



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DEL TIPO DE DISOLVENTE SOBRE LA
EXTRACCIÓN DE SAPONINAS Y FLAVONOIDES DE
Leucaena leucocephala, *Gliricidia sepium*, *Guazuma
ulmifolia lam* Y *Moringa oleifera***

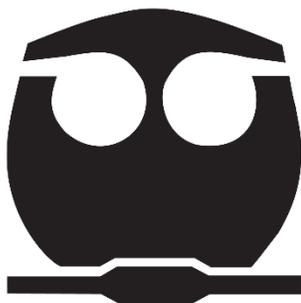
TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

KAREN DENNIS LÓPEZ VILLEGAS

CDMX, 2022





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: ORTIZ PALMA PEREZ JUAN DIEGO

VOCAL: CALDERON VILLAGOMEZ HILDA ELIZABETH

SECRETARIO: MARQUEZ MOTA CLAUDIA CECILIA

SUPLENTE 1: FUENTES RAMIREZ OCTAVIO

SUPLENTE 2: ZARATE MARTINEZ ANA LILIA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Bromatología, Departamento de Nutrición animal y Bioquímica, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARQUEZ MOTA CLAUDIA CECILIA

SUPERVISOR TÉCNICO:

M.V.Z M EN C AARÓN ALEJANDRO MOLHO ORTIZ

SUSTENTANTE (S):

KAREN DENNIS LÓPEZ VILLEGAS

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por la Universidad Nacional Autónoma de México mediante el proyecto PAPIIT-IA210520. “Efecto del grano de sorgo pacon alto contenido de taninos sobre las emisiones de metano, fermentación ruminal y población microbiana en rumiantes”. Responsable: Dr. Atmir Romero Pérez.

A la Dra. Claudia Cecilia Márquez Mota y al M. V. Z. M. en C. Aarón Alejandro Molho Ortiz, por apoyar cada línea de esta investigación, por sus consejos, apoyo, tiempo y paciencia, los llevo en el corazón.

A lo largo de mi carrera se presentaron muchas personas y situaciones que me han hecho crecer y ser quien soy ahora, la lista es larga, y cargaría en mis hombros el pesar de no darles el reconocimiento debido a cada una de ellas; Y quiero comenzar diciendo que agradezco con el alma a quienes me han regalado un poco de su energía, y créanme que también les he obsequiado un poco de la mía, no quiero dejar de mencionar lo infinitamente agradecida que estoy con la vida, por poder contar con mis padres, que incansablemente han estado para apoyarme, soportarme y cuidarme, pero sobre todo amarme, por demostrarme que realmente la fuerza más poderosa es el amor, que con amor se mueve el alma, y que realmente no existen cosas imposibles. Mamá, Papá, les agradezco la vida, y las herramientas para forjar mi futuro. Agradecer a mi hermana que sin duda ha sido una pieza fundamental para completar mis metas y no morir en el intento, la comprensión y compañía en todos aquellos momentos en los que creí no poder más. Gracias por sacarme siempre una sonrisa.

Y agradezco a la existencia misma por poder compartir mi vida con un caballero tan maravilloso, siendo más que dos, cruzando el universo. Siempre tuya.

A mis amigos Alan, Eric, Jessica, Fidel, Josselin, Anahí, Citlali, Mónica, Marco Antonio, Damián y Daniel, que hicieron este trayecto mucho más ameno y divertido.

También quiero agradecerte a ti querido lector por prestar un poco de atención a los temas aquí expuestos, espero estas líneas expandan tus inquietudes y sed de conocimiento.

Contenido

1. RESUMEN.....	7
2. INTRODUCCIÓN.....	8
3. ANTECEDENTES.....	10
3.1. <i>Leucaena leucocephala</i>	11
3.2. <i>Gliricidia sepium</i>	13
3.3. <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.....	15
3.4. <i>Moringa oleifera</i>	17
3.5. Metabolitos secundarios de plantas	18
3.5.1. Saponinas.....	21
3.5.2. Flavonoides	23
4. JUSTIFICACIÓN.....	25
5. HIPÓTESIS.....	26
6. OBJETIVO.....	26
6.1. OBJETIVO GENERAL	26
6.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
7. METODOLOGÍA.....	27
7.1. Análisis químico proximal.....	27
7.1.1. Cenizas	28
7.1.2. Humedad	29
7.1.3. Extracción de grasa cruda	30
7.1.4. Proteína Kjeldahl	31
7.2. Extracción de metabolitos secundarios.....	35
7.2.1. Preparación de la muestra.....	35
7.2.2. Obtención de extractos.....	35
7.3. Determinación de metabolitos secundarios.....	36
7.3.1. Cuantificación de saponinas.....	36
7.3.2. Cuantificación de flavonoides.....	37
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
8.1. Análisis químico proximal.....	41
8.2. Cuantificación de saponinas y flavonoides.....	43
8.2.1. Saponinas y flavonoides en <i>Leucaena leucocephala</i>	44
8.2.2. Saponinas y flavonoides en <i>Gliricidia sepium</i>	46
8.2.3. Saponinas y flavonoides en <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam	48
8.2.4. Saponinas y flavonoides en <i>Moringa oleifera</i>	51
9. CONCLUSIÓN.....	54
10. PERSPECTIVA.....	55
11. BIBLIOGRAFÍA.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Leucaena leucocephala</i>	11
Figura 2. <i>Gliricidia sepium</i>	14
Figura 3. <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.....	16
Figura 4. <i>Moringa oleifera</i>	17
Figura 5. Procedimiento aplicado a la curva, muestras y blanco para cuantificación de saponinas por el método de vainillina-ácido sulfúrico.	37
Figura 6. Procedimiento aplicado a la curva, muestras y blanco para cuantificación de flavonoides utilizado como referencia quercetina.....	39
Figura 7. (A) Comparación de la extracción de saponinas y (B) flavonoides por distintos disolventes a distintas concentraciones en la hoja <i>L. leucocephala</i>	44
Figura 8. (A) Comparación de la extracción de saponinas y (B) flavonoides por distintos disolventes a distintas concentraciones en la hoja <i>Gliricidia sepium</i>	47
Figura 9. (A) Comparación de la extracción de saponinas y (B) flavonoides por distintos disolventes a distintas concentraciones en la hoja <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.	49
Figura 10. (A) Comparación de la extracción de saponinas y (B) flavonoides por distintos disolventes a distintas concentraciones en la hoja <i>Moringa oleifera</i>	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis químico proximal de hojas de <i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Gliricidia sepium</i> , <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam y <i>Moringa oleifera</i>	41
---	----

**EFFECTO DEL TIPO DE DISOLVENTE SOBRE LA EXTRACCIÓN DE
SAPONINAS Y FLAVONOIDES DE *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium*,
Guazuma ulmifolia lam Y *Moringa oleifera***

1. RESUMEN

En años recientes, el uso de plantas forrajeras para la alimentación ruminal ha ido en aumento por las condiciones nutricionales que se le atribuyen, como la concentración perceptible de metabolitos secundarios (MS) en ellas. El estudio sobre la presencia de los MS en plantas forrajeras es indispensable ya que su inclusión en la alimentación de rumiantes se ha asociado con efectos benéficos como: control parasitario, mejora en la fermentación ruminal y mitigación en las emisiones de metano. En el presente estudio se analizó el efecto de 3 disolventes a 3 distintas concentraciones (etanol, metanol, acetona, a concentraciones de 100, 75 y 50%) sobre la extracción de flavonoides y saponinas de cuatro especies forrajeras: *Leucaena leucocephala*, *Moringa oleifera*, *Gliricidia sepium* y *Guazuma ulmifolia Lam*. Los valores más altos de saponinas se obtuvieron con: metanol 100% (6.86 ± 0.002 mg/ g MS) en hojas de *Leucaena leucocephala*, acetona 75% (7.48 ± 0.003 mg/g BS) en *Gliricidia sepium*, acetona 50% (8.66 ± 0.004 mg/g BS) para *Guazuma ulmifolia Lam*, acetona 100% (6.895 ± 0.0149 mg/g BS) en *Moringa oleifera*; Los valores obtenidos para flavonoides se obtuvieron con: metanol 100% (0.84 ± 0.002 mg/g BS) en hojas de *Leucaena leucocephala*, acetona 75% (0.39 ± 0.001 mg/g BS) en *Gliricidia sepium*, acetona 75% (1.243 ± 0.001 mg/g BS) para *Guazuma ulmifolia Lam*, acetona 100% (1.124 ± 0.0015 mg/g BS) en *Moringa oleifera*. Los resultados confirman que existe una dependencia entre la naturaleza del disolvente y la especie de planta.

2. INTRODUCCIÓN

El uso de arbóreas forrajeras y leguminosas como *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium*, *Guazuma ulmifolia* Lam y *Moringa oleifera* es una estrategia empleada durante el acondicionamiento nutricional de rumiantes.

Las leguminosas y arbóreas forrajeras, al igual que miles de especies de plantas y hongos, son capaces de producir metabolitos secundarios que pueden actuar como factores de defensa, protectores proteicos, etc. Dentro de los metabolitos secundarios se encuentran los flavonoides y saponinas, algunas veces los metabolitos secundarios también llamados FAN (factores anti nutricionales), ya que se han detectado algunos efectos negativos sobre el proceso fermentativo a nivel ruminal o en general sobre el proceso digestivo en el tracto total. Pero los efectos dependen, en términos generales, del nivel de consumo. La importancia principal de conocer los niveles presentes de los metabolitos secundarios en las especies a analizar radica en la implementación de estas especies en la dieta ruminal, la dosificación adecuada de flavonoides y saponinas permite tener un control directo sobre los efectos de su consumo y poder orientarlos a acciones benéficas en el tracto digestivo y fermentativo en rumiantes. Al estandarizar los procesos de extracción y cuantificación de dichos metabolitos permitirá generar un perfil nutricional de cada planta para poder ser empleada eficazmente en la producción ruminal (Böttger & Melzig, 2011).

Los metabolitos secundarios MS son compuestos producidos como resultado del metabolismo primario de las plantas, es decir son productos de la síntesis,

degradación y transformación de los compuestos endógenos mediante proteínas especializadas producidas como resultado de los procesos de diferenciación y se clasifican según su significación biológica y función de la célula productora.

En los procesos de producción animal, las plantas que tienen metabolitos secundarios como saponinas y taninos condensados se han asociado con efectos favorables en la fermentación ruminal favoreciendo la producción animal, mitigación de metano y estudios recientes han demostrado que la inclusión de metabolitos secundarios en la alimentación de rumiantes favorece la calidad, contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidantes de leche y queso (García, 2004). Es importante resaltar que los efectos benéficos antes mencionados dependen de la concentración y del tiempo de ingestión de los metabolitos secundarios (Semmar *et al.*, 2011).

Diversos estudios han demostrado las cualidades antioxidantes, antifúngicas, antiparasitarias, anti-protozoaria, etc., de metabolitos secundarios como las saponinas y los flavonoides. La determinación de la concentración de estos metabolitos en las fuentes de alimentos de rumiantes es de interés, ya que permitirá diseñar una dieta en la que se vean favorecidos los procesos digestivos en el animal y a su vez obtener un beneficio directo en los subproductos para consumo humano derivado de estos animales.

3. ANTECEDENTES

En el trópico seco de México existe una gran diversidad de leguminosas forrajeras de tipo herbáceo, arbustivo y arbóreo, que son fuente importante de materia seca en la alimentación de rumiantes. Durante la época de lluvias el crecimiento de leguminosas herbáceas aumenta, y los rumiantes pasan la mayor parte de su tiempo consumiendo estas especies en comparación a plantas arbustivas o arbóreas.

Las vainas y las hojas de leguminosas arbóreas y arbustivas representan una estrategia en la alimentación de rumiantes, por los costos actuales que representa la suplementación con cereales y fuentes proteicas en el mercado nacional e internacional. Las hojas y vainas de leguminosas arbóreas se usan como una fuente de forraje. Las vainas contienen hasta 30 % de proteína cruda, rica fuente de vitaminas y fibra detergente neutra. Estos representan una fuente importante de nutrientes durante el periodo de seca en las regiones tropicales de México y otros países (García, 2004).

En función de estas cualidades, esta investigación se centra en consolidar las condiciones adecuadas sobre el disolvente y su concentración para la extracción de metabolitos secundarios, como lo son los flavonoides y saponinas, de las siguientes especies leguminosas y arbóreas forrajeras: *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium*, *Guazuma ulmifolia Lam*, *Moringa oleifera*. Al igual que su perfil nutricional

para caracterizar su concentración de proteína cruda, grasa, minerales en ceniza, carbohidratos y agua libre.

3.1. *Leucaena leucocephala*

Leucaena leucocephala (Figura 1) tiene sus orígenes en América Central y la península de Yucatán en México, donde su valor forrajero fue reconocido hace más de 400 años por los conquistadores españoles que llevaron alimento y semillas de *Leucaena leucocephala* en sus galeones a Filipinas para alimentar a su ganado (Brewbaker *et al.*, 1985). Desde allí se ha extendido a la mayoría de los países del mundo tropical donde la *Leucaena leucocephala* se usaba como planta de sombra para cultivos de plantación.



Figura 1. *Leucaena leucocephala*

Recuperado de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/mimosaceae/leucaena-leucocephala/fichas/ficha.htm>

Es una planta silvestre, tolerada, cultivada y domesticada en grandes partes del país, y se trata de uno de los árboles leguminosas más cultivados a nivel mundial. Se conocen alrededor de 800 cultivares (Parrotta, 1992). Las legumbres son vendidas en todo el país por las semillas frescas que se utilizan como condimento, tanto crudas como cocidas, de igual manera como los frutos de *Leucaena esculenta*.

También las hojas tiernas se consumen como quelite (Grether, 2006; P. Zárate, 1994)

En la península de Yucatán se emplea como forraje y planta medicinal (Flores *et al.*, 1988). Sobre todo, la subespecie *glabrata* también es útil como cerca viva y protectora de suelo, y es ampliamente promovida y cultivada como fuente de proteína para ganado, y en general como árbol multipropósito. Es fuente de leña, madera, abono orgánico, néctar, tintes y árbol sombra en cafetales (Parrotta, 1992; P. Zárate, 1994)

Leucaena spp., es un árbol o arbusto caducifolio de 3 a 6 m (hasta 12 m) de altura con un diámetro a la altura del pecho de hasta 25 cm. Presenta copa redondeada, ligeramente abierta y rala, hojas alternas bipinadas de 9 a 25 cm de largo, verdes grisáceas y glabras con 11 a 24 pares de folíolos de 8 a 15 mm de largo, elípticos y algo oblicuos; cabezuelas con 100 a 180 flores blancas de 1.2 a 2.5 cm de diámetro; flores de 4.1 a 5.3 mm de largo con pétalos libres, cáliz de 2.3 a 3.1 mm y vainas oblongas, estipitadas, en capítulos florales de 30 vainas o más, de 11 a 25 cm de largo por 1.2 a 2.3 cm de ancho, verdes si están tiernas y cafés cuando maduran, conteniendo de 15 a 30 semillas. Las semillas adquieren una forma ligeramente elíptica, de 0.5 a 1 cm de largo por 3 a 6 mm de ancho, aplanadas, de color café brillante, dispuestas transversalmente en la vaina. Las raíces de la *Leucaena* son profundas y extendidas; la raíz primaria penetra en las capas profundas del suelo y aprovecha el agua y los minerales por debajo de la zona a la que llegan las raíces de muchas plantas agrícolas (R. Zárate, 1987).

Leucaena spp., es capaz de producir rendimientos de biomasa de hasta 12 t de base seca (BS) en 1 año en sistemas de cultivo en callejones (Makkar et al., 2007). Diversos autores afirman que la *Leucaena* spp., tiene alta concentración de proteína cuando se compara con las gramíneas tropicales (Bugarín et al., 2009; González et al., 2012; Leguizamón et al., 2010; Makkar et al., 2007; Rubio et al., 2004); no obstante, existen diferencias dentro del género, por ejemplo en el caso de la especie *L. Leucocephala* se reporta un menor contenido de taninos y fibra, el cual representa un alimento completo de elevado valor en términos de proteína, energía, digestibilidad y palatabilidad (Martínez et al., 2016).

Leguminosas como *L. leucocephala* tienen la capacidad de liberar en un tiempo corto más del 50% del contenido total de nutrimentos como el N, K y el P cuando se incorporan al suelo (Bossa et al., 2005), lo cual indica la excelente calidad de la biomasa que estas especies poseen para ser utilizadas en la recuperación de suelos degradados.

3.2. *Gliricidia sepium*

Gliricidia sepium (Figura 2), es una leguminosa multipropósito, utilizada como árbol de sombra en cultivos de cacao, en barbechos, callejones, como cortina rompevientos, como cercas y postes vivos (Vásquez & Quintero, 1995). Sus propiedades alelopáticas son usadas en agricultura, pero se usa como forraje ya que tiene altos rendimientos de biomasa (Francis et al., 2000). El alto potencial de biomasa comestible y valor nutricional de la *Gliricidia sepium* la hacen una buena alternativa práctica y económica para incrementar la productividad animal y

contribuir, de esta manera, a disminuir los costos de producción (Clavero *et al.*, 1996).



Figura 2. *Gliricidia sepium*

Recuperado de <https://enciclovida.mx/especies/188367-gliricidia-sepium>

Su floración es llamativa y frecuentemente es visitada por las abejas, dada su condición melífera; por esta condición los apicultores reconocen como excelente la miel proveniente de las flores de mata ratón (García, 2004).

Es una leguminosa arbórea, perenne, caducifolia, que posee raíces profundas crece de 10 a 15 metros de altura y 40 cm de diámetro que puede variar dependiendo del ecotipo. Los tallos pueden diferir en arboles adultos y plantas jóvenes siendo en los primeros de corteza un poco fisurada de color gris verdoso a pardo verdoso y los últimos lisos de color gris verdoso; el tallo cuando es adulto generalmente es torcido, de color café verdoso, resquebrajado, con ramas inicialmente erectas y luego de algunos meses de crecimiento se disponen en ángulos de 45 grados tratando de desarrollarse en forma horizontal (García, 2004).

En base seca (BS) contiene 24% de proteína bruta, 45% de fibra, 1,7% de calcio y 0,2% de fósforo (Kojima *et al.*, 1998). Esta planta, además de proveer nitrógeno, activa la absorción y recirculación de los macrominerales mediante su capacidad de extracción del suelo. La proteína bruta de *Gliricidia sepium*, contiene todos los aminoácidos esenciales, excepto los azufrados, en cantidad comparable a la presente en alimentos como la leche, torta de soya, torta de ajonjolí y torta de cacahuate. Diversos estudios concluyeron que la hoja de mata ratón es un forraje de mejor calidad para los bovinos criados en el trópico (Kojima *et al.*, 1998; Vollink, 1993), gracias a su mayor contenido de compuestos nutricionales, su alto coeficiente de degradabilidad y los bajos niveles de principios tóxicos *Gliricidia sepium* es bien aceptado y consumido por bovinos acostumbrados a pastorear esta leguminosa (Urbano *et al.*, 2006).

3.3. *Guazuma ulmifolia* Lam

Guazuma ulmifolia Lam. (Figura 3), conocida como guácimo o guazuma y por numerosos otros nombres, es un árbol de tamaño pequeño o mediano y de muchas ramas, común en pastizales y bosques perturbados. Su distribución va desde el área central de México hasta el norte de Argentina. Sus frutos y follaje son consumidos por los animales domésticos y silvestres y la madera es una fuente importante de leña en las áreas rurales (Francis *et al.*, 2000).



Figura 3. *Guazuma ulmifolia* Lam

Recuperado de <https://enciclovida.mx/especies/167551-guazuma-ulmifolia>

Árbol o arbusto mediano de 2 a 15 m de altura, y hasta 30 m, con un diámetro normal de 30 a 40 cm, y hasta 80 cm. Hojas: caducifolia, la caída de hojas se presenta en la época seca del año, durante un periodo corto. Flores: florece casi todo el año, especialmente de abril a octubre. Frutos: los frutos maduran casi todo el año, principalmente de septiembre a abril y permanecen durante largo tiempo en el árbol (Kumar & Gurunani, 2019)

El guácimo es un árbol de la familia *Sterculiaceae*, presente en zonas tropicales de México (Villa-Herrera *et al.*, 2009); en Veracruz es muy abundante (Sosa & Gómez-Pompa, 1994) y su gran adaptación a las condiciones edafoclimáticas y de manejo adverso, lo hacen un recurso potencial para incluirse en sistemas silvopastoriles con el propósito de producir forraje para la alimentación del ganado.

Las hojas tienen un contenido impresionante de nutrientes. Haciendo los cálculos con base en el peso seco, una muestra procedente de la América Central contuvo un 18 % de proteína, 26 % de fibra y 9 % de ceniza (Salazar & Quesada, 1987). El follaje de guácima es consumido favorablemente por los rumiantes de producción

como vacas y borregos, los pecaríes de collar y los tapires (Janzen & Janzen, 1983) y ha sido usado para alimentar orugas de seda. Durante los períodos de sequía, los animales consumen incluso las hojas caídas. Las flores son una fuente de néctar para las abejas de miel (Francis et al., 2000).

Se encuentra en Campeche, Colima, Chiapas, Chihuahua, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Edo. México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán.

3.4. *Moringa oleifera*

El árbol de moringa (*Moringa oleifera*) (Figura 4) es originario del sur de los Himalayas y el noroeste de la India y pertenece a la familia de las *Moringaceas*. Esta especie crece en zonas tropicales por debajo de los 500 MSnm; sin embargo, puede adaptarse a las condiciones climáticas por arriba de los 1 500 MSnm en ausencia de heladas (Olson & Fahey, 2011).



Figura 4. *Moringa oleifera*

<https://enciclovida.mx/especies/200764-moringa-oleifera>

M. oleifera ha sido ampliamente estudiada en el área de alimentación y medicina humana. Las cualidades nutritivas de las hojas están entre las mejores de los vegetales perennes, pues presenta 27% de proteína cruda y cantidades importantes de calcio, hierro, fósforo, y vitamina A y C. Las hojas de moringa pueden cosecharse durante la época seca, cuando no hay otros vegetales frescos disponibles (Folkard & Sutherland, 1996). Se ha demostrado que aumenta el rendimiento de carne en animales y puede combatir la desnutrición de poblaciones infantiles y maternas desprotegidas (Fahey, 2005). También se ha reportado que las hojas tienen un efecto antiparasitario y curativo en animales (Anwar *et al.*, 2007). Sin embargo, la variación considerable en las propiedades nutrimentales de la moringa es considerable y depende de factores genéticos, medio ambiente y métodos de cultivo (Brisibe *et al.*, 2009).

En los últimos años la hoja seca de la moringa se ha vuelto muy popular en México y otros países particularmente para preparar infusiones (tés) a los que se les atribuyen propiedades antiescleróticas (Chumark *et al.*, 2008) y antioxidante (Verma *et al.*, 2009). A la hoja de la moringa y los té se le atribuyen otras propiedades benéficas como antimicrobiana, antibacteriana, antiviral, antiparasitaria, contra el cáncer, antianémica, antidiabética y antidiurética, entre otras características (Fahey, 2005).

3.5. Metabolitos secundarios de plantas

Las plantas producen diversos compuestos orgánicos que son clasificados en metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos secundarios MS son esenciales para su crecimiento, desarrollo y reproducción. Los MS constituyen

mecanismos de defensa contra la presencia de microorganismos patógenos y la depredación por insectos o herbívoros. Además, son importantes en la interacción de la planta con su entorno, al atraer organismos que polinizan y dispersan las semillas. Los MS de las plantas, no obstante, afectan los procesos metabólicos de animales y/o la tasa de crecimiento de algunos microorganismos después de su ingestión. La presencia y concentración de estos metabolitos puede variar entre especies debido a factores bióticos (interacción entre la bioquímica y fisiología vegetal de la planta) y abióticos (radiación ultravioleta, disponibilidad de agua, temperatura, composición del suelo), el tiempo de recolección, el procesamiento y almacenamiento de las muestras influyen sobre la actividad y concentración de los MS de plantas (Semmar *et al.*, 2011).

Como parte de la respuesta de la defensa química contra el daño que ocasionan las heridas y el ataque de microorganismos patógenos en las plantas se induce la síntesis y acumulación de compuestos de bajo peso molecular, algunos compuestos pertenecientes a los grupos de los alcaloides, los terpenoides y los fenilpropanoides, participan activamente matando directamente al microorganismo patógeno o restringiendo su invasión al resto de la planta. Los conjugados de fenilpropanoides con aminas se incorporan a la pared celular vegetal para aumentar su rigidez y reducir su digestibilidad por insectos y vertebrados herbívoros. Así mismo, algunos alcaloides son neurotóxicos a insectos y vertebrados herbívoros. Es así, como algunos MS constituyen una parte importante de la respuesta de la defensa de las plantas sometidas a heridas, actualmente se conocen aproximadamente 20,000 estructuras de MS que por su composición química son clasificados en dos grupos

principales: nitrogenados y no nitrogenados. Los MS que contienen nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos. Los MS no nitrogenados se dividen en terpenoides, polifenoles, saponinas y flavonoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides.

La biosíntesis y el almacenamiento de MS o de sus precursores, ocurren en diferentes lugares de la célula vegetal. En general, la síntesis de algunos alcaloides y terpenos se realiza en los plástidos; los esteroides, sesquiterpenos y dolicoles se sintetizan en el retículo endoplásmico; mientras que la biosíntesis de algunas aminas y alcaloides tiene lugar en la mitocondria. Los compuestos solubles en agua se almacenan en vacuolas, en tanto que los solubles en lípidos son secuestrados a estructuras especializadas tales como ductos de resinas, laticíferos, pelos glandulares, tricomas o en la cutícula.

Si los metabolitos secundarios se encuentran en determinadas concentraciones en BS, al ser ingeridos por los animales pueden causar efecto negativo en su fisiologismo, trastornos neurológicos, reproductivos y digestivos, papera, gangrena e incluso la muerte. Entre los metabolitos causantes de estos efectos, se encuentran los alcaloides, glicósidos cianogénicos, aminoácidos tóxicos y saponinas, entre otros. Si su concentración es superior al 2 % de BS, producen trastornos digestivos y en órganos sensoriales, relacionados con la alimentación y disminución de la acción de los microorganismos ruminales en la digestibilidad de la pared celular, entre otros. Los metabolitos causantes de estos efectos son, principalmente, los taninos y los inhibidores de proteasas y amilasas (Makkar, 2003).

3.5.1. Saponinas

Son compuestos bioactivos encontrados principalmente en plantas, pero también en algunos organismos marinos e insectos. De acuerdo con el carácter químico de la aglicona (conocido como sapogenina) las saponinas se dividen en esteroides y triterpenoides. Los esteroides predominan en las plantas y son compuestos que tiene 27 átomos de carbono que conforman la estructura central (ej. spirostanol y furostanol). Por su parte las triterpenoides están compuestas principalmente por agliconas con 30 átomos de carbono (Tan *et al.*, 2011).

Las saponinas son glicósidos hidrosolubles, con propiedades tensoactivas y hemolíticas, ya que interaccionan con el colesterol de la membrana de los eritrocitos, ambas atribuidas a sus características estructurales de naturaleza anfifílica. Estos metabolitos también pueden ejercer una amplia actividad biológica y farmacológica, destacándose su efecto insecticida, anti-protozoos, antiinflamatorio, leishmanicida, anti-trichomonas, anti-agregante plaquetario, broncolítico, hipo-colesterolémico, así como su actividad citotóxica frente a varias neoplasias. Estos informes sitúan a las saponinas entre los metabolitos secundarios con elevado valor farmacológico.

Según el número de posiciones de sustitución de los azúcares, pueden clasificarse en monodesmosídicos (el azúcar o azúcares se unen por una única posición a la genina) y bidesmosídicos (el azúcar o azúcares se unen por dos puntos a la genina). El poder hemolítico es característico de los saponósidos triterpénicos, pero es variable según los sustituyentes de la estructura. Así, los saponósidos monodesmosídicos son hemolíticos mientras que los bidesmosídicos no lo son

(López Luengo, 2001). Los tipos de saponinas más encontradas son las triterpenoides especialmente en leguminosas, sin embargo, se puede encontrar una gran variedad de estos compuestos con diferentes propiedades biológicas dependiendo de la modificación en la estructura de su anillo y el número de azúcares adheridos (Tan *et al.*, 2011)

Las saponinas permiten disminuir la metanogénesis indirectamente al reducir la población de protozoarios. Una parte de las bacterias metanogénicas del rumen se encuentran asociadas a los protozoos ciliados. El porcentaje del metano generado en el rumen que es producido por estas bacterias metanogénicas ligadas a los protozoos se sitúa entre un 25 y un 50%. La formación de metano es una ruta de captura del hidrógeno generado en la fermentación anaerobia del sustrato. Con dietas ricas en concentrado, los protozoos generan gran parte del hidrógeno que se libera en el rumen, y que queda a disposición de las bacterias asociadas para la formación de metano (Thakur *et al.*, 2011). Las saponinas eliminan a los protozoarios formando complejos con esteroides en la superficie de sus membranas deteriorándolas hasta que finalmente se desintegran (Ushida *et al.*, 1997). También se ha sugerido que las saponinas reducen la producción de metano por otras vías. Por ejemplo, se ha reportado que la fruta tropical *Sapindus saponaria* redujo la producción de metano en líquido ruminal normal en 14 y 29 %, demostrando que el efecto no depende totalmente de la reducción del conteo de protozoarios (Hess *et al.*, 2003). Además, es conocido que las saponinas favorecen la producción de una mayor proporción de propionato, resultando en una menor oferta de hidrógenos necesarios para la producción de metano (Patra & Saxena, 2010).

3.5.2. Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. Los flavonoides forman parte de los compuestos fenólicos policíclicos, los cuales derivan del fenol, que es un compuesto aromático con un grupo hidroxilo; así mismo, se definen como pigmentos aromáticos heterocíclicos que contienen oxígeno y que dan color amarillo, rojo y azul a las plantas y frutas (Cruz Carrillo & Lizarazo Cely, 2016). Por lo general, los flavonoides se encuentran principalmente en plantas y muy poco en hongos y algas, en sus partes aéreas en diferentes concentraciones, aunque en algunos casos también en la raíz (Pérez Trueba, 2003)

Los flavonoides están ampliamente distribuidos en plantas vasculares y briófitas, y han sido reportados 5,000 tipos de flavonoides como constituyentes naturales, por lo que podemos encontrarlos en los forrajes que sirven de alimento a los rumiantes. Estos metabolitos secundarios se encuentran abundantemente en las partes aéreas jóvenes y más expuestas al sol, como son: hojas, frutos y flores, ya que la luz solar favorece su síntesis, responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas, confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización y tienen una importante capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre (Galicia-Jiménez *et al.*, 2011). Además, están implicados en interacciones directas con el transporte y la vía de traducción de señales, en la regulación transcripcional, en la expresión de genes endógenos. Otra función relevante de los flavonoides se ha observado en la

interacción planta-microorganismo, donde ellos tienen el papel principal como molécula, señal repelente o atrayente de bacterias patógenas o benéficas, respectivamente. Cabe recalcar que todas las interacciones planta-microorganismo o huésped-parásito implica un reconocimiento mutuo entre sustancias secretadas por la planta o el huésped y por el microorganismo, es decir, un diálogo molecular donde se intercambian señales (Galicia-Jiménez *et al.*, 2011).

Las principales clases de flavonoides son: 1) flavonas (estructuras básicas) por ejemplo: luteolina, la apigenina, diosmetina, crisoeriol, tangeretina, sinensetina, gardenin, vitexina y baicaleína; 2) flavonoles (que tiene un grupo hidroxilo en la posición 3) por ejemplo: kaempferol, quercetina, galangina, datiscetina, morin, robinetina; isorhamnetina, tamarixetina, quercetagetina y miricetina; 3) flavanonas (enlaces saturados en las posiciones 2-3) por ejemplo: hesperetina, taxifolina, eriodictiol y naringenina. Las plantas que contienen flavonoides no solo reducen la producción de metano, también estimulan el metabolismo microbial; en un estudio en donde se evaluó el efecto de *L. officinalis* y *E. arvense*, plantas ricas en flavonoides, se observó que la adición de extractos de ambas plantas mejoran la tasa de fermentación en un 50% a través de un aumento de la liberación de acetato y propionato, reduciendo de esta manera la producción de metano (Patra & Saxena, 2010). Los rumiantes obtienen su energía necesaria por la gluconeogénesis (AGV: propionato, butirato, acetato). El propionato es utilizado por el rumiante para la formación de glucosa, el acetato y butirato forman grasas o energía, sí un rumiante ya ha cumplido el requerimiento de glucosa puede formar grasa o glucógeno.

4. JUSTIFICACIÓN

Durante el acondicionamiento nutricional del ganado, principalmente rumiantes, se emplean técnicas de pastoreo, corte de pastos, suministro de forraje, entre otros, donde se involucran especies de arbóreas, forrajeras y leguminosas, especies como *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium*, *Guazuma ulmifolia Lam*, *Moringa oleifera*, frecuentan la lista de las plantas utilizadas como alternativa para la alimentación ruminal, debido a sus cualidades nutricionales, disponibilidad de cosecha, venta y facilidad de comercio, lo que las convierten en una opción accesible para los productores. Conocer las características nutricionales de cada planta es fundamental para poder administrar una dieta correcta y continuar con la investigación de los efectos directos del consumo de los metabolitos secundarios presentes en las hojas, así como la cantidad de macronutrientes disponibles en la dieta ruminal.

Las interacciones entre el disolvente y la molécula de extracción están en función de sus características químicas. Las saponinas y flavonoides son metabolitos con particularidades químicas y con estructuras distintas. La capacidad de cada disolvente para poder extraer los metabolitos secundarios depende de su polaridad y concentración. Estandarizar la metodología de extracción de los metabolitos en cada hoja, permite tener un control sobre el análisis de composición de las plantas con particular interés en la industria ganadera.

5. HIPÓTESIS

Hi: Los disolventes empleados con diferentes polaridades y concentraciones provocan un efecto directo en el rendimiento de la extracción de las saponinas y flavonoides en *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium*, *Guazuma ulmifolia Lam*, *Moringa oleifera*

Ho: Los disolventes empleados con diferentes polaridades y concentraciones no tienen efecto directo en el rendimiento de la extracción de las saponinas y flavonoides en *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium*, *Guazuma ulmifolia Lam*, *Moringa oleifera*

6. OBJETIVO

6.1. OBJETIVO GENERAL

- Analizar el efecto del disolvente en función de la concentración y polaridad sobre la extracción de saponinas y flavonoides en *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium*, *Guazuma ulmifolia Lam*, *Moringa oleifera*

6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Comparar el uso de distintos disolventes a distintas concentraciones para la mejor extracción de saponinas y flavonoides en las plantas forrajeras (*Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium*, *Guazuma ulmifolia Lam*, *Moringa oleifera*).
- Determinar el mejor disolvente a la concentración óptima para la extracción de saponinas y flavonoides en cada especie (*Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium*, *Guazuma ulmifolia Lam*, *Moringa oleifera*).

- Obtener la combinación adecuada del disolvente y concentración para la extracción de saponinas y flavonoides para cada una de las especies (*Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium*, *Guazuma ulmifolia* Lam, *Moringa oleifera*).

7. METODOLOGÍA

Las hojas de *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium* y de *Guazuma ulmifolia* Lam se recolectaron en el Campo Experimental “Tuxpan”, en Iguala de la Independencia, Guerrero, perteneciente al Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Mientras que las hojas de *Moringa oleifera* se colectaron en Apipululco, Municipio de Cocula, Guerrero con un proveedor local. Las hojas se secaron a la sombra y se enviaron al laboratorio de bromatología II del DNAB, FMVZ, en donde se molieron y almacenaron hasta su análisis.

Se realizó el análisis químico proximal de las hojas de acuerdo con la siguiente metodología.

7.1. Análisis químico proximal

Un análisis químico proximal tiene como objetivo la identificación de la cantidad de macronutrientes presentes en un alimento, como lo son la humedad, proteína, grasas y cenizas. Las técnicas empleadas para cuantificar cada macronutriente dependerán de la matriz alimenticia que se desea analizar, de manera general, se utilizan las técnicas oficiales de la AOAC (Asociation of Oficial Analytical Chemists). (Feldsine et al., 2002).

7.1.1. Cenizas

La ceniza de un alimento es el residuo inorgánico que queda después de la combustión de la materia orgánica. El valor de cenizas es considerado un criterio útil para la identificación de la autenticidad de un alimento ya que puede detectar la presencia de adulterantes. Su determinación consiste en llevar las muestras a una carbonización para después realizar la incineración en una mufla. El total de cenizas es obtenido por diferencia de peso.

La determinación de cenizas se realizó triplicado donde para cada repetición se empleó 1 g de muestra que se depositó en crisoles, los cuales se mantuvieron previamente en una estufa a 100°C hasta peso constante. Posteriormente, las muestras se incineraron en mufla a 500°C durante 24 horas, los crisoles se dejaron enfriar en la mufla apagada y posteriormente se colocaron en el desecador hasta llegar a temperatura ambiente para su pesado final.

Material empleado:

- Crisol
- Mufla
- Balanza analítica
- Estufa
- Espátula

Algoritmo matemático para el cálculo de cenizas:

$$[g \text{ de crisol cenizas}] - [g \text{ de crisol}] = [g \text{ de cenizas}]$$

$$\frac{[g \text{ de cenizas} * 100]}{[g \text{ de muestra}]} = \% \text{ de cenizas}$$

7.1.2. Humedad

La cantidad de agua presente en un alimento es un factor importante de conocer, las interacciones microbiológicas dependen de la cantidad de agua libre presente en el alimento, las interacciones entre los macronutrientes dependen del agua ligada presente en él. La metodología empleada para la determinación de humedad es por secado. La determinación de pérdida de peso debida a la evaporación de agua en el punto de ebullición o temperaturas cercanas. El método se basa en la determinación gravimétrica en la que se determina la diferencia de peso entre la muestra antes de entrar al horno y después de ser secada a temperatura constante. El porcentaje de humedad se calcula por diferencia de peso.

Para esta determinación se realizó triplicado donde para cada repetición se empleó 2 gramos de muestra para cada planta, y se mantuvo a 50°C por 24 horas

Material:

- Charola
- Horno
- Balanza
- Espátula

Algoritmo matemático para el cálculo de humedad.

$$[g \text{ de (charola + muestra secada)}] - g \text{ de la charola} = g \text{ de muestra seca}$$

$$[g \text{ de muestra} - g \text{ de muestra seca}] = [g \text{ de humedad}]$$

$$\frac{[g \text{ de humedad} * 100]}{[g \text{ de muestra}]} = \% \text{ de humedad}$$

7.1.3. Extracción de grasa cruda

La extracción de muestras sólidas con disolventes, generalmente conocida como extracción sólido-líquido o lixiviación, es un método muy utilizado en la separación de analitos de muestras sólidas. El método de extracción sólido-líquido o Soxhlet, necesita un aporte de calor.

La extracción Soxhlet ha sido (y en muchos casos, continúa siendo) el método estándar de extracción de muestras sólidas más utilizado desde su diseño en el siglo pasado, y actualmente, es el principal método de referencia con el que se comparan otros métodos de extracción. Además de muchos métodos de la EPA (U.S. Environmental Protection Agency) y de la FDA (Food and Drugs Administration) utilizan esta técnica clásica como método oficial para la extracción continua de grasa cruda en sólidos.

En este procedimiento las muestras sólidas finamente pulverizadas se colocaron en un cartucho de material poroso que se sitúa en la cámara del extractor Soxhlet. Se calienta el disolvente, situado en el matraz, se condensan sus vapores en el refrigerante y caen, gota a gota, sobre el cartucho que contiene la muestra, extrayendo los analitos solubles. Cuando el nivel del disolvente con los analitos disueltos asciende por el sifón y alcanza la parte retorna al matraz de ebullición. Este proceso se repite hasta que se completa la extracción de las grasas y analitos poco polares de la muestra y se concentran en el disolvente.

Para las muestras de cada hoja se realizó triplicado donde para cada repetición se empleó 3 gramos de muestra y se mantuvo en extracción 5 horas y se empleó éter como disolvente de extracción.

Materiales:

- Matraz de bola a peso constante
- Éter
- Equipo Soxhlet
- Mangueras
- Refrigerante.
- Cartucho o dedal de extracción.
- Perlas de ebullición

Algoritmo matemático para el cálculo del porcentaje de grasa

$$[g \text{ de (matraz + perlas de ebullición + grasa)}] - g \text{ (Matraz + perlas)} \\ = g \text{ de grasa.}$$

$$\frac{[g \text{ de grasa} * 100]}{[g \text{ de muestra húmeda}]} = \% \text{ de grasa}$$

7.1.4. Proteína Kjeldahl

El método Kjeldahl mide el contenido en nitrógeno de una muestra. El contenido en proteína se puede calcular seguidamente, presuponiendo una proporción entre la proteína y el nitrógeno para el alimento específico que está siendo analizado, tal y como explicaremos más adelante. Este método se puede dividir en 3 etapas: digestión o mineralización, destilación y valoración. El procedimiento por seguir es

diferente en función de si en la etapa de destilación el nitrógeno liberado es recogido sobre una disolución de ácido bórico o sobre un exceso conocido de ácido clorhídrico o sulfúrico patrón. Ello condiciona la forma de realizar la siguiente etapa de valoración, así como los reactivos empleados.

(a) Etapa de digestión: un tratamiento con ácido sulfúrico concentrado, en presencia de un catalizador y ebullición convierte el nitrógeno orgánico en ion amonio.

Procedimiento: Se introducen de 1 a 5 g de muestra en un tubo de mineralización y se agregan 3 g de catalizador que suele estar constituido por una mezcla de sales de cobre, óxido de titanio u óxido de selenio. De forma habitual se utiliza como catalizador una mezcla de K_2SO_4 : $CuSO_4$: Se (10:1:0,1 en peso). Después se adicionan 10 mL de H_2SO_4 concentrado y 5 mL de H_2O_2 . Posteriormente se digiere a 420 °C durante un tiempo que depende de la cantidad y tipo de muestra. Se sabe que la digestión ha terminado porque la disolución adquiere un color verde esmeralda característico. En esta etapa, el nitrógeno proteico es transformado en sulfato de amonio por acción del ácido sulfúrico en caliente. En la actualidad, para llevar a cabo este proceso se emplean digestores automáticos que son capaces de digerir un número determinado de muestras al mismo tiempo.

(b) Etapa de destilación: se alcaliniza la muestra digerida y el nitrógeno se desprende en forma de amoníaco. El amoníaco destilado se recoge sobre un exceso desconocido de ácido bórico.

Procedimiento: Después de enfriar se adicionan al tubo de digestión 50 mL de agua destilada, se pone en el soporte del destilador y se adiciona una cantidad suficiente

de hidróxido de sodio 10 N, en cantidad suficiente (50 mL aprox.) para alcalinizar fuertemente el medio y así desplazar el amoniaco de las sales amónicas. El amoniaco liberado es arrastrado por el vapor de agua inyectado en el contenido del tubo durante la destilación, y se recoge sobre una disolución de ácido bórico (al 4 % p/v).

(c) Etapa de valoración: La cuantificación del nitrógeno amoniacal se realiza por medio de una volumetría ácido-base del ión borato formato, empleando ácido clorhídrico o sulfúrico y como indicador una disolución alcohólica de una mezcla de rojo de metilo y azul de metileno.

Los equivalentes de ácido consumidos corresponden a los equivalentes de amoniaco destilados.

El método se basa en la determinación de la cantidad de Nitrógeno orgánico contenido en la muestra, consta de 2 pasos: a) La descomposición de la materia orgánica bajo calentamiento en presencia de ácido sulfúrico concentrado y catalizador. b) Determinación de la cantidad de amoniaco obtenido de la muestra por medio de una titulación con HCl 0.1 eq/L(A.O.A.C., 2005b).

Material y reactivos

- Estufa a 100°C
- Balanza analítica
- Campana de extracción
- Digestor Tecator
- Destilador

- Espátula
- Matraces de Kjeldahl de 800 mL
- Matraces Erlenmeyer de 250mL
- Probeta de 50 mL
- Bureta de 50 mL
- Agua destilada
- Pastillas para digestión (K_2SO_4 , $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$: Se (10:1:0,1 en peso). sulfato de potasio, sulfato de cobre pentahidratado y Selenio negro metálico en polvo
- NaOH (32%)
- HCl (0.1 eq/L) valorado
- Ácido bórico al 4% con indicadores verde de bromocresol (0.033%) y rojo de metilo (0.066%)

Procedimiento

Se pesó 1g de muestra original, se realizó triplicado y un blanco, donde en cada repetición se colocó en los matraces de Kjeldahl, se le agregó 1 g de la mezcla de selenio, sulfato de cobre·5H₂O, y sulfato de potasio (en la proporción previamente indicada), y 20 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se colocaron los matraces en el digestor previamente precalentado a 400°C, se puso la tapa por la que los gases llegan a la trampa de gases. Se mantuvo en calentamiento hasta que se degradó la materia orgánica y el líquido contenido cambiara a un color verde translucido. Se dejaron enfriar los tubos y se llevaron al destilador donde se recibió el producto de la destilación en matraces Erlenmeyer de 250

mL para proceder a la titulación con HCl (0.1 eq/L) hasta obtener un vire rosado.

Junto con las muestras se realizó un Blanco

Algoritmo matemático para el cálculo de proteína:

$$\frac{mLde\ HCl - Blanco}{(g\ muestra\ húmeda)} * 0,1 \frac{eqHCl}{1000mL} * \frac{1eqN}{1eqHCL} * \frac{14\ gN}{1eqN} * 100\% * 6.25$$
$$= \%Proteína \frac{cruda}{g\ muestra\ húmeda}$$

16g de nitrógeno / 100 g de proteína, entonces el factor de proteína es de 6.25 (100g/16g)

7.2. Extracción de metabolitos secundarios

7.2.1. Preparación de la muestra

Las hojas de *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium*, *Guazuma ulmifolia lam* y *Moringa oleifera* se molieron empleando un molino de café y se pasaron a través de un tamiz de malla 60. Se pesaron 3 g de muestra seca y se desengrasaron en Soxhlet empleando éter como disolvente, la muestra desengrasada y seca en estufa a 50°C por 6 horas y se almacenó en frascos de vidrio hasta su uso.

7.2.2. Obtención de extractos

Para la extracción de metabolitos secundarios durante el presente estudio se emplearon tres disolventes: etanol, metanol y acetona a tres concentraciones: 100, 75 y 50%, de acuerdo con lo reportado previamente (Do *et al.*, 2014). La extracción de MS se realizó por triplicado, se pesaron 200 mg de muestra desengrasa y seca y se adiciono en un matraz Erlenmeyer de 250 mL se adiciona 20 mL de disolvente. Las muestras se sonicaron (Ultrasonic cleaner, marca Branson B-32 117volt y 150

watts) durante 20 minutos a temperatura ambiente pasado ese tiempo el contenido del matraz se transfiere a tubos cónicos de 50 mL y se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 g a 4°C. Se recolectó el sobrenadante y la pastilla resultante se regresó al matraz en donde se repitió el proceso de extracción para volver al inicio, el proceso se realizó dos veces con la misma metodología, obteniendo 40 mL totales del extracto (Makkar, 2003).

Posteriormente el extracto se concentró empleando un rotavapor a 45°C y las muestras se liofilizaron durante 24 horas, pasado ese tiempo el producto liofilizado se almacenó en frascos ámbar hasta su uso.

7.3. Determinación de metabolitos secundarios

7.3.1. Cuantificación de saponinas

El contenido de saponinas se determinó mediante la técnica de vainillina-ácido sulfúrico. Este ensayo espectrofotométrico se basa en la reacción de hidrólisis de saponinas triterpénicas o esteroidales que al reaccionar con el ácido sulfúrico se rompen los enlaces glucosídicos y por otro lado la vainillina oxida la aglicona o genina presente en la saponina la cual produce una coloración rojo púrpura, medido en longitudes de onda entre 415- 560 nm (Du *et al.*, 2018).

Se pesaron 10 mg del extracto liofilizado y se disolvió en 2 mL de metanol, la resuspensión se llevó a una concentración de [5 mg/mL]. Se realizó una curva estándar de Escina/vainillina, de concentraciones de 1.25-10 mg/mL. Para realizar la curva patrón se preparó un stock de Escina a una concentración [10 mg/mL], para obtener diluciones seriadas, de [5 mg/mL], [2.5 mg/mL], [1.25 mg/mL]. Para las muestras se tomaron 0.25 mL del extracto a la concentración de [5 mg/ml], se

adicionaron 0.5 mL de vainillina (8%), se homogeneizaron con ayuda de un vortex, posteriormente se adicionaron 2.5 mL de H₂SO₄ al 72%, para posteriormente incubar a 60°C/15 min, con agitación constante, pasado este tiempo la muestra se enfrió para proceder la medición en el espectrofotómetro a 560 nm, este tratamiento fue realizado por triplicado para las muestras, la curva y el blanco. La cantidad de saponinas en los extractos se expresó como mg eq de Escina /gramo de base seca (BS).

En la Figura 5, se ilustra el procedimiento para la determinación de saponinas

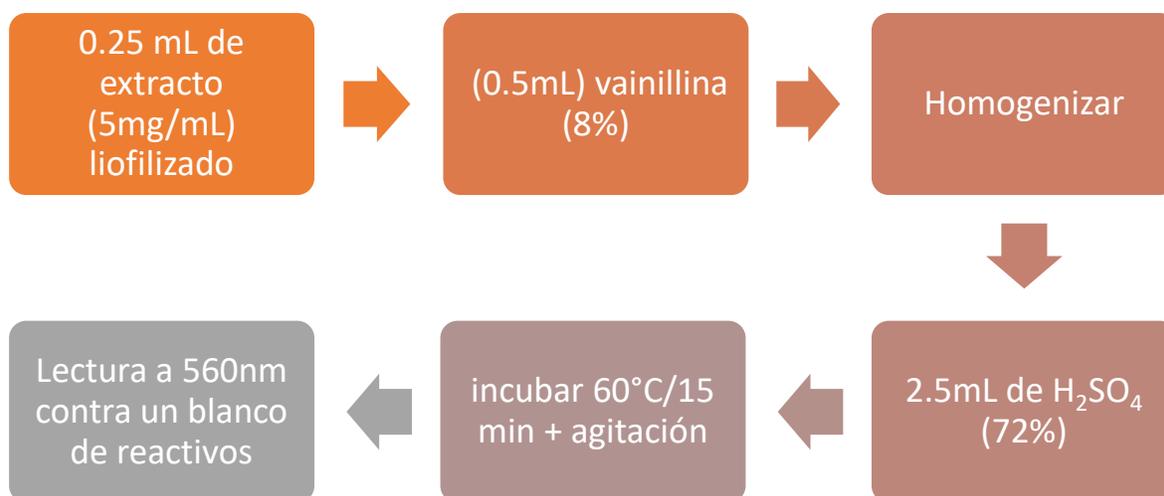


Figura 5. Procedimiento aplicado a la curva, muestras y blanco para cuantificación de saponinas por el método de vainillina-ácido sulfúrico.

7.3.2. Cuantificación de flavonoides

Las flavonas y flavonoles, desde el punto de vista reactivo, forman complejos estables con el cloruro de aluminio y son susceptibles de analizar mediante espectrofotometría ultravioleta-visible (Grosso *et al.*, 2007). Debido a lo anterior, el

contenido de flavonoides se determinó usando quercetina como compuesto de referencia. Las muestras diluidas se mezclaron con cloruro de aluminio y acetato de potasio. La absorción a 415 nm se leyó en un espectrofotómetro después de 30 minutos a temperatura ambiente. Se preparó una solución estándar de quercetina, con una solución stock a una concentración de 1 mg/mL, de la cual se hicieron diluciones a [0.5 mg/mL], [0.25 mg/mL], [0.125 mg/mL], [0.0625 mg/mL], y se incluyeron los valores del blanco. Todas las determinaciones se efectuaron por triplicado. La cantidad de flavonoides en los extractos se expresó como mg eq de quercetina /gramo de base seca (BS).

Se pesaron 10 mg del extracto liofilizado y se disolvió en 2 mL de etanol, se tomaron 2 mL de la muestra a una concentración de [5 mg/ml]. Para la muestra y la curva se adicionaron 0.1 mL de cloruro de aluminio al 10%, homogenizando la adición con ayuda de un vortex, posteriormente se adiciona 0.1 mL de acetato de potasio al 0.1mM, para posteriormente dejarlo reposar 30 min/TA (temperatura ambiente) en cuarto oscuro y realizar la medición en el espectrofotómetro a 415nm este tratamiento fue realizado para las muestras, la curva y el blanco. En la Figura 6 se presenta el procedimiento para la determinación de flavonoides.

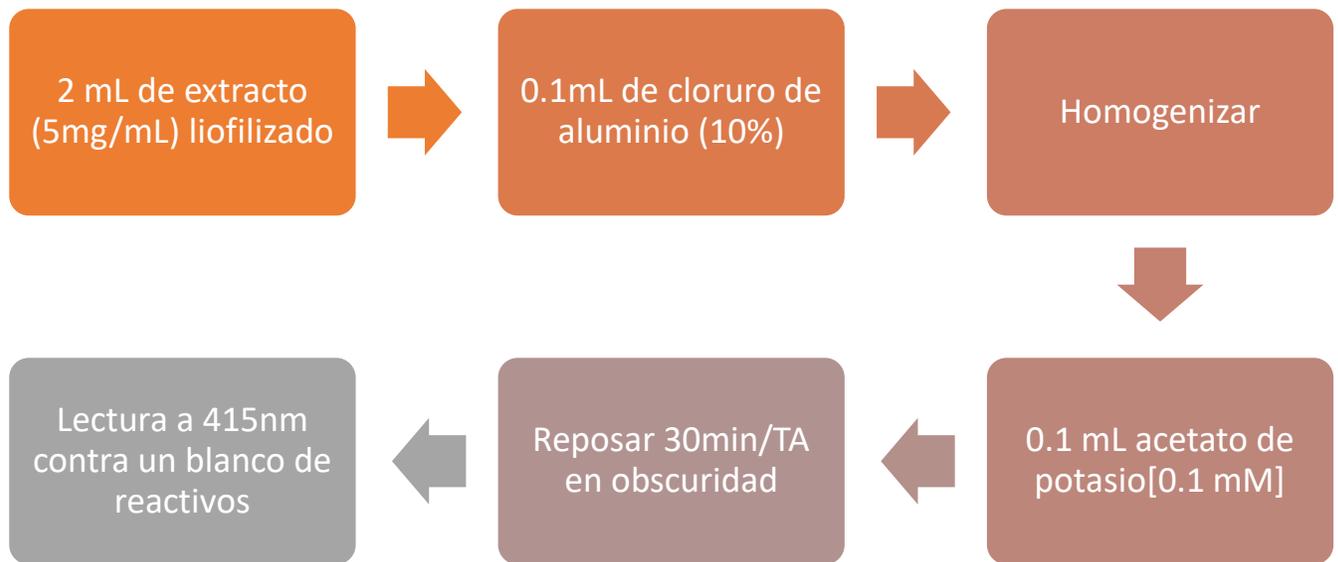


Figura 6. Procedimiento aplicado a la curva, muestras y blanco para cuantificación de flavonoides utilizado como referencia quercetina

Los datos obtenidos fueron asignados a un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial, de dos factores con tres niveles (3×3), 3 tipos de disolvente de extracción y como segundo factor 3 concentraciones del mismo. Los datos obtenidos se analizaron con Rstudio [Rstudio Team, 2020]. Primero se corroboraron los supuestos de independencia estadística, homogeneidad de las varianzas y la distribución normal de los datos. Posteriormente, se compararon las medias de los tratamientos en un análisis de Tukey, utilizando la biblioteca Agricolae y una rutina del modelo lineal (lm). Los datos se analizaron de acuerdo con el siguiente modelo [Cochran y Cox, 1992]

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

En el modelo, Y_{ijk} es la variable respuesta del i -ésimo tipo de disolvente, la j -ésima concentración, en la k -ésima repetición, μ es la media general, α_i es el efecto del disolvente utilizado, β_j es el efecto de la concentración del disolvente, $(\alpha\beta)_{ij}$ el efecto de interacción entre los dos factores y ε_{ijk} es el error aleatorio. Las gráficas presentadas en los resultados se realizaron con la biblioteca ggplot de Rstudio.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Análisis químico proximal

En la Tabla 1 se presentan los resultados de la composición química de las cuatro hojas evaluadas en el presente estudio, como se observa el contenido de cenizas, grasa y proteína es diferente entre las especies.

Tabla 1. Análisis químico proximal (AQP) de hojas de *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium*, *Guazuma ulmifolia* Lam y *Moringa oleifera*

Hoja	Carbohidratos	Cenizas	Grasa	Proteína	Humedad
	%				
<i>Leucaena leucocephala</i>	3.26 ± 0.29 ^b	0.46 ± 0.02 ^c	0.52 ± 0.30 ^b	1.24 ± 0.16 ^c	94.50 ± 0.29 ^b
<i>Gliricidia sepium</i>	2.6 ± 0.03 ^c	0.61 ± 0.07 ^a	0.56 ± 0.34 ^a	1.35 ± 0.32 ^a	94.78 ± 0.03 ^c
<i>Guazuma ulmifolia</i> Lam	3.22 ± 0.33 ^a	0.59 ± 0.02 ^b	0.53 ± 0.12 ^b	1.05 ± 0.42 ^d	94.58 ± 0.33 ^a
<i>Moringa Oleifera</i>	3.40 ± 0.15 ^c	0.61 ± 0.18 ^b	0.19 ± 0.12 ^c	1.42 ± 0.05 ^b	94.35 ± 0.15 ^c

Los valores son la media ± SEM, n=3 por hoja. Medias en una columna sin letra común difieren entre sí, P< 0.05. Las diferencias se determinaron mediante ANOVA de una vía, se usó prueba Tukey como post-hoc

Consideración adicional.

Para las metodologías que correspondientes al AQP, las muestras fueron analizadas en base húmeda; Por lo que se considera el siguiente *algoritmo matemático*.

$$g \frac{\text{Macronutriente}}{100g \text{ muestra seca}} * g \frac{\text{muestra seca}}{100g \text{ muestra original}} * 100\%$$

$$= \frac{g \text{ Macronutriente}}{100 g \text{ Muestra original}}$$

Donde:

$$g \text{ muestra seca} = (100 g \text{ muestra} - g \text{ humedad})$$

Estudios previos han demostrado que el contenido de proteína en la hoja de *Moringa oleifera* varía de acuerdo con su estado fenológico siendo mayor después de seis años (25.74%) (Pérez *et al.*, 2010), este valor coincide con lo detectado en el presente estudio por lo que podemos especular que las muestras se obtuvieron de árboles en ese estado fenológico. Debido a su alto contenido de proteína *Moringa oleifera* es una planta con alto valor nutricional, lo que permite su uso en la alimentación de rumiantes, aves, peces y cerdos (Garavito, 2008).

Gliricidia sepium es una leguminosa arbórea que presenta un alto contenido de proteína bruta, la cual se reporta en un rango de 18.8-27.6% en las hojas y de 14.1-25% en tallos tierno (Garavito, 2008). Nuestros resultados demuestran que el contenido de proteína en *Gliricidia sepium* es de 25.97%, valor que se encuentra dentro de los rangos reportados en la literatura. El contenido de ceniza reportado por Araque *et al.*, (2006) indica una tendencia decreciente en función de la edad en la planta alcanzando valores de 10.5% a 3 meses hasta 8.3% a 12 meses, este porcentaje se encuentra repartido entre algunos componentes como calcio, magnesio, manganeso, zinc, fósforo, potasio e hierro. Los resultados obtenidos en esta investigación son de 11.86%, las condiciones de corte y recolección de muestra, así como su edad y estado fenológico se desconocen, sin embargo, sugieren ser las condiciones que interfieren al obtener una medición mayor en cuanto a contenido de ceniza.

Las hojas de *Guazuma ulmifolia* Lam analizadas durante este proyecto contienen un total de 19.49% de proteína bruta. Vargas & Elvira (1994) suministraron una dieta controlada de esta planta a rumiantes en producción, ellos reportan un contenido de proteína bruta del 18.7%. Las características composicionales de esta planta también están ligadas a la digestibilidad y aprovechamiento de nitrógeno en la dieta. Nuestros resultados de proteína concuerdan con lo reportado por los investigadores; sin embargo, la concentración de ceniza obtenidos durante este análisis es de 11.06%, y lo reportado por los investigadores, 9.6%. Lo que sugiere una ligera variación en cuanto a concentraciones de minerales.

Leucaena leucocephala es una leguminosa tropical de conocido y elevado valor nutritivo para los rumiantes, así entonces es un forraje valioso como ingrediente en raciones para el ganado. Santiago Figueroa *et al.*, (2016) analizaron la variación de la composición química y valor nutricional de *L. leucocephala* a través de la edad de la planta; Sus resultados de proteína 23.74% y ceniza 10.3%. La cuantificación que se llevó a cabo en el presente análisis arroja los siguientes resultados: 8.54 % de ceniza y 22.56% de proteína. Las leguminosas son capaces de sintetizar altos niveles de proteína cruda con una tasa relativamente baja de disminución de este componente a medida que la planta madura, por ello la variación de los resultados entre esta investigación y los encontrados en la literatura.

8.2. Cuantificación de saponinas y flavonoides

A continuación, se presentan los resultados de la cuantificación de metabolitos secundarios en las hojas analizadas.

8.2.1. Saponinas y flavonoides en *Leucaena leucocephala*

En la Figura 7A se reporta el contenido de saponinas en las hojas de *Leucaena leucocephala*, como se puede observar, el mayor contenido ($p < 0.05$) de saponinas se obtuvo empleando como disolvente de extracción metanol 100% (6.86 ± 0.002 mg/g de BS), seguido por acetona 75% (6.77 ± 0.003 mg/g BS). El menor contenido de saponinas ($p < 0.05$) se obtuvo cuando se empleó metanol 75% (0.87 ± 0.001 mg/g BS). Se ha reportado que el contenido de saponinas en *Leucaena leucocephala* es de 7 mg/g BS.

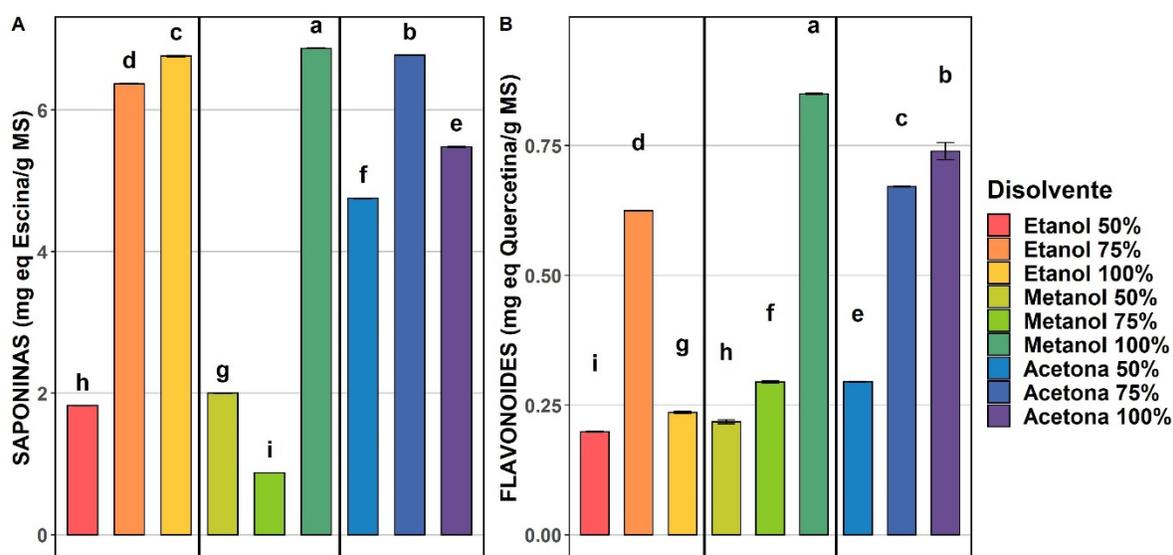


Figura 7. (A) Comparación de la extracción de saponinas y (B) flavonoides por distintos disolventes a distintas concentraciones en la hoja *L. leucocephala*

El análisis de Tukey muestra las diferencias entre tratamientos. Los tratamientos con literales diferentes (abcdefghi) son diferentes estadísticamente ($P < 0.05$). En el presente análisis la interacción entre la concentración del disolvente y el tipo de disolvente utilizado se consideró significativa con un valor de $P < 0.05$.

En esta planta la mayoría de las saponinas se encuentran glicosiladas entonces su polaridad varía de acuerdo con el tipo de carbohidrato unido (López Luengo, 2001).

En el presente estudio el mayor rendimiento de extracción se obtuvo con un disolvente polar a una alta concentración (metanol 100%), lo que indica que probablemente los carbohidratos unidos a las saponinas de esta especie, en particular de *Leucaena leucocephala* son azúcares reductores. Dago Dueñas *et al.*, (2020) después de realizar un tamizaje fitoquímico reportaron la presencia de saponinas y carbohidratos reductores en esta planta. López Luengo, (2001) indica que las saponinas son heterósidos que constan de una parte glucídica (con uno o más azúcares) y de una genina (parte no glucídica) denominada sapogenina, que puede ser de naturaleza esteroide o triterpénica. Los azúcares más frecuentes constituyentes de las saponinas son la glucosa, arabinosa, ramnosa, galactosa y xilosa (Bossa *et al.*, 2005). Es necesario efectuar más estudios para identificar los azúcares presentes en las saponinas de *Leucaena leucocephala*.

Por sus características nutricionales *Leucaena leucocephala*, es una hoja viable para la implementación de proteína en la dieta ruminal así como buena fuente de saponinas. (Verdecia *et al.*, 2012).

Verdecia *et al.*, (2012) desarrollaron una investigación en torno a la variación de la concentración de saponinas y proteínas en las hojas de *Leucaena leucocephala* tomando a consideración factores como la edad de las hojas y la disponibilidad de agua con las que contaba la planta. Los niveles de saponinas reportados son 6-8% en hojas y tallos cuando las plantas son jóvenes (60 días); Los niveles de proteína reportados son de 22% a la misma edad. Sin embargo estos valores son determinados por las condiciones de crecimiento de la planta.

Las características de las saponinas en *Leucaena leucocephala* indican un carácter medianamente polar, debido a que la mayor extracción de este metabolito es con la combinación del disolvente metanol al 100%, ya que la acetona tiene un carácter más apolar, las interacciones con este disolvente no fueron las de mayor extracción.

En el caso de los flavonoides presentes en *Leucaena leucocephala* (Figura 7B), observamos una mayor extracción empleando *metanol* al 100%. Químicamente, los flavonoides poseen dos anillos bencénicos unidos por una cadena corta de tres carbonos (C6 C3 C6 o difenilpropano), por lo que contienen 15 carbonos y presencia de grupos hidroxilo, lo que le confiere un carácter polar (Galicia-Jiménez et al., 2011). Las características antioxidantes de los flavonoides permiten estimular la digestión microbiana en el rumen, aunque las concentraciones de este metabolito en particular son relativamente bajas en *Leucaena leucocephala* 0.84 ± 0.002 mg/g BS su presencia en la dieta ruminal es de particular interés por la estimulación de algunas rutas metabólicas presentes en la digestión ruminal (Pérez Trueba, 2003). Sin embargo, los niveles presentes de flavonoides en *Leucaena leucocephala* son solo ilustrativos, pues no hay evidencia que a esas concentraciones tenga un efecto notorio en la digestión ruminal (Martínez et al., 2016).

8.2.2. Saponinas y flavonoides en *Gliricidia sepium*

En las hojas de *Gliricidia sepium* que fueron utilizadas para este análisis, se logró extraer y cuantificar la concentración máxima ($p < 0.05$) de 7.48 ± 0.003 mg/g BS en saponinas y 0.39 ± 0.001 mg/g BS en flavonoides, y en ambos casos la acetona al 75% es el mejor disolvente de extracción; El menor porcentaje de extracción ($p < 0.05$) se obtuvo con metanol al 100% para saponinas con valor de 1.33 ± 0.002

mg/g BS; en el caso de los flavonoides el menor valor de extracción ($p < 0.05$) es de 0.20 ± 0.006 mg/g BS con metanol al 50%, en las Figuras 8A y 8B se ilustra este comportamiento.

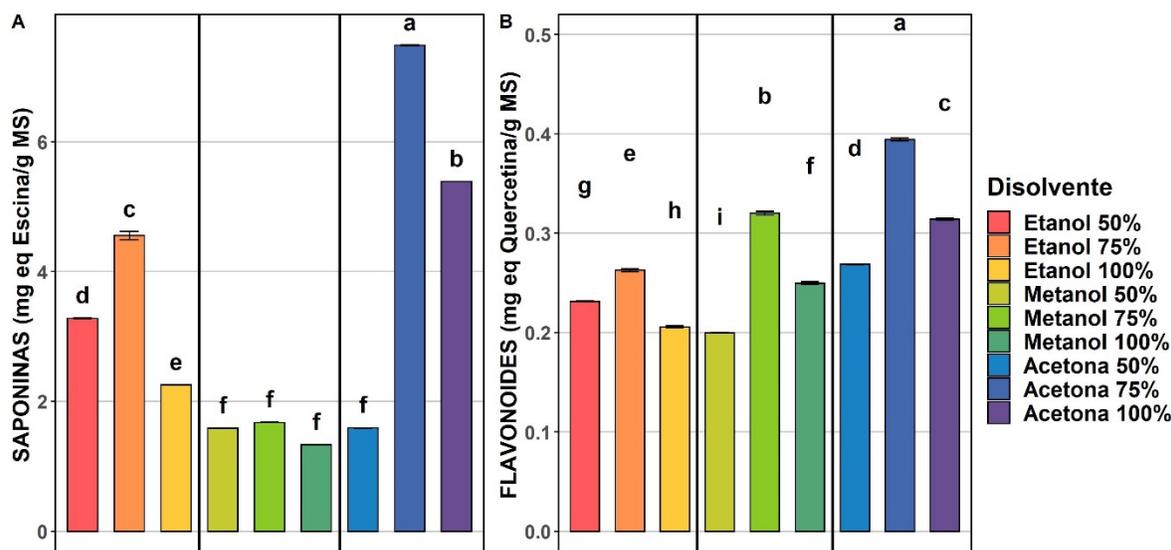


Figura 8. (A) Comparación de la extracción de saponinas y (B) flavonoides por distintos disolventes a distintas concentraciones en la hoja *Gliricidia sepium*

El análisis de Tukey muestra las diferencias entre tratamientos. Los tratamientos con literales diferentes (abcdefghi) son diferentes estadísticamente ($P < 0.05$). En el presente análisis la interacción entre la concentración del disolvente y el tipo de disolvente utilizado se consideró significativa con un valor de $P < 0.05$.

Las características de polaridad de la acetona permiten la extracción de compuestos poco polares, sin embargo, por este mismo atributo del disolvente es que se ve afectado el poder surfactante de las saponinas, así entonces la acetona al 100% no obtuvo la mayor extracción, y la concentración al 75% de acetona-agua, tuviera las características de polaridad correctas para extraer el tipo de saponinas presentes en *Gliricidia sepium*. Los niveles de menor extracción de flavonoides y saponinas fueron con metanol a distintas concentraciones dada la naturaleza de estas estructuras en función de su polaridad y sustituyentes hidrofílicos.

(Galindo et al., 1989) reportan en un estudio cualitativo que, las concentraciones de saponinas en *Gliricidia sepium* son de bajas a moderadas, factor que no interviene negativamente en la dieta ruminal, coincidiendo con los valores cuantitativos obtenidos en el presente estudio. En concentraciones mayores al 2% en la dieta total, tiene consecuencias antinutricionales, este metabolito se absorbe en las paredes intestinales dificultando la asimilación de los nutrientes. Cuando el alimento proviene de árboles forrajeros con altos niveles de saponinas, el forraje se lava repetidamente con agua para reducir el amargor y mejorar así el sabor del alimento (García, 2004).

Los resultados de flavonoides presentes en las hojas de *Gliricidia sepium* son consistentes con los resultados reportados por (Akharaiyi et al., 2012) donde obtuvieron 0.43 mg/ g BS. Las características fenológicas de la planta empleada para su análisis no son específicas en su investigación, lo que sugiere que podría ser poco variable en esta especie de leguminosa forrajera. Sin embargo, la polaridad y concentración del disolvente demuestran tener una interacción importante en la extracción de metabolitos secundarios poco polares como los flavonoides y saponinas.

8.2.3. Saponinas y flavonoides en *Guazuma ulmifolia* Lam

Los resultados obtenidos tras analizar a las hojas de *Guazuma ulmifolia* Lam se presentan en la Figura 9A y 9B donde se visualiza una cantidad máxima ($p < 0.05$) en la extracción de saponinas con acetona 50%, 8.66 ± 0.004 mg/g BS, y para flavonoides de 1.243 ± 0.001 mg/g BS con acetona al 75%. Por otro lado, la menor

cantidad de saponinas y flavonoides es de $0.195 \pm 0.003 \text{ mg/g BS}$ y $0.16 \pm 0.0210 \text{ mg/g BS}$ respectivamente, en ambos casos se empleó etanol al 100%.

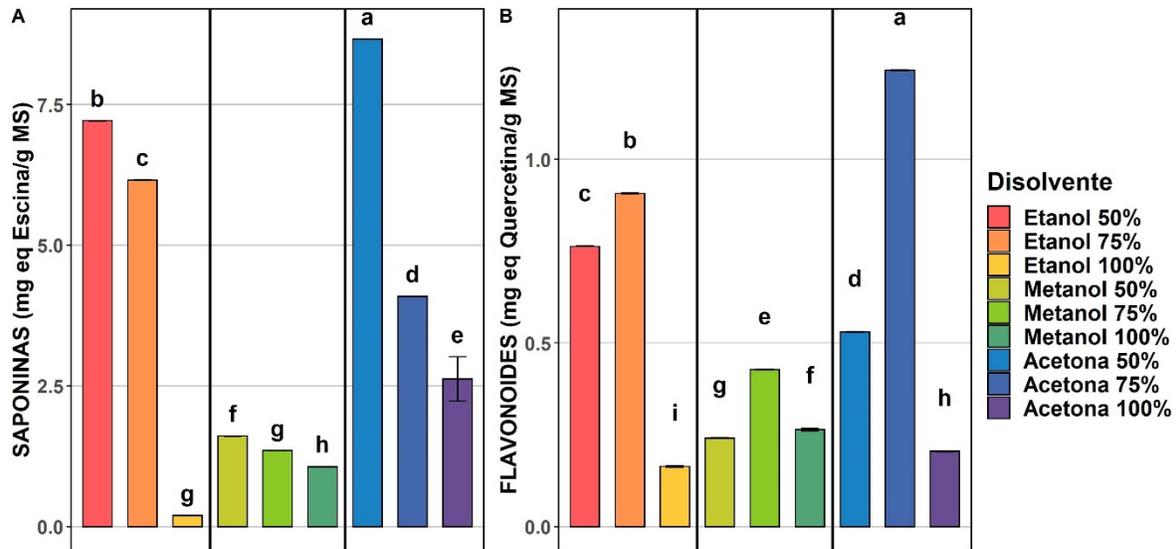


Figura 9. (A) Comparación de la extracción de saponinas y (B) flavonoides por distintos disolventes a distintas concentraciones en la hoja *Guazuma ulmifolia Lam.* El análisis de Tukey muestra las diferencias entre tratamientos. Los tratamientos con literales diferentes (abcdeghi) son diferentes estadísticamente ($P < 0.05$). En el presente análisis la interacción entre la concentración del disolvente y el tipo de disolvente utilizado se consideró significativa con un valor de $P < 0.05$.

El uso de las saponinas como aditivos en rumiantes reduce la degradabilidad ruminal de la proteína del alimento y aumenta el crecimiento microbiano, por lo que aumenta el flujo duodenal de aminoácidos y su disponibilidad para cubrir las necesidades del animal, estos efectos se deben a que las saponinas reducen la población ruminal de protozoos e incrementan la población bacteriana total (Báez Lizarazo, 2014).

Los estudios realizados por Herrera *et al.*, (2008) se centraron en analizar de manera cualitativa la presencia de metabolitos secundarios en 12 especies diferentes de plantas forrajeras en la zona de Quintana Roo, México. Entre ellas *Guazuma ulmifolia Lam.* Y reportan presencia de saponinas. Posteriormente Báez

Lizarazo, (2014), efectuó una serie de pruebas cualitativas en distintas plantas forrajeras para su empleo en ganado bovino en regiones de Colombia, donde reporta presencia de saponinas en un muestra de 3mL de hojas de *Guazuma ulmifolia Lam.* Los valores de saponinas obtenidos durante el presente análisis cuantitativo en *Guazuma ulmifolia Lam.*, son positivos y cuantificables; sin embargo, no hay evidencia comparativa con la literatura, debido a que no hay estudios cuantitativos de este metabolito en la planta.

En el presente estudio la mayor concentración de saponinas se obtuvo cuando se empleó acetona 50%, esto se puede atribuir a que en una disolución donde hay mayor contenido de acetona, las moléculas de agua en ella presentan menor dispersión, lo que disminuye las interacciones polares de la mezcla y las características polares de la acetona se hacen más fuertes (García Moreno, 2016). Debido a este fenómeno es que las extracciones con acetona al 100% no son las adecuadas, así como las muestras con disolventes de mayor polaridad a distintas concentraciones. Aunque no se han encontrado en la literatura análisis del perfil de saponinas presentes en las hojas de *Guazuma ulmifolia Lam.*, se puede intuir que tienen características poco polares por las condiciones de extracción que se presentaron en esta investigación.

Los flavonoides, que poseen un gran número de azúcares, es así que son considerados poco polares, generando una buena interacción con los solventes poco polares. Durante las investigaciones de Gracia Nava, (2009) se identificaron los flavonoides y otros compuestos fenólicos presentes en algunas plantas con potencial uso forrajero, utilizando disolventes polares a altas concentraciones como

el metanol, concluyeron que este proceso es favorable para la extracción de la mayoría de los flavonoides, pero no para antocianidinas y flavonoides de baja polaridad los cuales aparecen en la superficie de las plantas. Dados los resultados podemos intuir que los flavonoides en *Guazuma ulmifolia Lam* podría presentar la misma naturaleza poco polar; No se encontraron reportes cuantitativos que indican niveles precisos de flavonoides en estas hojas.

8.2.4. Saponinas y flavonoides en *Moringa oleifera*

Esta planta ha sido empleada en humanos como anticancerígeno, antioxidante, antiinflamatorio, inmunomodulador, antidiabético, fungicida, antibacterial y hepatoprotectora (Olson & Fahey, 2011). La moringa se puede utilizar como un complemento proteínico o sustituto completo. En las publicaciones de Foidl *et al.*, (1999) indican que el uso de *Moringa oleifera* como forraje fresco para la alimentación de ganado, en experimentos sobre ganado de leche, no se reporta disminución en los volúmenes de leche, en animales que estaban en pastoreo y suplementados con concentrado y posteriormente se pasaron a pastoreo y suplemento de Moringa. No hay problemas de palatabilidad se están realizando programas de análisis de leche. *Moringa oleifera* tiene otros usos como floculante natural, energético, fuente de materia prima de celulosa y de hormonas reguladoras de crecimiento vegetal.

En la Figura 10A y B, se presentan la concentración de saponinas y flavonoides de las hojas de *Moringa oleifera*. La mejor extracción se logró con el disolvente poco polar acetona al 100% en ambos metabolitos, obteniendo valores ($p < 0.05$) de 6.895 ± 0.0149 mg/g BS para saponinas y 1.124 ± 0.0015 mg/g BS para flavonoides;

El menor nivel de saponinas y flavonoides es de 0.187 ± 0.0030 mg/g BS y 0.16 ± 0.0017 mg/g BS respectivamente, ambos valores obtenidos con acetona 50%.

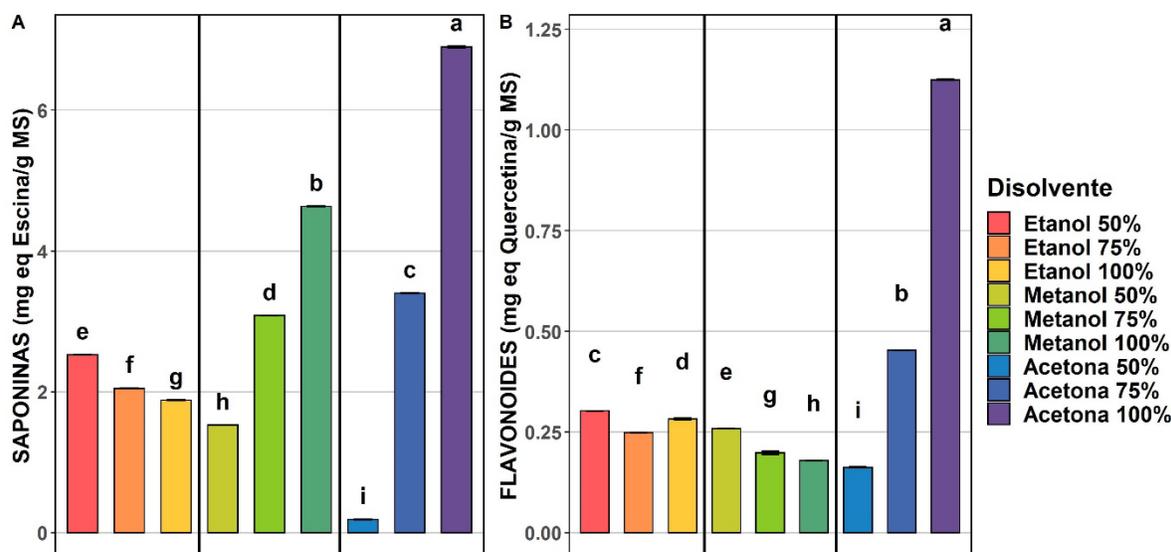


Figura 10. (A) Comparación de la extracción de saponinas y (B) flavonoides por distintos disolventes a distintas concentraciones en la hoja *Moringa oleifera*.

El análisis de Tukey muestra las diferencias entre tratamientos. Los tratamientos con literales diferentes (abcdeghi) son diferentes estadísticamente ($P < 0.05$). En el presente análisis la interacción entre la concentración del disolvente y el tipo de disolvente utilizado se consideró significativa con un valor de $P < 0.05$.

Foidl *et al.*, (2001) reportaron varios grupos de factores antinutricionales, entre ellos, un 1.2-3% de saponinas. Existe una variabilidad de producción de metabolitos secundarios en las hojas de moringa relacionada con factores fitogenéticos, estacionales, edad y altura de la planta (Foidl *et al.*, 1999). De esta manera, no se han reportado estudios cuantitativos donde indiquen valores cercanos a los obtenidos en esta investigación, lo que podría indicar una dependencia de los niveles de saponinas en el nivel de crecimiento y desarrollo de la planta al ser cosechadas. Sin embargo, se han encontrado reportes cualitativos donde indican que las saponinas presentes en las hojas de moringa parecen no tener actividad

hemolítica, es decir, su estructura no representa acción hemolítica, pudiendo presentarse saponinas con carácter bidesmosídico; por lo tanto, los seres humanos no son afectados por estas; sin embargo, a altas concentraciones en la dieta ruminal, se ve un efecto negativo en la absorción de nutrientes (Foidl et al., 1999)

Cabrera-Carrión *et al.*, (2017) desarrollaron una investigación donde encontraron que la presencia de flavonoides varía dependiendo de la edad y altura de la planta en un intervalo de 2.83-34.85 mg/g, donde emplearon distintas técnicas de extracción y cuantificación. Durante el presente desarrollo experimental se obtuvieron valores de flavonoides que discrepan con el intervalo reportado; no obstante, se ha logrado comprobar que la concentración de este metabolito secundario tiene variaciones significativas, debido a que los flavonoides se sintetizan cuando las plantas están en condiciones adversas, entre ellas, el ataque por herbívoros, microorganismos y la presencia de diferentes especies que compiten por luz, agua y nutrientes (Granados-Sánchez et al., 2008). Es necesario implementar y estandarizar protocolos de corte, riego, incluso los métodos de extracción y cuantificación para lograr obtener la concentración adecuada de este metabolito secundario en plantas.

9. CONCLUSIÓN

- La composición química y estructural de las plantas afecta directamente en la cuantificación y extracción de saponinas y flavonoides
- Las concentraciones de saponinas y flavonoides son distintas ($p < 0.005$) para cada especie analizada en esta investigación
- El efecto de la interacción entre factores, la concentración de disolvente y el tipo de disolvente fue estadísticamente significativo ($p < 0.005$)
- Metanol al 100% fue el disolvente y la concentración con mejores resultados ($p < 0.005$) para extraer y cuantificar los metabolitos secundarios presentes en *Leucaena leucocephala*.
- Acetona al 75% fue el disolvente y la concentración con mejores resultados ($p < 0.005$) para extraer y cuantificar los metabolitos secundarios presentes en *Gliricidia sepium*.
- Acetona 50% fue el disolvente y la concentración con mejores resultados ($p < 0.005$) para extraer las saponinas presentes en *Guazuma ulmifolia Lam*, mientras que acetona 75% fue el disolvente y la concentración con mejores resultados ($p < 0.005$) para extraer los flavonoides de la misma especie.
- Acetona 100 % fue el disolvente y la concentración con mejores resultados ($p < 0.005$) para extraer y cuantificar los metabolitos secundarios de *Moringa oleifera*.

- Hasta donde sabemos, los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Guazuma ulmifolia Lam.*, no han sido previamente cuantificados. Los datos obtenidos en la presente investigación, sugieren que los flavonoides, al igual que las saponinas, son moléculas de mediana polaridad y que pueden presentar diferencias estructurales a nivel molecular.

10. PERSPECTIVA

Durante el análisis derivado de los resultados de este estudio se encuentran varios puntos que es necesario resaltar, dado la naturaleza del procedimiento experimental y las especies de plantas forrajeras aquí analizadas, es un trabajo de investigación que contiene los primeros resultados cuantitativos del perfil de MS en algunas especies, como *Guazuma ulmifolia Lam.* De esta manera se expande el panorama para el estudio de MS en esta y muchas más especies vegetales con capacidad de producción de MS funcionales, así como los sectores de aplicación de estas moléculas.

Los resultados del análisis de las especies de plantas usadas aquí demuestran que aún falta estandarizar aquellos factores que en este estudio se dan por hecho, tales como los estados fenológicos, que se ha demostrado que influyen directamente en la concentración de MS, así como algunos factores extrínsecos a la planta, como el clima y territorio de cosecha. Así como también es necesario estandarizar los procesos y metodologías de extracción, tomando como referencia el estudio aquí presentado donde encontramos la interacción mejor interacción entre disolvente y concentración aplicada para cada hoja (bajo las condiciones aquí presentadas).

De manera particular, es necesario el estudio de perfil de carbohidratos presentes en cada planta, particularmente en *Leucaena leucocephala*, ya que son moléculas que podrían intervenir en la metodología de cuantificación.

Se recomienda hacer un perfil fenólico, para poder discernir todos los fenoles presentes en las plantas, en el caso particular de *Guazuma ulmifolia Lam.* Se ha perfilado la posibilidad de contener fenoles variados.

Es importante cuantificar las concentraciones de metabolitos secundarios, para poder comparar las diferencias entre estados fenológicos.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Akharaiyi, F., Boboye, B., & Adetuyi, F. (2012). Antibacterial, phytochemical and antioxidant activities of the leaf extracts of *Gliricidia sepium* and *Spathodea campanulata*. *World Applied Sciences Journal*, 16(4), 523-530.
2. Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M., & Gilani, A. H. (2007). *Moringa oleifera*: A food plant with multiple medicinal uses. *Phytotherapy Research*, 21(1), 17-25. <https://doi.org/10.1002/ptr.2023>
3. Araque, C., Quijada, T., D Aubeterre, R., Páez, L., Sánchez, A., & Espinoza, F. (2006). Bromatología del mataratón (*Gliricidia sepium*) a diferentes edades de corte en Urachiche, estado Yaracuy, Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 24(4), 393-399.
4. Báez Lizarazo, Q. (2014). *Caracterización nutricional y antinutricional de las especies forrajeras (Guazuma ulmifolia, Arachis pintoj, Saccharum officinarum, Cynodon plectostachyus, Chusquea tessellata) para la alimentación y nutrición en explotaciones bovinas en el municipio de Nimaima Cundinamarca.*
5. Bossa, J., Adams, J., Shannon, D., & Mullins, G. (2005). Phosphorus and potassium release pattern from leucaena leaves in three environments of Haiti. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 73(1), 25-35.
6. Böttger, S., & Melzig, M. F. (2011). Triterpenoid saponins of the Caryophyllaceae and Illecebraceae family. *Phytochemistry Letters*, 4(2), 59-68.

7. Brewbaker, J. L., MacDicken, K., Withington, D., & Nitrogen Fixing Tree Association. (1985). *Leucaena: Forage production and use*.
8. Brisibe, E. A., Umoren, U. E., Brisibe, F., Magalhães, P. M., Ferreira, J. F., Luthria, D., Wu, X., & Prior, R. L. (2009). Nutritional characterisation and antioxidant capacity of different tissues of *Artemisia annua* L. *Food chemistry*, 115(4), 1240-1246.
9. Bugarín, J., Lemus, C., Sangines, L., Aguirre, J., Ramos, A., Soca, M., & Arece, J. (2009). Evaluación de dos especies de *Leucaena*, asociadas a *Brachiaria brizantha* y *Clitoria ternatea* en un sistema silvopastoril de Nayarit, México: II. Producción y composición bromatológica de la biomasa. *Pastos y Forrajes*, 32(4), 1-1.
10. Cabrera-Carrión, J. L., Jaramillo-Jaramillo, C., Dután-Torres, F., Cun-Carrión, J., García, P. A., & Rojas de Astudillo, L. (2017). Variación del contenido de alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos en *Moringa oleifera* Lam. En función de su edad y altura. *Bioagro*, 29(1), 53-60.
11. Chumark, P., Khunawat, P., Sanvarinda, Y., Phornchirasilp, S., Morales, N. P., Phivthong-Ngam, L., Ratanachamnong, P., Srisawat, S., & Klai-upsorn, S. P. (2008). The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. Leaves. *Journal of ethnopharmacology*, 116(3), 439-446.
12. Clavero, T., Obando, O., & Van Praag, R. (1996). Efecto de la suplementación con *Gliricidia sepium* en vacas lecheras en producción. *Pastos y Forrajes*, 19(1).

13. Cruz Carrillo, A., & Lizarazo Cely, C. S. (2016). Efeitos da inclusão de dietas ricas em flavonoides sobre a qualidade do leite bovino. *Revista de Medicina Veterinaria*, 31, 137-150.
14. Dago Dueñas, Y., Milian Domínguez, J. C., Calzadilla Reyes, K., Redonet Miranda, M. de los Á., López Quintana, Y., & Hernández Guanche, L. (2020). Uso potencial de *Leucaena leucocephala* Lam.(leucaena) presente en sistemas agroforestales de Pinar del Río. *Revista Cubana de Ciencias Forestales*, 8(1), 154-162.
15. Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y.-H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of food and drug analysis*, 22(3), 296-302.
16. Du, M., Guo, S., Zhang, J., Hu, L., & Li, M. (2018). Quantitative analysis method of the tea saponin. *Open Journal of Forestry*, 8(01), 61.
17. Fahey, J. W. (2005). *Moringa oleifera*: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. *Trees for life Journal*, 1(5), 1-15.
18. Feldsine, P., Abeyta, C., & Andrews, W. H. (2002). AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. *Journal of AOAC international*, 85(5), 1187-1200.

19. Flores, J., Martínez, C., Olvera, M., Galván, R., & Chávez, C. (1988). Potencial de algunas leguminosas de la Flora Yucatenense como alimento humano o animal. *Turrialba Volumen 38, número 2 (abril-junio 1988), páginas 159-162.*
20. Foidl, N., Makkar, H., & Becker, K. (2001). The potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses. *What development potential for Moringa products, 20.*
21. Foidl, N., Mayorga, L., Vásquez, W., Murqueitio, E., Osorio, H., Sanchez, M., & Speedy, A. (1999). Utilización del marango (*Moringa oleifera*) como forraje fresco para ganado. *FAO animal production and health paper, 341-350.*
22. Folkard, G., & Sutherland, J. (1996). *Moringa oleifera* un árbol con enormes potencialidades. *Agroforestry today, 8(3), 5-8.*
23. Francis, J. K., Lowe, C. A., & Trabanino, S. (2000). *Bioecología de árboles nativos y exóticos de Puerto Rico y las Indias Occidentales.* US Department of Agriculture, Forest Service, International Institute of Tropical Forestry.
24. Galicia-Jiménez, M. M., Sandoval-Castro, C., Rojas-Herrera, R., & Magaña-Sevilla, H. (2011). Quimiotaxis bacteriana y flavonoides: Perspectivas para el uso de probióticos. *Tropical and subtropical agroecosystems, 14(3), 891-900.*
25. Galindo, W. F., Rosales, M., Murgueitio, E., & Larrahondo, J. (1989). Sustancias antinutricionales en las hojas de Guamo, Nacedero y Matarratón. *Livestock research for rural development, 1(1), 36-47.*

26. Garavito, U. (2008). Moringa oleifera, alimento ecológico para ganado vacuno, porcino, equino, aves y peces, para alimentación humana, también para producción de etanol y biodiesel. *Recuperado el, 18*.
27. García, D. (2004). Principales factores antinutricionales de las leguminosas forrajeras y sus formas de cuantificación. *Pastos y forrajes, 27(2)*.
28. García Moreno, A. (2016). *Efecto del disolvente en mezclas de acetona-agua para la hidrólisis biomimética de un sustrato modelo del ARN*.
29. González, M. L., Sáez, S. J. M., Olivera, R. M. P., & Pérez, C. E. G. (2012). Indicadores de la composición química y digestibilidad in vitro de 14 forrajes tropicales. *Revista de Producción Animal, 24(1)*.
30. Gracia Nava, M. A. (2009). Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. *Universidad Autónoma de Querétaro. Rev Acad, 1, 1-4*.
31. Granados-Sánchez, D., Ruíz-Puga, P., & Barrera-Escorcia, H. (2008). Ecología de la herbivoría. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente, 14(1), 51-63*.
32. Grether, R. (2006). *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: Mimosaceae Tribu Mimoseae*. Unam.
33. Grosso, G. S., Carvajal, I. L. C., & Principal, J. (2007). *Flavonoid profile and oxidation indexes for some Colombian propolis*.
34. Herrera, M. A. L., Lorca, J. A. R., Reyes, L. O., Mex, J. G. E., Magaña, M. Á. M., García, J. R. S., & Vázquez, Á. C. S. (2008). Contenido nutritivo y factores

- antinutricionales de plantas nativas forrajeras del norte de Quintana Roo. *Técnica Pecuaria en México*, 46(2), 205-215.
35. Hess, H.-D., Kreuzer, M., Diaz, T., Lascano, C. E., Carulla, J. E., Soliva, C. R., & Machmüller, A. (2003). Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Animal feed science and technology*, 109(1-4), 79-94.
36. Janzen, D., & Janzen, D. (1983). Guazuma ulmifolia (guácimo, guácima, caulote, tapaculo). *Costa Rican Natural History. University of Chicago Press (Chicago, IL)*, 246-248.
37. Kojima, K., Zhu, X.-B., & Ogihara, Y. (1998). Saponins from *Gliricidia sepium*. *Phytochemistry*, 48(5), 885-888.
38. Kumar, N. S., & Gurunani, S. G. (2019). Guazuma ulmifolia LAM: A review for future View. *J. Med. Plants Stud*, 7, 205-210.
39. Leguizamón, L., Pérez, C., & Vega, M. L. R. (2010). Utilización de *Leucaena leucocephala* en el levante de ovinos africanos en el Piedemonte Llanero, Colombia. *Revista Sistemas de Producción Agroecológicos*, 1(1), 14-31.
40. López Luengo, M. T. (2001). Saponósidos. *Offarm*, 20(6), 124-129.
41. Makkar, H. P. (2003). *Quantification of tannins in tree and shrub foliage: A laboratory manual*. Springer Science & Business Media.
42. Makkar, H. P., Sánchez, M., & Speedy, A. W. (2007). *Feed supplementation blocks: Urea-molasses multinutrient blocks: Simple and effective feed*

supplement technology for ruminant agriculture (Número 164). Food & Agriculture Org.

43. Martínez, M. M., Cruz, A. R., Bueno, A. L., Romero, L. A. M., Bravo, M. H., & Gómez, M. U. (2016). Composición nutricional de leucaena asociada con pasto estrella en la Huasteca Potosina de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 16, 3343-3355.
44. Olson, M. E., & Fahey, J. W. (2011). Moringa oleifera: Un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Revista mexicana de biodiversidad*, 82(4), 1071-1082.
45. Parrotta, J. A. (1992). *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.
46. Patra, A. K., & Saxena, J. (2010). A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71(11-12), 1198-1222.
47. Pérez, A., Sánchez, T., Armengol, N., & Reyes, F. (2010). Características y potencialidades de Moringa oleifera, Lamark: Una alternativa para la alimentación animal. *Pastos y forrajes*, 33(4), 1-1.
48. Pérez Trueba, G. (2003). Los flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 22(1), 0-0.
49. Rubio, E. E. S., Rodríguez, D. P., Reyes, L. O., & Buenfil, G. Z. (2004). Evaluación del potencial forrajero de árboles y arbustos tropicales para la alimentación de ovinos. *Técnica Pecuaria en México*, 42(2), 129-144.

50. Salazar, R., & Quesada, M. (1987). Provenance variation in *Guazuma ulmifolia* L. in Costa Rica. *The Commonwealth Forestry Review*, 317-324.
51. Santiago Figueroa, I., Lara Bueno, A., Miranda Romero, L. A., Huerta Bravo, M., Krishnamurthy, L., & Muñoz-González, J. C. (2016). Composición química y mineral de leucaena asociada con pasto estrella durante la estación de lluvias. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(SPE16), 3173-3183.
52. Semmar, N., Nouira, S., & Farman, M. (2011). VARIABILITY AND ECOLOGICAL SIGNIFICANCES OF SECONDARY METABOLITES IN TERRESTRIAL BIOSYSTEMS. *Environmental Research Journal*, 5.
53. Sosa, V., & Gómez-Pompa, A. (1994). *Lista florística. Flora de Veracruz-Fascículo 82*.
54. Tan, H., Sieo, C., Abdullah, N., Liang, J., Huang, X., & Ho, Y. (2011). Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa in vitro. *Animal feed science and technology*, 169(3-4), 185-193.
55. Thakur, M., Melzig, M. F., Fuchs, H., & Weng, A. (2011). Chemistry and pharmacology of saponins: Special focus on cytotoxic properties. *Botanics: targets and therapy*, 1, 19-29.
56. Urbano, D., Dávila, C., & Moreno, P. (2006). Efecto de las leguminosas arbóreas y la suplementación con concentrado sobre la producción de leche y cambio de peso en vacas doble propósito. *Zootecnia tropical*, 24(1), 69-83.

57. Ushida, K., Tokura, M., Takenaka, A., & Itabashi, H. (1997). Ciliate protozoa and ruminal methanogenesis. *Rumen microbes and digestive physiology in ruminants.*, 209-220.
58. Vargas, H., & Elvira, P. (1994). Composición química, digestibilidad y consumo de Leucaena (*Leucaena leucocephala*), madre cacao (*Gliricidia sepium*) y caulote (*Guazuma ulmifolia*). *Arboles y arbustos forrajeros en América Central.* (Ed. JE Benavides). CATIE. Turrialba, Costa Rica, 1, 393.
59. Vásquez, H., & Quintero, F. (1995). Efecto del diámetro de las estacas de matarratón (*Gliricidia sepium*) sobre el crecimiento de ramas laterales. *Zootecnia Tropical*, 13(1), 113-123.
60. Verdecia, D., Herrera, H., Ramírez, J., Leonard, I., Álvarez, Y., Bazán, Y., Arceo, Y., Bodas, R., Andrés, S., & Álvarez, J. (2012). *Valor nutritivo de Leucaena leucocephala, con énfasis en el contenido de metabolitos secundarios.*
61. Verma, A. R., Vijayakumar, M., Mathela, C. S., & Rao, C. V. (2009). In vitro and in vivo antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 47(9), 2196-2201.
62. Villa-Herrera, A., Nava-Tablada, M. E., López-Ortiz, S., Vargas-López, S., Ortega-Jimenez, E., & López, F.-G. (2009). Utilización del guácimo (*Guazuma ulmifolia* Lam.) como fuente de forraje en la ganadería bovina extensiva del trópico mexicano. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(2), 253-261.

63. Vollink, P. (1993). Comparación de dos dietas con base en forrajes verdes, *Gliricidia sepium* Vs *Tricantera gigantea* en el crecimiento de cabretonas. *CLEM, Tuluá*.
64. Zárate, P. (1994). Revision of the genus *Leucaena* in Mexico. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica*, 65(2), 83-162.
65. Zárate, R. (1987). *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, subsp. *Glabrata*. *Phytologia*, 63(4), 304-306.