

Evaluación de los ácidos grasos y metabolitos secundarios mediante cromatografía en capa fina y tamizaje fitoquímico de la planta del Grifo Negro (*M. bicuspidum*)

Katy Maldonado
Beatriz Soledad

Universidad Católica Andrés Bello

Resumen

Se estudiaron los metabolitos primarios y secundarios del *M. bicuspidum*, utilizando la técnica de tamizaje fitoquímico y sus pruebas rápidas. Se encontró la presencia de ácidos grasos, mezclas de fito esterol y alcoholes superiores. El estudio también confirmó la presencia de metabolitos secundarios como saponinas, cumarinas, esteroides y taninos. Se observó la presencia de metabolitos bioactivos como esteroides, taninos y flavonoides.

Palabras Claves: Ácidos grasos, Metabolitos secundarios, *M. bicuspidum*

Evaluation of fatty acids and secondary metabolites using thin layer chromatography and phytochemical screening of the black griffon plant (*M. bicuspidum*)

Abstract

Primary and secondary metabolites of *M. bicuspidum* were studied using the phytochemical screening technique and its rapid tests. The presence of fatty acids, phytosterol mixtures and higher alcohols was found. The study also confirmed the presence of secondary metabolites such as saponins, coumarins, steroids and tannins. The presence of bioactive metabolites such as steroids, tannins and flavonoids will be observed.

Keywords: Fatty acids, Secondary metabolites, *M. bicuspidum*

1.-Introducción

Las plantas han desarrollado estrategias de defensa contra el estrés biológico y abiótico, enfocándose en la producción de metabolitos secundarios (Inga, 2020). Estas sustancias secundarias son sustancias orgánicas producidas por el cuerpo y no están relacionadas directamente con el crecimiento o la reproducción. Las plantas tienen dos tipos de metabolismo: el metabolismo primario, donde los metabolitos primarios participan directamente en el crecimiento, desarrollo y reproducción, y el metabolismo secundario, que juega un papel crucial en la adaptación al estrés ambiental y la defensa contra depredadores y patógenos (Roussos y Perraud, 1996).

Los metabolitos secundarios están relacionados con la defensa química y el daño causado por herbicidas o ataques de patógenos. Los alcaloides y terpenoides liberan e involucran a los organismos, eliminándolos y limitando su difusión al resto de la planta. Las plantas producen enzimas que destruyen las paredes celulares de los microorganismos e inhiben los procesos de toxicidad, creando paredes vegetales más resistentes y difíciles de digerir (Sepúlveda, Torres, Sandoval, Martínez y Chan (2018), Hernández (2004)).

Los nutrientes son esenciales para los organismos vivos, que requieren energía a través del consumo de alimentos. La hierba en los alimentos funciona como fuente de energía, aportando ácidos grasos vitales, atributos organolépticos, sabor y textura (Archile, Benítez, Rangel, Izquierdo, Huerta y Márquez 1997). Si se enfoca en los animales de ganado o aves domésticas, por ejemplo, es evidente que requieren una dieta que les suministre los nutrientes esenciales para su crecimiento. En numerosas ocasiones, los criadores de ganado recurren a fuentes alternativas de alimentos como las plantas forrajeras para proporcionar a sus animales estos nutrientes. Esto se debe a que muchas de estas, en combinación con la dieta comercial para aves, pueden ser un excelente complemento para la cría de ganado o para las aves domésticas, tal como sucede con los pollos de engorde (Soledad y Adames, 2004).

Existen numerosas investigaciones llevadas a cabo para valorar diversas plantas desde una perspectiva nutricional. Por ejemplo, en México, Aguilera, R., Arroyo, A., López, J., Ávila, E. (1984), utilizaron la harina de yuca (*Manihot esculenta*, Crantz) como proveedora de proteínas en pollos de engorde, mientras que, en Venezuela, Bertsch, Álvarez y Coello (2003) llevaron a cabo la evaluación de la harina de plumas fermentadas por *Kocuria rosea* como fuente alternativa de proteínas en la dieta de las aves. Además, Trómpiz, Ventura, Esparza, Del Villar y Aguirre (2000) investigaron el uso de la harina de hoja de yuca (*Manihot esculenta*, Crantz) en cerdos en desarrollo. Soledad y Adames (2004), mediante la observación, demostraron que los agricultores de la zona del pueblo de Yare, en las proximidades de los Valles del Tuy, Miranda, alimentaban a sus aves domésticas con la planta del Grifo Negro (*Macrolobium*

bicuspidum). Encontraron que las hojas poseen un contenido proteico cercano al 20% en su estado seco. La especie *M. bicuspidum* representa una opción lucrativa para nutrir a los animales durante la estación seca, ya que la planta es abundante a lo largo de todo el año, crece en zonas áridas y posee un alto rendimiento de materia seca por hectárea (Soledad y Adames, 2015).

Numerosas investigaciones sobre la planta *M. bicuspidum*, incluyendo análisis químicos, digestibilidad in vitro, contenido de minerales y proteínas, se requieren investigaciones en aspectos particulares, como estudiar los metabolitos primarios y secundarios de la planta. Estos metabolitos pueden actuar en otros procesos biológicos, regular nemátodos, inhibir enzimas en la generación de sustancias inflamatorias, y tener actividad anticancerígena y antioxidante. Por lo expuesto anteriormente, este trabajo se plantea como objetivo evaluar los ácidos grasos y los metabolitos secundarios mediante Cromatografía en Capa Fina y tamizaje fitoquímico de la planta del grifo negro (*M. bicuspidum*).

2.-Metodología

El enfoque metodológico fue de tipo cuantitativo, puesto que se buscó la obtención de los análisis proximales de la planta *M. bicuspidum* y de tipo cualitativo, ya que se utilizó la técnica de tamizaje fitoquímico y sus pruebas rápidas para la evaluación de la presencia de metabolitos secundarios en la planta previamente mencionada. El trabajo fue realizado en la Universidad Católica Andrés Bello, ubicada en Caracas, Distrito Capital, Venezuela.

Población y Muestra

Las muestras de plantas se obtuvieron en los Valles del Tuy, Miranda, y se llevó todo el equipo necesario en un día para retirar los tallos en el laboratorio. Los mesones se cubrieron con papel absorbente y todas las muestras de *M. bicuspidum* recolectadas se colocaron encima para comenzar el proceso de remoción de la humedad. Las muestras se dejaron durante seis días para que perdieran la humedad de forma natural. Luego, se colocaron en una estufa a temperatura constante de 110 °C para así asegurar que solo quedó la hoja con un bajo contenido de humedad, y se preparó para su almacenamiento en la nevera.

Técnicas y Procedimiento

Las hojas de la especie de *M. bicuspidum* fueron evaluadas para conocer su contenido de humedad, cenizas, extracto etéreo y cenizas. Haciendo uso del extracto etéreo (EE) se evaluaron los posibles ácidos grasos contenidos en las hojas de la especie de *M. bicuspidum*. Por último, se utilizaron técnicas de maceración y la obtención del extracto metanólico (EM) para luego efectuar las pruebas rápidas de taninos, esteroides, flavonoides, saponinas, cumarinas y fenoles.

Materiales y Reactivos

Material vegetal

Las hojas de la especie *M. bicuspidum*, se sometieron al proceso de eliminación de humedad y después de su secado en estufa a temperatura constante de 110°C, fueron trituradas y almacenadas en bolsas herméticas hasta su uso.

Los materiales, equipos e instrumentos que fueron utilizados para realizar los distintos análisis de la parte experimental fueron Estufa, Mufla, Balanza analítica, Láminas de sílica gel, Lámpara UV, Equipo Soxhlet para la extracción de grasas. Los reactivos utilizados fueron de grado analítico (hexano, éter dietílico, ácido acético, metanol, éter de petróleo, benceno, ferrocianuro de potasio, cloruro férrico e hidróxido de sodio).

a) Análisis bromatológico de las hojas de *M. bicuspidum*

Los análisis de humedad, proteína, extracto etéreo y cenizas fueron realizados mediante la normativa de la AOAC (1990). El método Soxhlet (COVENIN 1785-81) consiste en extraer las grasas de la muestra deseada haciendo uso de un solvente (éter de petróleo o éter etílico). El solvente es eliminado por evaporación, el residuo se seca y se determina la masa del mismo.

b) Metabolitos primarios

Cromatografía en capa fina (TLC)

Haciendo uso del extracto etéreo, se realizaron los ensayos por Cromatografía en Capa Fina (TLC) para la obtención de los R_f y se compararon con resultados reportados en la bibliografía para evaluar los ácidos grasos presentes en la hoja del *M. bicuspidum*.

Con una pipeta, se colocó una pequeña cantidad de la muestra (extracto etéreo) en una placa de sílica gel a 7-10 mm del borde inferior. La placa de TLC se colocó dentro de una cámara cromatográfica, a la que previamente se añadió la mezcla de disolventes. La cubeta se tapó y se dejó que la mezcla de disolventes ascendiera por la placa de TLC por capilaridad, hasta la línea de borde. La placa se sacó de la cámara y se esperó la evaporación del disolvente. La placa se reveló en una cámara con vapores de yodo y se observó bajo luz UV. Se anotaron los valores de R_f.

Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico, o marcha fitoquímica, se realizó a través de la técnica de maceración y se obtuvo un extracto metanólico, pulverizando parte de la muestra de hojas y almacenando en la nevera hasta su uso según Cannell (1998).

Maceración

Se tomaron 3 g de la muestra previamente pulverizada para luego adicionar 30 mL de metanol y homogeneizar. La mezcla se agitó y se filtró el sobrenadante y se colocó en el embudo para la separación, para la obtención de la fase metanólica, se captó en un matraz, se tapó y se almacenó. Cannell (1998).

Extracto metanólico

Al sedimento de la muestra metanólica contenida en el matraz se le añadieron 30 mL de metanol, y se repitió el proceso descrito anteriormente. Posteriormente, el residuo se suspendió en 10 mL de metanol para evaluar los posibles metabolitos secundarios (flavonoides, saponinas, cumarinas, esteroides, taninos) de dicha planta.

En este trabajo se empleó la extracción Soxhlet, utilizando éter de petróleo y etanol para obtener el extracto etéreo y etanólico, respectivamente, siguiendo el protocolo descrito por Cannell (1998).

c) Pruebas rápidas para identificación de metabolitos secundarios

Identificación de taninos

Se colocaron aproximadamente 3,5 g de muestra seca de la hoja de *M. bicuspidum* en un matraz. Se añadieron 100 mL de ferrocianuro de potasio $K_4(Fe(CN)_6)$ a una concentración de 0,004 M, en ausencia de luz y se utilizó un agitador magnético durante 1 hora. Transcurrido el tiempo señalado se adicionaron 10 mL de cloruro férrico $FeCl_3$. (Sánchez Y., Rondón L., Hermosilla R., Almeida S., 2010). Se consideró un resultado positivo el obtener un color verde oscuro correspondiente a taninos condensados o un color azul correspondiente a los taninos hidrolizables.

Identificación de esteroides

Usando el extracto etéreo previamente obtenido, se utilizó 1 mL de éste y se colocó en un crisol. Se dejó reposar hasta que la volatilización del solvente. Luego, se añadió de 4-5 gotas de cloroformo al crisol, se mezcló bien y se repartió mediante goteo (de 2 a 3 gotas de la mezcla) a 4 tubos de vidrio con tapa. Con la mezcla repartida en los tubos, se agregó 2 gotas de anhídrido acético a solo 3 de los tubos. Se taparon los tubos para evitar la evaporación de los solventes y bajo campana, se destaparon de forma rápida y cuidadosa se tomaron los 3 tubos que contenían el anhídrido acético para agregar una gota de ácido sulfúrico con pipeta Pasteur. Ibarra, G., Gutiérrez, M., Robles, M. (2017) Con respecto a los resultados, se considera positivo si la observada es azul-verde (esteroides) rojo, rosa o violeta (triterpenos), o bien amarillo pálido (esteroides o triterpenos saturados).

Identificación de flavonoides mediante cromatografía en capa fina (TLC)

Los flavonoides se realizaron por la identificación usando cromatografía en capa fina (TLC). El extracto metanólico fue colocado en las placas de sílica gel con la ayuda de un capilar, de 3 a 4 gotas, se dejó secar, para luego introducir la placa en una cámara cromatográfica. Para la fase móvil, los disolventes usados fueron acetato de etilo: ácido acético glacial: agua (100:11:11:27 v/v). Bajo la luz UV se observaron a 365 nm. El control positivo a utilizar es el control de quercetina descrito en el trabajo de Ibarra et al. (2017).

Identificación de fenoles mediante cromatografía en capa fina (TLC)

Con el extracto metanólico, y en placas de TLC, la fase móvil fue éter de petróleo: acetato de etilo: ácido fórmico (40:60:1 v/v), la cual se dejó reposar por 30 min para saturación de gases. La placa se retiró cuando, por capilaridad, el eluyente llegó al tope de la placa. Se dejó secar por 5 min, fue llevada a luz UV a longitud de onda 365nm. Se utilizó el control positivo de ácido gálico descrito en el trabajo de Ibarra et al. (2017) para finalmente, obtener el factor de retención (R_f = distancia solvente/distancia muestra).

Identificación de fenoles, prueba colorimétrica (Folin-Ciocalteu)

A partir de los extractos de hoja, con la ayuda de una pipeta Pasteur se colocaron 3-4 gotas en el fondo de 5 tubos Eppendorf (2 mL) rotulados del 0-4. Se agregaron 2 gotas de agua destilada y se añadieron gotas de cloruro férrico ($FeCl_3$) al 10% de la siguiente manera: al tubo 0 no se le añadió $FeCl_3$, al tubo 1 se le agregó una gota, al tubo 2 solo dos gotas, y así sucesivamente. Se homogeneizaron los tubos y se observó la coloración para la posterior interpretación de resultados. Se utilizó el tubo 0 como muestra control negativo y ácido gálico en concentración 1 mg/mL como muestra control positivo. Ibarra et al. (2017).

Identificación de saponinas

Se utilizó el método de la espuma. Se diluyó el extracto (9 mL de agua destilada más 1 mL de extracto metanólico). Se homogeneizó lo suficiente sin formar espuma y se filtró la disolución con papel filtro. Se tomó 1 mL de la mezcla y se pasó a un tubo de ensayo con tapa, y luego se adicionaron 9 mL de H_2O destilada. Una vez pasado al tubo de ensayo, se agitó vigorosamente durante 30 s, con la mano. Se dejó reposar 15 min. Luego del tiempo transcurrido se midió la altura de la espuma formada en cada muestra. Ibarra et al. (2017): Altura de espuma 5 mm: (-) se considera negativa, no contiene saponinas. Espuma

5–10 mm: (+) presenta un contenido bajo. Alrededor 10–15 mm: (++) es contenido moderado. Encontrando una altura de 15 mm: (+++) se le atribuye un alto contenido de saponinas.

Identificación de cumarinas

Partiendo del extracto metanólico, se realizó una dilución siguiendo la proporción 9:1 (v/v) anterior. Se distribuyeron 2 mL de dicha dilución en un tubo de vidrio con tapa. En el mismo tubo se colocó una tira de papel filtro previamente empapado de una solución alcalina de NaOH (0.06 g/mL) de tal manera que no tocara el extracto. Posteriormente, se tapó y se llevó a calentar en un mechero Bunsen hasta que se obtuvo el desprendimiento de vapores, cuidando no quemar el papel filtro, ni que se empapara de la solución alcalina al agitarse, evitando así que sufriera proyección, ya que las cumarinas presentes en los extractos se acumularían en el papel de filtro. Después se llevó el papel filtro bajo lámpara UV para observar una posible presencia de cumarinas; si el papel filtro exhibe puntos fluorescentes, la muestra se considera positiva. Ibarra et al. (2017).

3.-Resultados y discusión

a) Análisis bromatológico de las hojas de *M. bicuspidum*

Los resultados del análisis de las hojas de la especie *M. bicuspidum* se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Análisis bromatológico de las hojas de *M. bicuspidum*

Análisis	(%) base húmeda	(%) base seca
Humedad	78.6	-
Cenizas	9.3	-
Extracto etéreo	1.4	-
Proteínas	5.4 *	18.6 *
Fibra	9.8 *	34.3 *

Nota: datos tomados de Soledad y Adames (2015), evaluación biológica de la harina de hojas *M. bicuspidum*.

Soledad y Adames (2015) reportaron que los niveles de proteínas del follaje de hojas de *M. bicuspidum* era de 18,6% y que este porcentaje era similar al reportado en otros follajes que también son utilizados para la alimentación de aves, como por ejemplo las hojas de *Musa paradisiaca* 17,93% y *Moringa oleífera* 19,76%.

MALDONADO Y SOLEDAD

El contenido de fibra en las hojas de *M. bicuspidum* fue de 9,8%, siendo inferior a los reportados para follaje de *Manihot esculenta* Crantz 11,40%. Este valor puede ser beneficioso a la hora de elegir la planta de estudio como alimento alternativo, ya que el contenido alto de fibra podría llegar a limitar la utilización de la planta en animales monogástricos (Soledad y Adames (2015).

Por otra parte, los niveles de humedad son ligeramente menores a los reportados en la soja (*Glicine max*), 10.22% y en la lenteja (*Lens sp.*), 12.83% según lo reportado por Maldonado, S. Sammán, N. (2000). En otros estudios de plantas forrajeras, Oliva, M., Meléndez, J., Maicelo, J., Milla, M., Leiva, S. (2022) reportan que la especie *Philoglossa mimuloides* tiene un valor de humedad del 7,09%, bastante cercano a los valores obtenidos para la especie *M. bicuspidum*.

Los niveles de cenizas en la *M. bicuspidum*, son ligeramente mayores a los niveles reportados en la soja (*Glicine max*), de 6.29%, y muy similares a la planta forrajera *Trifolium repens* (10.52%). Estos niveles, a su vez guardan similitud con los porcentajes obtenidos del pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) (10.75%). (Combatt, E., Jarma, A., Paternina, E., 2015).

Con respecto a las cenizas, Combatt, E. et al (2015), explican en su estudio con dos tipos de plantas forrajeras: pasto braquiaria (*B. decumbens*) y pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) que se obtuvieron resultados de 2.46% y 4.44%, respectivamente. Éstos fueron más bajos a los obtenidos en la planta del presente estudio, *M. bicuspidum* (9.3%). Explican que usualmente, las hojas presentan mayor concentración de minerales que los tallos. Pero al avanzar en estados de madurez, la relación hoja-tallo disminuye, y, por tanto, también disminuye el contenido mineral en las hojas. En el caso del *M. bicuspidum*, es probable que se deba a que las plantas leguminosas presenten mayor contenido de cenizas. Tal como es el caso de las leguminosas campanita morada (*Clitoria ternatea* L.) con niveles de cenizas de 7.43%. Castrejón, F., Corona, L., Rosiles, R., Martínez, P., Lorenzana, A., Arzate, L., Olivos, P., Guzmán, S., García, A., Avilés, J., Valles, B., Castillo, E., Jarillo, J., Durán, E., Flores, G., Paredes, S., Anaya, R., Martínez, R., Hernández, H., ...Carrillo, S. (2017).

El extracto etéreo en el cual se encuentran disueltas las grasas arrojaron un valor de 1,4%. Combatt et al. Señalan que los porcentajes de grasa encontrados en el pasto *B. decumbens* oscila entre el 1,6 y 1,9% los cuales son bastante similares al, *M. bicuspidum*.

b) Metabolitos Primarios

Cromatografía en capa fina (CCF)

Se utilizó esta técnica para la identificación de posibles ácidos grasos que pudieran estar presentes en el extracto etéreo (EE) de las hojas de *M. bicuspidum* (HMB). Se utilizaron dos sistemas de solventes para comprobar cuál tenía mejor separación de bandas, dichos sistemas se presentan a continuación:

Sistema de solventes 1: Hexano/éter dietílico/ácido acético (10:20:20)

Buscando el mejor sistema de solventes para lograr una separación de compuestos en el EE de hojas de *M. bicuspidum* se utilizó un sistema de hexano, éter dietílico y ácido acético (10:20:20 v/v).

Tras realizarse la experiencia en Cromatografía en Capa Fina (CCF) se apreciaron 5 bandas diferenciadas. Estos resultados se compararon los resultados de los estándares de ácidos grasos extraídos del trabajo de López A (2014) y la evaluación se presenta en la tabla 2.

Tabla 2. Comparación de los *Rf* (Estándares de Ácidos Grasos) con los *Rf* Obtenidos del EE de las Hojas de *M. bicuspidum*.

Manchas EE M. bicuspidum, AGs	Estándares AGs	Rf EE M. bicuspidum
Mancha 5		0,97
Mancha 4		0,84
Mancha 3		0,72
Mancha 2		0,62
Mancha 1		0,58
-	Ácido linolénico	0,22
-	Ácido linoléico	0,21
-	Ácido esteárico	0,2
-	Ácido oléico	0,19
-	Ácido palmítico	0,18

Se observa que no hay similitud entre los *Rf* obtenidos para el *M. bicuspidum* y los reportados en la bibliografía.

Sistema 2 y 3: Hexano / acetato de etilo (6:4 v/v) y hexano / acetato de etilo (8:2 v/v)

En la Tabla 3 se presenta la comparación entre los *Rf* del extracto etéreo de las hojas de *M. bicuspidum* con los reportados por Balcinde et al (2005), quienes probaron distintos sistemas de solventes para la obtención de cera de caña, una fuente natural de obtención de fitoesteres, compuestos que forma parte de los esteroides y se encuentran ampliamente distribuidos en animales y plantas utilizando sistemas de solventes hexano/acetato de etilo (6:4 v/v), y hexano/acetato de etilo (8:2 v/v), para evaluar la separación de fitoesteres en el extracto etéreo (EE) de las hojas de *M. bicuspidum*.

Con el sistema de solvente 2: hexano/acetato de etilo (6:4 v/v), se aprecia una sombra que va desde el punto de aplicación de la muestra hasta cierta altura de la placa, sin embargo, no se aprecia ninguna separación en todo el recorrido. Señala Stahl, E (1969), que los fitoesteres pueden migrar

conjuntamente ocasionando una "sombra" a lo largo de la placa. Esto significa que las estructuras no pueden ser diferenciadas en estas condiciones. En el sistema de solvente 3: hexano/acetato de etilo (8:2 v/v), si se observan separaciones a lo largo de la placa cromatográfica. Los R_f obtenidos se van a comparar con los R_f presentados por Balcinde et al (2005) en la tabla 3.

Tabla 3. Comparación entre R_f del Extracto Etéreo de las hojas de *M. bicuspidum* y los Estándares de Ácidos Grasos, Fitoesteroles y Alcoholes Superiores Tomados del Trabajo de Balcinde et al. (2005).

Manchas	R_f EE M. bicuspidum	R_f AGs, FEs, AS	Estándares
Mancha 3	0,75	-	
	-	0,73	Alcoholes superiores
	-	0,67	Mezcla fitoesteroles
Mancha 2	0,62	-	
Mancha 1	0,52	-	
	-	-	
		0,09	Ácidos grasos

Nota: EE (Extracto Etéreo), Ácidos grasos (AGs), Fitoesteroles (FEs), Alcoholes superiores (AS).

El R_f de 0,75 obtenido para el *M. bicuspidum* pudiera corresponder al valor de R_f de 0,73 que usualmente se asocian a alcoholes superiores, también presencia de ceras en plantas. Los alcoholes superiores tienen un rol importante en la estructura y estabilidad de membranas celular, y también en la barrera cuticular de plantas. Además, dichos alcoholes contribuyen a la resistencia ante la deshidratación y protección ante patógenos. (Henschel, M., Nunes, A., Lima, J., Ribeiro, R., Alves, D., Souza, T., Silva, D., 2024)

Por otra parte, el valor del R_f de 0.62 para el *M. bicuspidum*, podría corresponder al valor de R_f de 0,67, que representa una mezcla de fitoesteroles (β -sitoesterol, campesterol y estigmasterol), ya que suelen ser los fitoesteroles más comunes y más encontrados en las plantas. Suelen aparecer en conjunto debido a que su estructura química son bastantes similares. Por dichas similitudes estructurales y químicas, suelen migrar de forma similar en los sistemas de solventes, lo que da como resultados valores de R_f similares.

3) Pruebas Cualitativas en Metabolitos Secundarios: Tamizaje Fitoquímico

Se observa que existe la presencia de metabolitos secundarios en el extracto metanólico de hojas de *M. bicuspidum*. Los resultados y pruebas se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Pruebas Cualitativas para Determinación Fitoquímica de Extracto Metanólico de Hojas de *M. bicuspidum*.

Fitoquímicos	Método	Resultado
Taninos	Colorimétrico	Positivo
Esteroides	Colorimétrico	Positivo
Flavonoides	TLC	Positivo
Fenoles	Colorimétrico	Negativo
Fenoles	TLC	Negativo
Saponinas	Espuma	Positivo
Cumarinas	Fluorescente	Positivo

Taninos

Al añadir el cloruro férrico (FeCl_3), la solución viró a verde, indicando la presencia de taninos condensados (Alcaráz, 2009).

Según Márquez y Suárez (2008), la presencia de taninos en leguminosas forrajeras es usual, y son empleados por las plantas como mecanismo de defensa contra ciertos patógenos y herbívoros. Hay dos tipos de taninos: aquellos que son hidrolizables y los taninos condensados, y dependiendo de la concentración de éstos, se pueden tener efectos tóxicos o benéficos en animales. Una moderada cantidad de taninos condensados, por ejemplo, produce efectos beneficiosos en el metabolismo de las proteínas en rumiantes, puesto que logran reducir la degradación de la dieta proteínica en el rumen, incrementando así la absorción de aminoácidos en el intestino delgado.

Debido a los resultados obtenidos, la presencia de taninos condensados en las hojas de *M. bicuspidum* podría ser un aspecto beneficioso a tener en cuenta; Vázquez, A., Álvarez, E., López, J., Wall, A., De la Rosa, L. (2012) señalan que el impacto positivo o negativo sobre la ingesta de taninos va a depender del tipo de tanino que se ingiera y el tipo de población que lo ingiere.

Esteroides

En la prueba colorimétrica para esteroides (prueba de Lieberman-Burchard), luego de la reacción al agregar el ácido sulfúrico se pudo observar que hubo un viraje de color (azul oscuro – negro). El viraje de color podría ser indicativo de altas concentraciones de esteroides en las muestras de harina de hojas de *M. bicuspidum*.

Los estudios de Nestel, P., Poyser, A., Hood, R., Mills, S., Willis, M., Cook, L., Scott, T. (1978) muestran que los ácidos grasos suplementarios aumentan la absorción de colesterol, en particular en la parte proximal del conducto biliar del hígado. Cuando la dieta se complementa con ácidos grasos, la absorción de colesterol aumenta en el hígado, mientras que la función hepática disminuye. Las hormonas vegetales regulan el crecimiento, el desarrollo y el metabolismo. Saenz, L., Córdova, I., Rodríguez, F. (2006)

Flavonoides

Se obtuvo unas bandas al tope de la placa de TLC, lo que indica una posible presencia de flavonoides en la muestra de extracto metanólico en las hojas de *M. bicuspidum*, con un *R_f* de 0,97. Dicha cifra está muy cercana a la cifra del estándar de quercetina de 0,98 (Ibarra et al. (2017)).

Los flavonoides son compuestos fenólicos que están presentes en las plantas vasculares, verduras, frutas, semillas, hojas, flores, cortezas. Tienen múltiples propiedades, entre ellas propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Es ampliamente encontrado en las leguminosas; la soya (*Glicine max*), alfalfa (*Medicago sativa*), trébol rojo (*Trifolium pratense*) son algunas de las leguminosas utilizadas en la alimentación de bovinos, y en éstas se sabe de la presencia de aproximadamente 26 flavonoides. El tipo de flavonoide que está presente en los vegetales varía dependiendo de la leguminosa. Cruz, A., Lizarazo, C. (2016) señalan en ese sentido, algunos flavonoides presentes en la alfalfa son las isoflavonas y cumestanos, en el trébol rojo hay gran concentración de formononetina y genisteína, también está presente el cumestrol cumetano.

Cruz y Lizarazo (2016) también mencionan que los flavonoides que están presente en los alimentos, son hidrolizados en el rumen e intestino por las glucosidasas bacterianas, lo que hace que la forma glicosilada y la aglicona se separen, y ésta última aunado a los metabolitos producidos se absorben en el íleon e intestino grueso, tanto en rumiantes como en animales monogástricos.

Fenoles

Para el análisis de este compuesto se llevaron a cabo dos técnicas analíticas: prueba colorimétrica y cromatografía en capa fina (CCF) para la evaluación de fenoles en la muestra de hojas de *M. bicuspidum*. En ambos ensayos se encontraron resultados negativos.

Saponinas

Se encontró que la espuma del extracto metanólico de las hojas secas y pulverizadas de *M. bicuspidum* fue de una altura de 5 mm, por lo cual se puede evidenciar que hay un bajo contenido de saponinas. Según Ibarra et al (2017, el hecho de que el extracto posea un bajo contenido de saponinas llega a ser ventajoso, puesto que un alto contenido de éstas es considerado peligroso, por su alta toxicidad.

Triosi et al (2014) encontró que altos niveles de saponinas pueden ser asociados a factores antinutricionales, como la actividad hemolítica y las actividades biológicas, como las antiinflamatorias, anticancerígenas, antifúngicos y antivirales. En la nutrición animal, saponinas pueden jugar un rol negativo o positivo en la alimentación. En el intestino, las saponinas afectan la digestión de proteínas y tienen interacciones con el colesterol, lo que desemboca en una ruptura celular y posterior eliminación de protozoos ruminales, lo que puede aumentar el uso de Nitrógeno y aumentar el rendimiento de los rumiantes.

Kholif (2023) aborda el rol de saponinas en la alimentación animal, actuando como permeabilizadoras, inmunoestimulantes y a nivel rumen, en la fermentación ruminal. Esto afecta la digestión de proteínas en el intestino, ya que tienen interacciones con colesterol, eléctricas y protozoas, lo que puede aumentar el uso de Nitrógeno.

Cumarinas

Se observaron manchas fluorescentes al mirar el papel de filtro bajo la luz UV, indicando la presencia de cumarinas en el extracto metanólico de las hojas de *M. bicuspidum*, lo que podría darle propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas, según señala Álvarez, R., Juárez, M., Bolaños, E., Morales, J. (2015)

4.-Conclusiones

El estudio evaluó el potencial de las hojas de *M. bicuspidum* para la alimentación de rumiantes. El análisis reveló un alto contenido de humedad, cenizas, y bajo extracto etéreo. El bajo contenido de grasas puede limitar su aporte energético. El estudio encontró la presencia de ácidos grasos, mezclas de fetoesterol y alcoholes superiores. El estudio también confirmó la presencia de metabolitos secundarios como saponinas, cumarinas, esteroides y taninos. Se observó la presencia de metabolitos bioactivos como esteroides, taninos y flavonoides.

Referencias

- Álvarez, R., Juárez, M., Bolaños, E., & Morales, J. (2015). Determinación de cumarinas con actividad antioxidante por cromatografía de líquidos. https://zaloamati.azc.uam.mx/bitstream/handle/11191/8792/Determinacion_de_cumarinas_2015.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Aguilera, R., Arroyo, A., López, J., Ávila, E. (1984). Harina de hojas de yuca (*Manihotesculenta*) como fuente de proteína en dietas para pollos de engorda. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. (47): 9-15.
- Archile, A., Benitez, B., Rangel, L., Izquierdo, P., Huerta-L, N., Márquez, E. (1997). Perfil de ácidos grasos de las principales grasas y aceites disponibles para consumo en la ciudad de Maracaibo. *Revista Científica, FCV- LUZ*. 8 (3): 169-174.
- Balcinde, Y., Tirado, S., Pérez, C., Falero, A., Martí, E., Piñeda, M., Hung, Blanca (2005). Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/237027396_Cromatografia_en_capa_delgada_para_la_separacion_de_los_componentes_del_producto_obtenido_a_partir_de_cera_cruda_de_cana_de_azucar

- Bertsch, A., Álvarez, R., Coello, N. (2003). Evaluación de la calidad nutricional de la harina de plumas fermentadas por *Kocuria rosea* como fuente alternativa de proteínas en la alimentación de aves. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 8(2): 139-145.
- Castrejón, F., Corona, L., Rosiles, R., Martínez, P., Lorenzana, A., Arzate, L., Olivos, P., Guzmán, S., García, A., Avilés, J., Valles, B., Castillo, E., Jarillo, J., Durán, E., Flores, G., Paredes, S., Anaya, R., Martínez, R., Hernández, H., ...Carrillo, S. (2017). Características nutrimentales de Gramíneas, Leguminosas, y algunas Arbóreas Forrajeras del Trópico Mexicano: Fracciones de proteína (A, B1, B2, B3 y C), Carbohidratos, y Digestibilidad in vitro. Disponible en: https://papimes.fmvz.unam.mx/proyectos/manuales_nutricion/Manual_Fracciones.pdf
- Combatt, E., Jarma, A., Paternina, E. (2015). Bromatología de *Brachiaria decumbens* Stapf y *Cynodon nlemfuensis* Vanderyst en suelos sulfatados ácidos en Córdoba, Colombia. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/317438632_Bromatologia_de_Brachiaria_decumbens_Stapf_y_Cynodon_nlemfuensis_Vanderyst_en_suelos_sulfatados_acidos_en_Cordoba_Colombia 95
- Cruz, A., Lizarazo, C. (2016). Efectos de la inclusión de dietas ricas en flavonoides en la calidad de la leche bovina. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/305857316_Efectos_de_la_inclusion_de_dietas_ricas_en_flavonoides_en_la_calidad_de_la_leche_bovina
- Henschel, M., Nunes, A., Lima, J., Ribeiro, R., Alves, D., Souza, T., Silva, D. (2024). Lipidomics in Plants Under Abiotic Stress Conditions: An Overview. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4395/14/8/1670>
- Hernández, M. (2004). Recomendaciones nutricionales para el ser humano: actualización. *Revista cubana de Investigaciones Biomédicas*, 23(4): 266-92.
- Ibarra, G., Gutiérrez, M., Robles, M. (2017). Análisis fitoquímico y actividad antibacteriana del extracto metanólico de hojas de *Plumbago auriculata* LAM. *Revista biotecnia XX* (1):53-60.
- Inga, M. Tesis para optar el grado de doctor Doctoris Philosophiae en ciencias e ingeniería biológicas. Recuperado el 09 de marzo de 2024. <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/4365/inga-guevara-marienela-sonia.pdf?sequence=2&isAllowed=y>.
- Kholif, A. (2023). A Review of Effect of Saponins on Ruminant Fermentation, Health and Performance of Ruminants. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2306-7381/10/7/450>

- Maldonado, S. Sammán, N. (2000). Composición química y contenido de minerales de leguminosas y cereales producidos en el noroeste argentino. Recuperado el 06 de octubre de 2024. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222000000200014
- Márquez, D., Suárez, A. (2008). El uso de taninos condensados como alternativa nutricional y sanitaria en rumiantes. Disponible en: file:///C:/Users/jose/Downloads/El_uso_de_taninos_condensados_como_alternativa_nut.pdf.
- Nestel, P., Poyser, A., Hood, R., Mills, S., Willis, M., Cook, L., Scott, T. (1978). The effect of dietary fat supplements on cholesterol metabolism in ruminants. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022227520407047>
- Oliva, M., Meléndez, J., Maicelo, J., Milla, M., Leiva, S. (2022). Análisis proximal y rendimiento de cinco especies nativas con valor forrajero. Disponible en: <https://produccioncientificaluz.org/index.php/rluz/article/view/37547/41157>
- Roussos, S., Perraud, I. Fisiología y Bioquímica de Microorganismos Utilizados en Procesos de Fermentación en Medio Sólido. Disponible en: https://www.imbe.fr/IMG/pdf/coo2_bt_5925_roussos_1996.pdf?1135/73939a0f45492c8ad8a69375cd9b21bbea3ac075.
- Saenz, L., Córdova, I., Rodríguez, F. (2006). Los brasinoesteroides. Una nueva clase de hormonas vegetales. Disponible en: <https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/index.php/ediciones-antteriores/12-vol-57-num-4-octubre-diciembre-2006/comunicaciones-libres54/47-los-brasinoesteroides-una-nueva-clase-de-hormonas-vegetales>
- Sánchez Y., Rondón L., Hermosilla R., Almeida S., 2010. Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas, tallos y flores de la *Helychrysum bracteatum*. Revista Química Viva. 1:40–45.
- Sepúlveda J., Torres, J., Sandoval, C., Martínez, J., Chan, J. La importancia de los metabolitos secundarios en el control de nematodos gastrointestinales en ovinos con énfasis en Yucatán, México. Journal of the Selva Andina Animal Science. 2018. (5) 2.
- Soledad, B., Adames, J. (2015). Evaluación biológica de la harina de hojas de *M. bicuspidum*. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 6 (1), 001-018.
- Soledad, B., Adames, J., Luzardo, M (2004). Estudio nutricional de las hojas de Grifo Negro (*Macrolobium bicuspidatum*). Revista de la Facultad de Ingeniería Tekhne. 4. 40-49.
- Stahl, E. (1969, p.45). Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook.
- Trómpiz, J., Ventura, M., Esparza, D., Del Villar, A., Aguirre, J. (2000). Utilización de la harina de follaje de yuca (*Manihot esculenta* CRANTZ) en cerdos en crecimiento. Revista Científica, FCV-LUZ. 10(4). 315-320. 101

Vázquez, A., Álvarez, E., López, J., Wall, A., De la Rosa, L. (2012). Taninos hidrolizables y condensados: Naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/277816258_Taninos_hidrolizables_y_condensados_naturaleza_quimicaventajas_y_desventajas_de_su_consumo