para determinar algunos compuestos químicos presentes en los extractos de las partes aéreas de *Gliricidia sepium* (Jacq.) kunth ex Walp., se realizaron una serie de pruebas o ensayos químicos:

Alcaloides.

Ensayo de Mayer. Se pesaron alrededor de 100 mg del extracto etanólico en un tubo de ensayo y se adicionaron 10 mL de HCl al 10 %, la reacción se sometió a baño de maría hasta ebullición por 30 minutos. Seguidamente, se filtró y el residuo se trasvasó a otro tubo de ensayo, posteriormente se le agregó el reactivo de Mayer. La prueba se considera positiva para alcaloides por la aparición de un precipitado en el reactivo de Mayer de color blanco amarillento.

Terpenos y/o Esteroles.

Ensayo de Liebermann-Burchard. Se utilizó un tubo de ensayo para cada uno de los extractos, siendo estos disueltos en 0,5 mL de diclorometano anhidro, además, a cada tubo se le añadió 0,5 mL de anhídrido acético y por las paredes del tubo cuidadosamente se le adicionaron unas gotas de ácido sulfúrico concentrado. La prueba se considera positiva por la aparición de una coloración verde o roja, indicando la presencia de esteroides o terpenos, respectivamente.

Saponinas.

Prueba de la espuma. Se colocó una pequeña cantidad de cada uno de los extractos en tubos de ensayo por separado y se adicionó 1 mL de agua, la mezcla se agitó vigorosamente durante un minuto. La presencia de saponinas se evidencia por la formación de espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de espesor o altura y, que esta persista por más de cinco minutos.

Polifenoles.

Prueba con $FeCl_3$. En un tubo de ensayo, a 1 mL de solución alcohólica de los extractos diclorometano y etanólico, se le agregó una gota de solución acuosa de cloruro férrico al 10 %. La prueba se considera positiva por la formación de un color verde, azul intenso o negro indicando la presencia de fenoles.

Taninos.

Prueba de la gelatina. Se disolvió el extracto etanólico en agua, además se preparó una solución al 10 % de gelatina y se colocó en contacto con el extracto acuoso. Si se observa turbidez o ruptura de la gelatina, quiere decir, que se produce desnaturalización de la proteína, por lo tanto, la prueba se considera positiva.

Flavonoides.

Ensayo de Shinoda. En tubos de ensayo diferentes se añadió 1 mL de los extractos etanólico y diclorometano, además estos se disolvieron en 0,5 mL de etanol. Posteriormente, a cada tubo se añadieron virutas de magnesio (Mg) y enseguida, por las paredes del tubo se adicionaron 2 gotas de ácido clorhídrico (HCl) concentrado. La aparición de una coloración naranja o violeta indica la presencia de flavonoides.

Quinonas.

Ensayo del Hidróxido de Amonio. En un tubo de ensayo se disolvió el extracto diclorometano en 0,5 mL de etanol y, se adicionaron 2 gotas de hidróxido de amonio (NH₄OH) concentrado al 25 %. La prueba se considera positiva si se presenta una coloración roja que aparece en los primeros dos minutos.

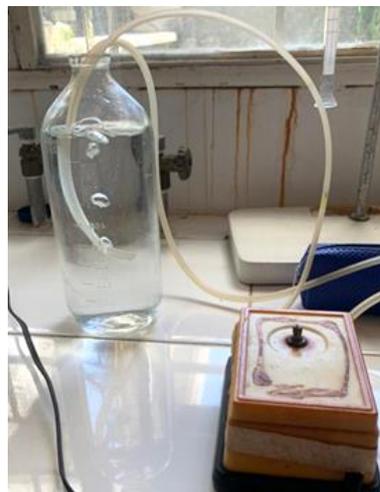
Valoración de toxicidad sobre Artemia salina.

Para el ensayo de toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina* se utilizó el extracto etanólico de las partes aéreas de *Gliricidia sepium* (Jacq.) kunth ex Walp. Para tal efecto, el método estándar empleado se basó en la determinación de la concentración o dosis que cause la muerte al 50 % de la población de larvas de este crustáceo en 24 horas, siendo conocida esta dosis como dosis letal media (DL₅₀).

En primer lugar, se preparó 1 L de solución marina (agua de mar artificial), que proporcionó las condiciones para el cultivo y eclosión de los quistes de *Artemia*. Para tal fin, la composición química de esta solución, estuvo compuesta por las siguientes sales: 27,65 g/L de cloruro de sodio (NaCl), 14,29 g/L de sulfato de magnesio hexahidratado (MgSO₄.6H₂O), 5,18 g/L de cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl₂.6H₂O), 0,697 g/L de cloruro de potasio (KCl), 0,143 g/L de bicarbonato de sodio (NaHCO₃), 0,035 g/L de carbonato de sodio (Na₂CO₃) y 1,54 g/L de cloruro de calcio (CaCl₂). Por último, todas estas sales fueron disueltas en 1000 mL de agua destilada estéril y, tal como se muestra en la Figura 24, la solución resultante se mantuvo en aireación durante setenta y dos horas con la finalidad de oxigenarla.

Figura 24

Preparación del agua de mar artificial



Después de la aireación de la solución marina, esta se dividió en dos Erlenmeyer de 500 mL hasta el aforo. Tal como se muestra en la Figura 25, en una de las fiolas se añadieron 200 mg de quistes de *Artemia* incubando a temperatura de 28 ± 2 °C e iluminación constante durante 24 horas, debido a, que es el tiempo necesario para la eclosión de estos quistes (Figura 26). Por otro lado, la solución contenida en el otro Erlenmeyer se utilizó como diluyente para la preparación de las diluciones del extracto etanólico y el llenado de las placas; ambos recipientes se mantuvieron en aireación constante.

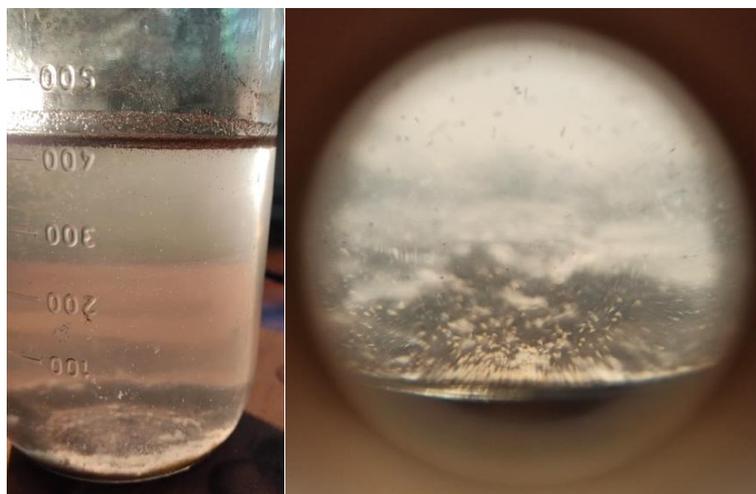
Figura 25

*Preparación de los quistes de *Artemia salina**



Figura 26

Imagen ampliada de la eclosión de los quistes a nauplios de Artemia salina

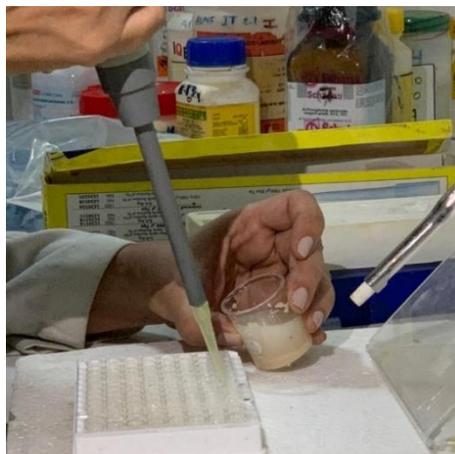


Tal como se muestra en la Figura 27, el bioensayo se realizó en placas de microtitulación, a cada pozo se le adicionó 130 μL de solución marina (aireada), luego, se colocaron 10 μL de la solución con larvas que aproximadamente corresponden a 15 nauplios por pozo, los cuales presentan fototropismo, es por esto, que se recomienda iluminar una zona del envase que las contiene para concentrarlas y facilitar su recolección. Posteriormente, se adicionó a cada pozo 10 μL de levadura comercial [5 mg/mL]. Las placas se incubaron en un área con iluminación permanente por 24 horas, para excitar su actividad metabólica. Transcurrido este tiempo de incubación se colocaron 50 μL del extracto etanólico de *G. sepium*, a distintas concentraciones (5, 25, 250, 750, 1250 y 2500 ppm). El extracto se diluyó con DMSO (Dimetilsulfoxido) y solución marina (1:9); además, al bioensayo se incluyó un grupo control negativo (con todos los elementos del ensayo, excepto la muestra a ensayar) y un grupo control positivo (Dodecil sulfato de sodio [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{OSO}_3\text{Na}$] (DSS)), con seis replicas para cada grupo.

Seguidamente, se registró el número de nauplios vivos (NV) puestos inicialmente en cada pozo y, luego de 24 horas de contacto con los extractos ensayados se realizó el conteo del número de nauplios muertos (NM) (Figura 28), y finalmente determinar de este modo, la dosis letal media.

Figura 27

Preparación de las placas de microtitulación



Además, se calculó el porcentaje de letalidad mediante la ecuación:

$$\% \text{ letalidad} = \frac{\text{NM}}{\text{NV}} \times 100$$

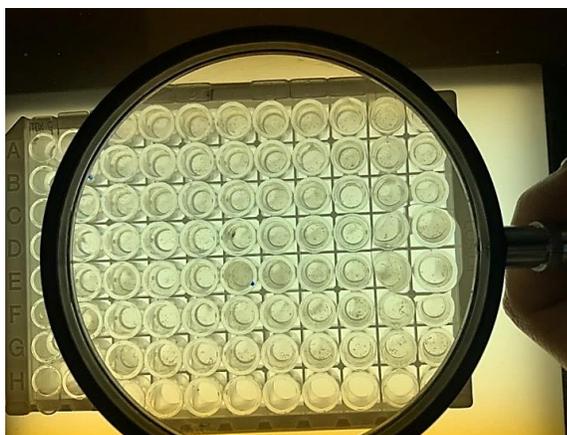
Donde:

NM = Número de nauplios muertos

NV = Número de nauplios vivos

Figura 28

Conteo del número de nauplios muertos



Posteriormente, 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), mostradas en la Tabla 8.

Tabla 8*Clasificación de toxicidad según el CYTED*

Concentración DL ₅₀ (µg/mL)	Categoría
1-10	Extremadamente tóxico
10-100	Altamente tóxico
100-500	Moderadamente tóxico
500-1000	Ligeramente tóxico
1000-1500	Prácticamente no tóxico
>1500	Relativamente inocuo

Estudio Estadístico.

El estudio estadístico se realizó con el programa IBM SPSS Statistic editor de datos, versión 25. A su vez, los datos obtenidos fueron estudiados estadísticamente, por medio, del análisis de regresión PROBIT; para la determinación del % de letalidad y el cálculo de la dosis letal media (DL₅₀).

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO IV

Resultados y Discusión

Análisis proximal de las partes aéreas de *Gliricidia sepium*

El contenido en porcentaje (%) de humedad, ceniza, proteína, lípidos y extracto libre de nitrógeno (carbohidratos) de las partes aéreas de la especie forrajera *G. sepium*, se muestra en la Tabla 9, en base a la masa seca (harina).

Tabla 9

Composición nutricional de las partes aéreas de G. sepium

Nutrientes	Contenido (%)
Humedad	0,39
Ceniza	8,25
Proteína	26,45
Lípidos	0,35
Carbohidratos	64,6

En primer lugar, en términos generales el contenido de materia orgánica (MO) obtenido en este análisis estuvo representado por un 91,75 %, valor que resalta en comparación al obtenido por Montecé (2019), quien reveló el contenido de MO evaluado de acuerdo al periodo de corte desde los 30 a los 105 días, con valores que ascienden del 87,03 % a 89,05 %, respectivamente. Sin embargo, es importante mencionar que el valor reportado de MO en esta investigación, es una estimación general que involucra el contenido porcentual de humedad, proteína, lípidos y carbohidratos, de modo que, si comparamos el estadio de crecimiento de la planta con los datos obtenidos en los estudios previos, estos indican que el contenido de MO está relacionada con el grado de madurez o edad de esta planta forrajera así como, de sus condiciones ambientales. Por otro lado, un trabajo previo realizado por Panimboza (2022), reportó un contenido de grasa de 3,87 % y un contenido de extracto libre de nitrógeno de 46,24 %, en contraste con los resultados del análisis proximal realizado

en esta investigación se muestran diferencias significativas.

Es por esto que, es importante mencionar que el porcentaje de proteína cruda (PC) reportado a través del análisis proximal realizado supera al 23,16 % obtenido por Panimboza (2022). Además, el 26,45 % de PC obtenido es considerablemente mayor al de Montecé (2019), quien en su investigación determinó que el matarratón registró el mayor contenido de PC a los 30 días de corte con 23,07 %. Cabe mencionar que este investigador, consideró el periodo de corte o estado de madurez de la biomasa y, reportó que en la composición química de *G. sepium* a los 45, 60, 75, 90 y 105 días de rebrote los niveles de PC oscilaron entre 21,55 % y 18,32 % de modo que, los valores de la composición química disminuyeron al aumentar los días de rebrote.

Además, el contenido de humedad obtenido fue inferior a los reportados por Montecé (2019), quien obtuvo diferentes valores de acuerdo al estadio de crecimiento y consideró que a medida que el rebrote madura existe un incremento en el contenido de materia seca, en otras palabras, una disminución del contenido de humedad desde los 30 a los 105 días de corte con valores que descienden del 17,12 % a 9,31 % de humedad, respectivamente. Sin embargo, el 0,39 % de humedad obtenido en esta investigación no puede ser comparado de forma directa con los datos reportados en estudios previos debido a, la marcada diferencia entre los resultados.

Por último, el contenido de ceniza obtenido mediante este análisis estuvo representado por el 8,25 %, valor porcentual inferior al 9,93 % obtenido por Panimboza (2022) y 12,97 % determinado por Montecé (2019) a los 30 días de corte, periodo en el cual obtuvo el valor más alto. El autor antes mencionado, obtuvo diferentes valores de acuerdo al estado fenológico de la planta desde los 30 a los 105 días de corte, sin embargo, los niveles más bajos de materia inorgánica reportados se alcanzaron a los 105 días de rebrote, lo cual, podría explicar que el contenido de minerales del follaje disminuye a medida que esta planta forrajera envejece.

Tamizaje fitoquímico de los extractos hexanoico, diclorometano y etanólico de las partes aéreas de *Gliricidia sepium*

Las diversas pruebas realizadas en el laboratorio, permitieron determinar la

composición química cualitativa en relación a los metabolitos secundarios presentes en esta planta forrajera. Se utilizaron una variedad reactivos que permitieron observar reacciones de coloración, precipitación y producción de espuma. En consecuencia, en la Tabla 11, se presentan los resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos hexanoico, diclorometano y etanólico de las partes aéreas de *G. sepium*.

Tabla 10

Tamizaje fitoquímico de los extractos de las hojas de G. sepium

Metabolitos secundarios	Ensayo	Extracto		
		Etanólico	DCM	Hexanoico
Alcaloides	Mayer	+	Nd	Nd
Esteroles	Liebermann-	+	+	+
Terpenos	Burchard	++	+	-
Polifenoles	FeCl ₃	+	+	Nd
Flavonoides	Shinoda	+	+	Nd
Saponinas	Espuma	-	-	-
Taninos	Gelatina	+	Nd	Nd
Quinonas	NH ₄ OH	Nd	-	Nd

DCM: Diclorometano; (+++): Muy abundante, (++): abundante, (+): presente en poca concentración, (-) ausente; Nd = No determinado.

Dicho de otra manera, el análisis fitoquímico de los extractos etanólico, diclorometano y hexanoico, demostró la presencia de alcaloides, esteroles, terpenos, polifenoles, flavonoides y taninos; sin embargo, reportó la ausencia de saponinas y quinonas. Por otro lado, no se realizó de determinación de cumarinas. Los resultados obtenidos en el estudio fitoquímico son similares a los reportados por Scull y Savon (2011), pero estos difieren al negar la presencia de flavonoides y cumarinas.

Habría que decir también, que en un estudio recientemente realizado por Alade et al. (2021), se reportó no sólo la presencia de terpenos sino también, se afirmó la presencia de cumarinas en el tamizaje realizado al aceite de la hoja de *G. sepium*. Estos autores antes mencionados, explican que se pueden generar algunas diferencias en la composición química en relación a los metabolitos secundarios ya que, depende del órgano vegetal que se utilice para el análisis fitoquímico.

Es necesario recalcar que, esta diferencia en cuanto a los metabolitos secundarios

encontrados, puede deberse al hecho de que, en los diversos estudios, el material vegetal fue recolectado en distintas ubicaciones geográficas y posiblemente en diferentes épocas del año, con distintas condiciones climáticas, factores que pueden influir en la producción o concentración de los mismos. De igual manera, están involucrados otros factores como el genotipo de la planta, la etapa y edad del desarrollo así como, estímulos mecánicos o ataques externos.

Valoración de la toxicidad sobre *Artemia salina*.

Análisis PROBIT

En la Tabla 12, se presentan los resultados del análisis PROBIT de la cuantificación de la DL₅₀ mediante el bioensayo de letalidad en *Artemia salina*, aplicado al extracto etanólico de las partes aéreas de *G. sepium* y los controles.

Tabla 11

Cuantificación de la DL₅₀ del extracto etanólico de las partes aéreas de G. sepium, 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	3105,329	-	-	Relativamente inocuo
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.

El grado de toxicidad del extracto se definió en función del rango que se encontró el valor de la DL₅₀ de acuerdo con las categorías siguientes del CYTED: extremadamente tóxico (1-10 µg/mL), altamente tóxico (10-100 µg/mL), moderadamente tóxico (100-500 µg/mL), ligeramente tóxico (500-1000 µg/mL), prácticamente no tóxico (1000-1500 µg/mL) y relativamente inocuo (>1500 µg/mL).

Tal como se muestra en la Tabla 12, el valor de DL₅₀ fue de 3105,329 µg/mL con un intervalo de confianza del 95%, y con un p-valor menor a 0,05, indicando una relación estadísticamente significativa entre las variables. Por lo tanto, el extracto

etanólico de las partes aéreas de la especie *G. sepium* se considera relativamente inocuo, por encontrarse en una concentración $>1500 \mu\text{g/mL}$. De hecho, este resultado quizás pueda atribuirse a la ausencia de saponinas reportadas en el tamizaje fitoquímico.

En contraste, en los últimos cinco años Alade et al. (2021), realizaron un estudio relacionado con el análisis de los aceites obtenidos a partir de las hojas y el tallo de *G. sepium* con el propósito de determinar su composición química y actividad biológica, en consecuencia, determinaron que ambos aceites fueron tóxicos para las larvas de *Artemia salina*, donde el aceite de tallo reportó mayor toxicidad ($DL_{50} = 38.7081 \mu\text{g/mL}$) que el aceite de obtenido a partir de las hojas ($DL_{50} = 79.6717 \mu\text{g/mL}$). En cuanto a, la marcada diferencia entre las DL_{50} de los dos aceites esenciales se debió a que fueron extraídos de diferentes órganos vegetales.

De acuerdo con Ochoa y Sarmiento (2018), la presencia del β -elemeno, el β cariofileno y el α -humuleno presentes en el tallo han mostrado una alta toxicidad contra células tumorales. Estos compuestos no son los componentes principales, pero su presencia podría haberse sumado al efecto tóxico del aceite de tallo además, al efecto sinérgico de otros componentes del aceite. Por lo que, la diferencia de toxicidad en el bioensayo de letalidad de los aceites esenciales estudiados por Alade et al. (2021), la presente investigación y los reportados por diversas literaturas se encuentra estrechamente relacionada con la variación en su ubicación geográfica, procedimiento de extracción y composición química.

CAPÍTULO V

Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

En base a los resultados se plantean las siguientes conclusiones:

- Al estudiar la composición nutricional de las partes aéreas de *G. sepium*, a través del análisis proximal, se reportó en primer lugar un contenido de 26,45% de proteína; 64,6% de carbohidratos; 0,39% de humedad; 8,25% de ceniza y por último 0,35% de lípidos.
- Mediante el tamizaje fitoquímico se determinó la composición química en relación, a los metabolitos secundarios presentes en las partes aéreas de *G. sepium*. Se reportó la presencia de: esteroides en los extractos etanólico, diclorometano y hexanoico; terpenos, polifenoles y flavonoides en los extractos etanólico y diclorometano; además, alcaloides y taninos en el extracto etanólico.
- La valoración de toxicidad del extracto etanólico de las partes aéreas de *G. sepium*, se clasificó según los criterios del CYTED como relativamente inocuo frente a *Artemia salina*.
- Estos datos sugieren, que *G. sepium* es una planta forrajera que se puede utilizar como complemento parcial o total en la alimentación del ganado ya sea de carne, leche o doble propósito, esto debido a su excelente composición química y alto valor proteico. Además, puede encontrar un uso potencial en el control de plagas y enfermedades en diversos cultivos, gracias a la presencia de ciertos metabolitos secundarios.

Recomendaciones

- Para el muestreo, se recomienda realizar la recolección de las partes aéreas antes de la época de floración de *G. sepium* ya que, estos árboles botan sus hojas para realizar un rebrote.
- Determinar la composición química bromatológica del *G. sepium* en diferentes periodos de corte.
- Realizar un estudio de la actividad biológica de los extractos de las partes aéreas de *G. sepium*.
- Evaluar el uso de *G. sepium* en el control de garrapatas.

www.bdigital.ula.ve

Bibliohemerografía

- Alade, A., Aboaba, S., Satyal, P. y Setzer, W. (2021). Evaluation of chemical profiles and biological properties of *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp. volatile oils from Nigeria. *Natural Volatiles & Essential Oils*, 8 (3), 34-43. DOI: 10.37929/nveo.862407
- Albornoz, A. (1980). *Productos Naturales. Estudios de las sustancias y drogas de las plantas*. Publicaciones de la Universidad Central de Venezuela.
- Albornoz, A. (2001). *Medicina Tradicional Herbaria*. Caracas, Venezuela: Instituto Farmacoterapico Latino S.A. Caracas Venezuela: 1-564.
- Angiosperm Phylogeny Group IV. (APG IV.) (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181 (1), 1-20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
- Arias, F. (2006). *Mitos y errores en la elaboración de Tesis y proyectos de investigación*. Editorial Episteme. <https://www.researchgate.net/publication/44562024>
- Ávalos, A. y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. *Serie Fisiología Vegetal*, 2 (3), 119-145.
- Ayala, A., Capetillo, C., Cettina, R., Campos, C. y Sandoval, C. (2006). *Composición Química Nutricional de Arboles Forrajeros*. Universidad Autónoma de Yucatán.
- Boscso, N. y Butnariu, M. (2022). The biological role of primary and secondary plants metabolites. *Food Science and Nutrition*, 5 (3), 1-7. DOI:[10.31579/2637-8914/094](https://doi.org/10.31579/2637-8914/094)
- Cáceres, A., López, B., Juárez, X., Del Águila, J., y García, S. (1993). Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. Evaluation of antifungal activity of seven American plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 40 (3), 207-213.
- Caravaca, F., Castel, J., Guzmán, J., Delgado, M., Mena, Y., Alcalde, M. y González, P. (2003). *Bases de la producción animal*. Universidad de Sevilla.

- Cardozo, J. (2013). *El Matarraton (Gliricidia sepium) en la Alimentación de Rumiantes* [Monografía, Universidad Nacional Abierta y A Distancia]. <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/1076/93117211.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Carroz, D. y Gualtieri, M. (2015). *Manual de prácticas de laboratorio de química orgánica básica*. Universidad de Los Andes.
- Carvajal, L., Hata, Y., Sierra N. y Rueda, D. (2009). Análisis Fitoquímico Preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff). *Colombia Forestal*, 12(1), 161-170.
- Castellano, G. (2021). *Estudio fitoquímico y actividad biológica de los extractos de las partes aéreas de Cnidoscolus aconitifolius (Mill.) I.M. Johnst* [Tesis, Universidad de Los Andes].
- Castello, F. (1993). *Acuicultura marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción*. Edicions Universitat Barcelona. <https://books.google.co.ve/books?id=hjwMNMgh1cQC&lpg=PP1&hl=es&pg=PP1#v=onepage&q&f=false>
- Castillo, E. y Martínez, I. (2021). *Manual de Fitoterapia*. ELSEVIER. <https://books.google.co.ve/books?id=gwgxEAAAQBAJ&lpg=PP1&hl=es&pg=PR4#v=onepage&q&f=false>
- Castillo, J., Sanabria, M., Rodríguez, D., y Crescente, O. (2005). Metabolitos secundarios en plantas silvestres del Parque Nacional Terepaima, estado Lara. *SABER*, 17, 280-281.
- Cobián, G. (2007). *Evaluación de extractos de las hojas de Gliricidia sepium (jacq.) en la inhibición de Staphylococcus aureus y Candida albicans*. [Tesis de Maestría en Tecnología Avanzada, Instituto Politécnico Nacional]. <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/169>
- Directrices del Codex. (1997). Directrices para el uso de declaraciones nutricionales. Comisión del Codex Alimentarius en su 22º período de sesiones [Mensaje en un blog]. Recuperado de <http://www.fao.org/3/W8612S/W8612s06.htm#Top>

- Editors of Editors of Larousse (2011). *Potencial Nutricional*. Larousse, Ediciones, S. A. de C. V.
- Edwards, A., Mlambo, V., Lallo, C., y García, G. (2012). Yield, chemical composition and in vitro ruminal fermentation of the leaves of *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium* and *Trichanthera gigantea* as influenced by harvesting frequency. *J. Anim. Sci. Adv.* 2(3.2), 321-328.
- Galindo, W., Rosales, M., Murgueitio, E., y Larrahondo, J. (1989). Sustancias antinutricionales en las hojas de Guamo, Nacedero y Matarratón. *Livestock research for rural development*, 1(1), 36-47.
- González A., Morales K., Vásquez W. y Espinosa C. (2014). Digestibilidad aparente de *Tithonia diversifolia*, *Gliricidia sepium* y *Cratylia argentea* en juveniles de *Piaractus brachypomus*. *Orinoquia*, 18(2), 214-219. <https://doi.org/10.22579/20112629.379>
- González, M. y Luna, H. (2020). *Evaluación del uso de madero negro (Gliricidia sepium) en el control de garrapata del género Rhipicephalus (Boophilus) microplus en el Centro de Prácticas San Isidro Labrador*. [Trabajo de tesis, Universidad Nacional Agraria]. <https://repositorio.una.edu.ni/id/eprint/4219>
- Greenfield, H. y Southgate, D. (2006). *Datos de Composición de Alimentos: Obtención, Gestión y Utilización* (2ª ed). FAO.
- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2014). *Metodología de la investigación*. McGraw Hill Education. <https://www.uca.ac.cr/wp-content/uploads/2017/10/Investigacion.pdf>
- Hurtado, D., Nocua, S., Narvaez, W. y Vargas, J. (2012). Valor nutricional de la morera (*Morus sp.*), matarratón (*Gliricidia sepium*), pasto india (*Panicum máximum*) y arboloco (*Montanoa quadrangularis*) en la alimentación de cuyes (*Cavia porcellus*). *Vet.zootec.* 6 (1), 56-65.
- Hurtado, J. (2010). *Metodología de la Investigación, Guía para la comprensión holística de la ciencia*. Fundación Sypal. <https://dariososafoula.files.wordpress.com/2017/01/hurtado-de-barrera->

metodologicc81a-de-la-investigaciocc81n-guicc81a-para-la-
comprensioocc81n-holicc81stica-de-la-ciencia.pdf

- Hurtado, J. (2012). *El proyecto de investigación*. Ediciones Quirón.
<https://www.calameo.com/books/006205653257b9f45c09d>
- Jiménez A., Narváez W. y Hahn Von-Hessberg, C. (2013). Características forrajeras de la especie *Gliricidia sepium* (jacq.) stend, fabaceae. *Boletín Científico Centro de Museos de Historia Natural*, 17 (1), 33-45.
- Jiménez, L., Benítez, D. y Pérez, A. (2022). Identificación de especies arbóreas forrajeras utilizadas en tres fincas de la provincia de Granma, Cuba. *Pastos y Forrajes*, 45 (2), 1-6.
- Jurd, L. (1976). A phenolic isoflav-3-ene from *Gliricidia sepium*. *Tetrahedron Letters*, 17 (21), 1741- 1744.
- Lemos, J. (2014). *El Matarratón (Gliricidia sepium) como alternativa para la producción de leche en ganado bovino* [Monografía, Universidad Nacional Abierta y A Distancia].
<https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/2779/11795460.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Lizanda, M. (2019). *Artemia como vehículo de sustancias bioactivas/antibióticos en acuicultura: encapsulación mediante nanopartículas de zeína*. [Trabajo de Fin de Grado, Universidad Católica de Valencia].
<http://hdl.handle.net/20.500.12466/75>
- Llamas, F. y Acedo, F. (2016). Las leguminosas (Leguminosae o Fabaceae): una síntesis de las clasificaciones, taxonomía y filogenia de la familia a lo largo del tiempo. *Ambiociencias*, 14: 1-18.
- Madreado especie de árbol de uso múltiple en América Central* (1991). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE.
<https://books.google.co.ve/books?id=FnzTT1jQYqcC&lpg=PP1&hl=es&pg=PP1#v=onepage&q&f=false>
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Universidad Central de Venezuela.

- Martines, E. y Lira, L. (2010). *Análisis y aplicación de las expresiones del contenido de humedad en sólidos*. Simposio de Metrología
- Marzocca, A. (1985). *Taxonomía Vegetal*. Costa Rica: IICA.
- Mejía, J. (2019). Caracterización del madreaje utilizado en la carbono-neutralidad. *Revista Iberoamericana de Bioeconomía y Cambio Climático*, 5 (9), 1121–1128. <https://doi.org/10.5377/ribcc.v5i9.7948>
- Montecé, J. (2019). *Composición química, degradabilidad y cinética ruminal in situ del matarratón (Gliricidia sepium) en diferentes periodos de corte* [Proyecto de Investigación, Universidad Técnica Estatal de Quevedo]. <https://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/4558>
- Mora, I. (2007). *Nutrición animal*. Editorial UNED.
- Muñoz, M. (9 de marzo de 2021). *Cómo cultivar y eclosionar Artemia salina*. Farmamascotas. Recuperado el 17 de marzo de 2023 de <https://www.fanmascotas.com/como-cultivar-y-eclosionar-artemia-salina-para-alimentar-alevines/>
- 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]. <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/996>
- Ortiz, F. (2010). *Etiología del Tizón Tardío del Céleri (Apium graveolens L. var dulce (Miller) Pers.) y Evaluación de su Control con Extractos Vegetales Bajo Condiciones Controladas* [Tesis, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado]
- Pallela, S. y Martins, F. (2012). *Metodología de la investigación cuantitativa*. Fondo Editorial de la Universidad Pedagógica Experimental Libertador. <http://gc.scalahed.com/recursos/files/r161r/w23578w/w23578w.pdf>
- Palma, J. y González, C. (2018). *Recursos arbóreos y arbustivos tropicales para una ganadería bovina sustentable*. Universidad de Colima. http://ww.ucol.mx/content/publicacionesenlinea/adjuntos/Recursos-arboreos-y-arbustivos-tropicales_462.pdf

- Panimboza, M. (2022). *Evaluación de dietas nutricionales para la ceba de ganado bovino con la utilización de especies forrajeras, Manglaralto, provincia de Santa Elena*. [Trabajo de integración curricular, Universidad Estatal Península de Santa Elena]. <https://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/7561>
- Prashant, T., Bimlesh, K., Mandeep, K., Gurpreet, K. y Harleen, K. (2011). Phytochemical Screening and Extraction: a Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1 (1), 98-106.
- Ringuelet, J. y Viña, S. (2013). Productos naturales vegetales. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://doi.org/10.35537/10915/27885>
- Riveros A.S., Pocasangre L.E. y Rosales F.E. (2002). *Inducción de resistencia y uso de tecnologías limpias para el manejo de plagas en plantas*. [Memorias del taller internacional, CATIE]. <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/2388>
- Scull, I. y Savón, L. (2011). Caracterización fitoquímica de forrajes de plantas con potencialidades de uso en la alimentación animal. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias*, 32 (1), 15-17.
- Tirado, D., Montero, P. y Acevedo, D. (2015). Estudio Comparativo de Métodos Empleados para la Determinación de Humedad de Varias Matrices Alimentarias. *Inf. Tecnol*, 26 (2). <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642015000200002>
- Urdaneta, L., Sanabria, M., Rodríguez, D., Ettiene, G. y Pérez, M. (2014). Flavonoides en hojas de *Gliricidia sepium* y su efecto in vitro sobre *Colletotrichum acutatum*. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 48 (2), 115-130.
- Utria, O., Meza, P. y Bossa, L. (2023). Evaluación de pulpa de totumo (*Crescentia cujete* L), matarratón (*Gliricidia sepium*) y sal (*Cloruro de sodio*) en la formulación de un ensilaje para el incremento del contenido proteico como alternativa en alimentación bovina. *Ing-NOVA*, 2 (1), 34-42. <https://doi.org/10.32997/rin-2023-4261>
- Villegas, L., Flores, J. y Castillo, O. (s.f.) *Identificación de cumarinas en hojas y raíz de Gliricidia sepium con potencial para repeler pulgas en perros y matar*

roedores [Tesis, Universidad de Iberoamérica (UNIBE)].
<https://docplayer.es/80297894-Identificacion-de-cumarinas-en-hojas-y-raiz-de-gliciridia-sepium-con-potencial-para-repeler-pulgas-en-perros-y-matar-roedores.html>

Zumbado, H. (2002). Análisis químico de los alimentos métodos clásicos. Instituto de Farmacia y Alimentos Universidad de Habana.
https://www.google.co.ve/books/edition/An%C3%A1lisis_qu%C3%ADmico_de_los_alimentos/GI_zDwAAQBAJ?hl=es-419&gbpv=0

www.bdigital.ula.ve