

Determinación de algunos compuestos químicos en cuatro plantas arbóreas forrajeras

Ruby Gutiérrez¹, Quim, Msc; María L Roa¹, Zoot, Msc
¹Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
Universidad de los Llanos, AA 2333, Villavicencio, Colombia
mlroa@andinet.com*

(Recibido: 13 de marzo, 2002; aceptado: 21 de marzo, 2003)

Resumen

Se determinó la presencia de aminoácidos, alcaloides glucósidos cianogénicos, saponinas, flavonoides, esteroides y triterpenos, antraquinonas, fenoles y taninos, en las especies arbóreas forrajeras: Cayeno (Hibiscus rosa- sinensis), Leucaena (Leucaena flamboya), Morera (Morus alba) y Palo de cruz (Brownea enricii). Los aminoácidos de cada una de las plantas se analizaron en forma cuantitativa por cromatografía líquida de alta resolución. Los demás componentes fueron analizados en forma cualitativa por medio de reacciones características de cada uno de los compuestos. La extracción de éstos se hizo por dos métodos. Por el método de Wall et al, en el cual el material seco y molido de cada especie, se trató con etanol al 95% en caliente, se filtró, se evaporó al vacío y finalmente se redisolvió; la solución resultante se dividió en seis porciones para analizar alcaloides, esteroides y triterpenos, fenoles, flavonoides, saponinas y taninos, los glucósidos cianogénicos se analizaron directamente de cada planta. En el método de Cain et al, el material seco y molido se extrajo en soxhlet con metanol, y luego se evaporó al vacío y se analizaron alcaloides, esteroides y triterpenos, flavonoides y saponinas. Además los alcaloides fueron extraídos siguiendo los métodos rápido y lento de Webb y el método de Kiang y Douglas y posteriormente fueron analizados. Se observó en las cuatro especies forrajeras que de los 20 aminoácidos que se requieren en nutrición animal, un bajo nivel de alanina, cistina, triptófano, prolina, hidroxiprolina y citrulina, cuatro no esenciales y uno esencial adicionalmente, se observó deficiencia de todos los aminoácidos esenciales con relación al contenido de aminoácidos del huevo, con excepción de la fenilalanina, en cayeno, lisina, treonina y tirosina, en leucaena, treonina y tirosina en Palo de cruz. La valoración química de la cuatro especies es cero, tomando como referencia el aminoácido triptófano como el más limitante. En todas las especies forrajeras se encontraron alcaloides, esteroides, saponinas y fenoles; antraquinonas y glucósidos cianogénicos no se encontraron en ninguna especie. Los flavonoides están presentes en el Palo de cruz y los taninos en Leucaena y en Palo de cruz. Aunque están presentes los factores antinutricionales ya mencionados, en las cuatro plantas, estudios realizados en rumiantes han demostrado buena aceptación como forrajes, lo cual indica que la concentración de estas sustancias, no afecta el consumo por parte de los animales. Estos resultados permiten concluir que estas especies se pueden utilizar en la nutrición animal como suplementos alimenticios, para cubrir los requerimientos de los animales, y además desde el punto de vista farmacológico, se plantea la posibilidad de investigar acerca de sus propiedades benéficas.

Palabras clave: aminoácidos, factores antinutricionales, nutrición animal.

Introducción

La mayoría de la flora de Los Llanos Orientales de Colombia está siendo subutilizada, puesto que en

esta región se encuentra una amplia variedad de plantas, entre ellas los árboles forrajeros que representan un recurso alimentario para los animales, por lo anterior el objetivo principal de la presente

*Dirección para solicitar el documento

investigación fue determinar la presencia de aminoácidos, alcaloides, glucósidos cianogénicos, saponinas, flavonoides, esteroides y triterpenos, antraquinonas, fenoles y taninos en las especies *Brownea enricii*, *Hibiscus rosa sinensis*, *Morus alba* y *Leucaena flamboya*. Estos forrajes son consumidos por los animales de manera natural, por lo tanto, el conocimiento de las sustancias químicas ya mencionadas, permitirá el debido uso de ellas como árboles forrajeros, además podría ser la base para su estudio como fuentes de compuestos útiles en la medicina y en la toxicología, de otro lado, podrían ser objeto de estudio en la fisiología vegetal para la producción de estas especies sin sustancias nocivas.

Roa *et al* (13), registran buenos resultados en la alimentación de rumiantes con estas cuatro especies, las cuales fueron sometidas al análisis de su composición nutricional y de energía; además, en la literatura se reporta que pueden contener compuestos tóxicos o antinutricionales asociados con el contenido de proteína en sus semillas y partes vegetativas, estas sustancias se ubican en seis grupos químicos: alcaloides, aminoácidos tóxicos, glucósidos cianogénicos, saponinas, flavones e isoflavones y glucósidos pirimidínicos. En experimentos realizados con algunos animales de laboratorio se ha comprobado su toxicidad cuando se encuentran en alta concentración en los alimentos. Por ejemplo, los alcaloides producen un sabor amargo en las plantas disminuyendo su consumo; los aminoácidos tóxicos, saponinas y compuestos cianogénicos impiden la acción de las enzimas que hidrolizan los alimentos en el tracto digestivo; las flavonas tienen un efecto estrogénico afectando el equilibrio hormonal de los animales. La determinación del contenido de aminoácidos en los alimentos o forrajes se hace mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cual se realiza en equipos automáticos especializados, donde se fraccionan las preparaciones de proteínas hidrolizadas en sus aminoácidos que las constituyen y se inyectan (empleando agentes derivatizantes) en una columna cromatográfica, lográndose la separación de cada aminoácido en poco tiempo. Las proteínas son nutrientes esenciales para el desarrollo de los animales, están constituidas por aminoácidos, elementos necesarios para mantener los tejidos en los animales y además satisfacer las necesidades metabólicas de nitrógeno. Algunos se denominan esenciales porque el animal no los puede sintetizar, por lo tanto tienen que tomarse directamente de los alimentos, mientras que aquellos que se pueden elaborar por biosíntesis metabólica tisular se les denominan no esenciales. Los aminoácidos esenciales son arginina, histidina,

isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano y valina; los no esenciales son alanina, ácido aspártico, cistina, ácido glutámico, glicina, hidroxiprolina, prolina, serina, tirosina y citrulina. (3)

Andriquetto *et al* (1) reportan que el método de cuantificación química, se basa en el cromatograma que determina el contenido de aminoácidos de las proteínas en los alimentos, dependiendo de la calidad de este nutriente principalmente de la eficiencia de algunos de sus aminoácidos esenciales. La calidad de la proteína determinada por este método, es la medida de valoración química al aminoácido esencial existente en menor proporción cuando se compara con un patrón que es la proteína del huevo (véase Tabla 2). Esta medida química expresa el porcentaje del aminoácido más deficiente restándolo de cien, lo que permite agrupar la proteína en categorías, pero este método eminentemente químico no se puede generalizar, porque la calidad de la proteína de los alimentos depende también de factores biológicos como especie, estado fisiológico y requerimientos nutricionales, adicionalmente de otros factores como tipo de explotación y condiciones ambientales.

Es importante señalar que McDonald *et al* (12), reportan que para los rumiantes no es tan importante el contenido de aminoácidos esenciales en los alimentos como en aves y cerdos, debido a que las bacterias ruminales pueden sintetizar los aminoácidos a partir de compuestos nitrogenados no proteínicos, ácidos grasos volátiles y minerales. Sin embargo, se recomienda suplementar el forraje con alimentos con buen nivel de aminoácidos esenciales para que la producción sea más eficiente desde el punto de vista biológico y económico.

Materiales y métodos

Análisis fitoquímico preliminar de muestras vegetales

Domínguez (5) reporta dos métodos para la extracción y análisis de algunos compuestos químicos como alcaloides, glicósidos cardiotónicos, esteroides, triterpenos, saponinas, flavonoides, taninos y fenoles.

Según Wall *et al* (16), citado por Domínguez (6) el material vegetal seco y molido se somete a una extracción con etanol en caliente al 95%, luego se filtra en frío y se completa a un volumen de 100 ml con agua y se divide en dos partes A 25 ml y B 75 ml. En la solución A se investigan las saponinas por medio

de una prueba histológica de Griffing *et al* (8) citado por Domínguez (6). La solución B también se divide en dos porciones, en una de ellas se analizan los flavonoides por medio de reacciones cualitativas, la otra porción de esta solución se divide en cuatro partes, en la primera se investigan los alcaloides, en la segunda taninos, en la tercera fenoles hidrosolubles según Wall *et al* (16) y Galindo *et al* (7) y en la cuarta triterpenos por métodos cualitativos.

Para Cain *et al* (3), citado por Domínguez (6), el material seco y molido se somete a extracción con metanol en soxhlet, el metanol se evapora y el residuo rojo y café semisólido se usa para analizar alcaloides, flavonoides, saponinas, esteroides y triterpenos.

El análisis fitoquímico preliminar de las hojas de las plantas antes mencionadas, se realizó mediante dos métodos en conjunto: Según el método de Wall *et al* (16), citado por Domínguez (6) (véase Figura 1), 20g de material vegetal bien molido, se sometió a extracción en caliente con etanol al 95%, se filtró en frío, se evaporó y luego se redisolvió el residuo en 50 ml de etanol y se aforó a 100 ml, con agua. Wall *et al* (16) también reportan la reacción de Borntrager para identificar antraquinonas, en la que se hierven durante cinco minutos unos gramos de la planta pulverizada con KOH 0.5 N y peróxido de hidrógeno al 6%, se enfría la suspensión, se filtra o centrifuga, y el filtrado se acidula con ácido acético para después extraerlo con benceno. La capa bencénica se pone amarilla, se separa y 5 ml de esta solución se agitan con NH₄OH, las antraquinonas colorean de rojo la capa alcalina.

De acuerdo al método de Cain *et al* (4), citado por Domínguez (5) 50g de material seco y molido se extrajeron en soxhlet con metanol y se evaporó al vacío, el residuo rojo o café se utilizó para determinar: 1) *alcaloides*. Los alcaloides fueron extraídos siguiendo los métodos rápido y lento de Webb (17), y el método de Kiang y Douglas (10), y posteriormente analizados usando los reactivos de Mayer, Wagner, Markis, reportados por Contreras (5), Domínguez (6) y M Reactivos (13), 2) *flavonoides*. Se analizaron con el reactivo Mg/HCl, y con HCL 2 N en propanol, la aparición lenta de una coloración roja o violeta en ambos casos se considera prueba positiva, 3) *saponinas*. Se disolvió el residuo en agua caliente durante 15- 30 minutos, luego se agitó vigorosamente durante 3-5 minutos, la formación de espuma, semejante a un

panal de abejas, estable por 30 minutos, se considera como prueba positiva. Griffing *et al* y col (8) reporta dos ensayos para determinar saponinas; uno mediante la hemólisis de los glóbulos rojos por el extracto de la planta, al formar espuma, y el otro colocando un trozo de planta fresca sobre una placa de sangre agar, que en caso positivo, después de 6- 12 horas presenta una zona clara como resultado de la hemólisis, 4) *esteroides y triterpenos*. Una parte del residuo se disolvió en un reactivo compuesto por anhídrido acético, ácido sulfúrico y cloroformo, durante 1-2 minutos. La aparición de colores rojos, rosa, púrpura o azul se considera prueba positiva, 5) *glucósidos cianogénicos*. Se analizaron siguiendo el ensayo reportado por Wall *et al* (16), donde la planta triturada o picada se coloca en un tubo de ensayo se le agrega cloroformo y en la parte superior, se coloca un papel de filtro previamente empapado en una solución de picrato de sodio, que después se seca, y se sostiene con un tapón, evitando que el papel toque el tubo. Este se deja a 30- 35°C unas tres horas. Si el papel cambia a rojo la prueba es positiva, 6) *Aminoácidos*. Las muestras de los forrajes fueron secadas y molidas y luego fueron enviadas al laboratorio de Quimicontrol Gab Ltda, donde se determinaron por el método de cromatografía líquida de alta resolución, después de someter la muestra a hidrólisis ácida. Para establecer la calidad del contenido de aminoácidos se utilizó el método de valoración química (1), aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de deficiencia} = \frac{(\% \text{ de aminoácido del huevo} - \% \text{ de aminoácido del árbol}) \times 100}{\% \text{ de aminoácido del huevo}}$$

Andrighetto *et al* (1) reportan que aunque existen otras alternativas de tipo biológico para evaluar la calidad de los aminoácidos en los alimentos, desde el punto de vista químico la prueba cuantitativa más utilizada es mediante el patrón de comparación de valoración química.

Resultados

Alcaloides

En los extractos de las cuatro plantas, se encontraron alcaloides. Con el análisis del reactivo de Wagner, todas las muestras presentaron precipitado marrón, pero en mayor cantidad el cayeno y la morera; con el reactivo de Mayer, solamente se encontraron alcaloides en morera, observándose un precipitado blanco (13); con el reactivo de Markis, no se obtuvo

la coloración violeta que indica la presencia de alcaloides como codeína, morfina y nalorfina en ninguna muestra, solamente la morera presentó un color amarillo ámbar, que indica la presencia de colchicina según Contreras (5).

Aminoácidos

El contenido de aminoácidos de las cuatro especies estudiadas se presentan en la tabla 1, se encontraron la mayoría de aminoácidos exceptuando triptofano, cistina y alanina, éste último no se reporta en dos especies (cayeno y leucaena). En la tabla 2, se presentan los porcentajes de deficiencia de los aminoácidos esenciales de las cuatro especies forrajeras. Aplicando la fórmula de Andriquetto *et al* (1). Se observa que los cuatro árboles forrajeros son deficientes en la mayoría de los aminoácidos esenciales, exceptuando fenilalanina, lisina y treonina en leucaena, metionina en palo de cruz y tirosina en cayeno y leucaena. Si se toma el aminoácido esencial triptofano como el más limitante la valoración química de las cuatro especies es de $100\% - 100\% = 0\%$. En el cayeno además de ser deficiente en triptofano, lo es en un 90% en lisina, y el palo de cruz es deficiente en tirosina en un 67.4%.

Antraquinonas

Estos compuestos se analizaron directamente en las plantas, usando el reactivo de Borntröger (16), no se observó coloración roja en ninguna de las muestras.

Esteroles y triterpenos

En la prueba de Rosenheim (6) no se observó un color violeta que cambia a azul en 20 minutos en los cuatro extractos, con el ensayo de Salkowski (6) no se presentó color amarillo ó rojo, sin embargo, los extractos de las cuatro muestras presentaron coloración verde con el reactivo de Liebermann Burchard (6) lo cual nos indica la presencia de esteroides que contienen dos enlaces dobles conjugados, y/o presencia de triterpenos.

Flavonoides

La presencia de flavonoides solamente se hizo evidente en el extracto de Palo de Cruz, con el reactivo de Mg/ HCl, y calentando las hojas con HCl 2N; en ambos casos se presentó una coloración roja, que indica la presencia de flavandiol-3,4 ó leucoantocianina.

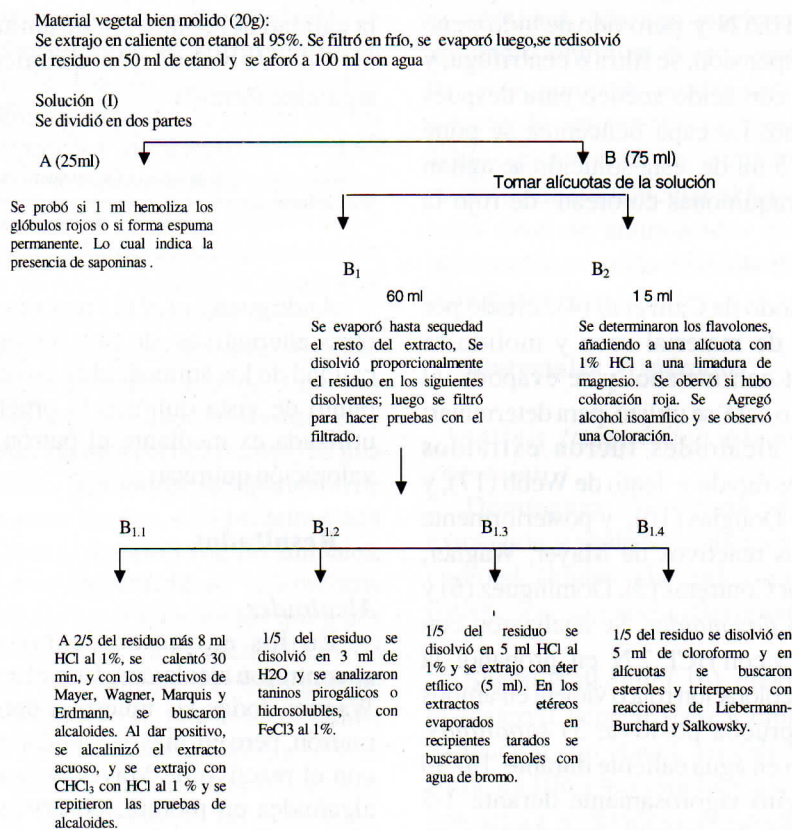


Figura 1. Análisis fitoquímico preliminar (Método de Wall)

Glucósidos cianogenéticos

Estos compuestos no se encuentran presentes en ninguna de las plantas, según el resultado del ensayo de picrato de sodio (16).

Saponinas

Los extractos de las muestras de cayeno y *Leucaena flamboya* presentaron hemólisis de los glóbulos rojos(16). En el ensayo con agua caliente(4), con excepción de la *Leucaena flamboya*, todos los extractos de las muestras presentaron espuma con apariencia de panal estable por 30 minutos. Con agar sangre (6) todas las muestras presentaron hemólisis lo cual permite concluir la presencia de saponinas en las cuatro plantas.

Taninos

Los extractos de las muestras de *Leucaena flamboya* y Palo de cruz, produjeron coloraciones más oscuras, con el FeCl₃ al 1%, esto nos indica la presencia de taninos condensados (7).

Tabla 1. Composición de aminoácidos (% de la proteína) de cuatro especies arbóreas

FORRAJE	CAYENO	LEUCAENA	MORERA	PALO DE CRUZ
Acido aspártico	0.82	1.83	2.19	0.69
Acido glutámico	0.41	0.62	1.10	0.36
Serina	0.38	0.70	1.03	0.67
Glicina	0.58	0.88	1.47	8.82
Histidina	0.18	0.24	0.72	0.32
Arginina	2.13	0.68	0.10	0.27
Treonina	5.05	6.35	1.17	0.77
Alanina	**	**	9.40	0.67
Prolina	5.39	2.47	2.12	0.79
Tirosina	10.21	5.90	0.84	3.03
Valina	3.04	2.85	0.91	0.37
Metionina	1.76	2.15	0.18	6.97
Cistina	**	**	**	**
Isoleucina+leucina	6.62	5.44	10.07	6.06
Fenil Alanina	20.86	25.81	28.75	30.15
Lisina	6.45	7.97	3.88	3.95
Triptofano	**	**	**	**
Proteína cruda %	13.9	19.7	18.6	7.5

Muestras analizadas en el laboratorio de QUMICONTROL GAB LTDA, cromatografía líquida de alta resolución, método de Pico-tag.

** No existe respuesta en el tiempo de retención esperado

Fenoles

Las cuatro muestras decoloraron el reactivo agua a bromo, (11) lo cual indica la presencia de fenoles.

Discusión

Las cuatro especies forrajeras estudiadas son angiospermas y dicotiledóneas, y en todas se observaron algunos factores antinutricionales (alcaloides, esteroides flavonoides, saponinas) y

taninos condensados en palo de cruz y *Leucaena flamboya*, que son leguminosas. Se han encontrado alcaloides en un grupo de familias de plantas angiospermas y dicotiledóneas (6), no obstante no hay reportes recientes de las cuatro familias de las especies mencionadas. Se hallaron estenoles insaturados en las plantas estudiadas que son los llamados estenoles (6). Las saponinas encontradas podrían ser triterpenoides, los cuales se encuentran en familias de plantas dicotiledóneas.

Tabla 2. Cálculo de la valoración química de las cuatro especies forrajeras, tomando como patrón de comparación los aminoácidos del huevo

AMINOACIDO	Huevo %	% DE DEFICIENCIA DEL AMINOÁCIDOS ESENCIALES			
		CAYENO	LEUCAENA	MORERA	PALO DE CRUZ
Arginina	6.4	33.28	10.59	1.60	4.16
Histidina	2.1	8.5	11.60	34.43	15.15
Lisina	7.2	90.0	00	53.84	54.84
Fenilalanina	6.3	00	00	00	00
Metionina	4.1	43.0	52.41	4.39	00
Treonina	4.9	00	00	23.83	15.63
Leucina+leu	17.2	39.0	31.64	58.52	35.22
Triptofano	1.5	100.0	100.0	100.0	100.0
Tirosina	4.5	00	00	18.66	67.40
Valina	7.3	42.0	39.10	12.42	5.07

Los taninos condensados están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Según Barry (2) y Jones (9), la propiedad de estos taninos de enlazar proteínas a pH neutros y después liberarla a pH ácido, hace pensar que ésta podría ser una herramienta útil para reducir la degradación de la proteína en el rumen y por lo tanto incrementar su cantidad de proteína, para que sea absorbida por el intestino, propiedad que también podría ser útil para prevenir el timpanismo en rumiantes que es producido por algunas leguminosas. Los flavonoles, conocidos como leucoantocianidinas se observaron en palo de cruz. La mezcla de éstos forma los taninos condensados. Las antraquinonas y los glucósidos cianogenéticos no se encuentran en estas familias de plantas; Se ha conocido que estos tienen un sabor amargo, lo cual es desventajoso para la alimentación animal (6). No obstante a la presencia de factores antinutricionales en estas especies, los rumiantes las han aceptado como forrajes (15), lo cual indica que su concentración no afecta su consumo por parte de los animales.

La presencia de estas sustancias amerita un análisis cuantitativo, que permita utilizar estas plantas en una

forma más frecuente y confiable, aprovechando el potencial nutricional y la oportunidad que se presenta en las fincas del llano para su cultivo; además desde el punto de vista farmacológico, se debe realizar un estudio orientado hacia la búsqueda de sus beneficios.

Es importante señalar que los aminoácidos más limitantes en la producción animal son la lisina y la metionina. La leucaena no presentó deficiencia de lisina y en el palo de cruz no se encontró deficiencia de metionina, lo cual indica que una mezcla de estos forrajes podría ser una alternativa de alimentación para

balancear dietas para animales que suplan adecuadamente los requerimientos en aminoácidos esenciales.

En los cuatro árboles forrajeros estudiados se observó la presencia de 15 de los 20 aminoácidos que son utilizados en nutrición animal. No se observaron cistina, triptofano, prolina hidroxiprolina, citrulina, cuatro no esenciales y uno esencial, con lo cual se puede concluir que estas especies pueden ser utilizadas en nutrición animal como suplementos alimenticios.

Summary

Determination of some chemical secondary compounds in the leaves of four woody forage species.

Concentrations of amino acids and presence of cyanogen glycosides, saponins, flavonoids, sterols and triterpenes, anthraquinones, phenols and tannins, were determined in leaves of four woody forage species: Cayeno (Hibiscus rosa-sinensis), leucaena (Leucaena flamboya), morera (Morus alba) and palo de cruz (Brownea enricii). The concentrations of amino acids in leaves of each species were measured by means of high-resolution liquid chromatography (HRLC). Other compounds were only qualitatively determined by the characteristic reaction of each one of them. Their extraction was carried out by two methods: 1) after Wall et al: Dry, ground material of each species was treated with 95% hot ethanol; filtered, vacuum evaporated and re-dissolved; the resulting solution was divided into six parts in order to analyze alkaloids, sterols and triterpenes, phenols, flavonoids, saponins and tannins. The cyanogenic glycosides were analyzed directly from each plant, 2) after Cain et al: Dry, ground material was extracted with methanol by means of a soxhlet (extractor); it was then vacuum evaporated and analyzed for alkaloids, sterols and triterpenes, flavonoids and saponins. Alkaloids were extracted following Webb's fast and slow method, and Kiang and Douglas's method and they analyzed. In the four forage species, deficiencies were found in one non essential amino acid (citrulline) and four essential ones (alanine, cystine, tryptophan, praline hydroxyproline). Deficiencies of the 20 amino acids, as compared to the amino acids content of the egg, were found in all species, with the following exceptions: phenylalanine in cayeno; lysine, treonine, and tyrosine, in leucaena; treonine and tyrosine in palo de cruz. The nutritional value of all four species is zero, taking as reference tryptophan as most limiting amino acid. Alkaloids, sterols, saponins and phenols were found in all forage species; anthraquinones and cyanogenetic glucosides were not found in any species. The flavonoids were present in palo de cruz; and the tannins in leucaena and in palo de cruz. Even though the aforementioned antinutritional factors are present in the four plants, studies carried out in ruminant nutrition have demonstrated good acceptance as forage, which would indicate that the concentration of these substances does not affect their value as animal forage. These results allow to conclude that these species can be used as animal nutritional supplement. Besides, from the pharmacological point of view it would be interesting to investigate their beneficial properties, if any.

Key words: amino acids, antinutritional factors, animal nutrition, plants.

Referencias

1. Andiguetto P, Minardi G, Flemming S, Bona F. Nutrición animal, bases y Fundamentos, vol 1, 4ed, Sao Pablo ,Nobel, 1990. 395 p.
2. Barry TN. Condensed tannins: Their role in ruminant protein and carbohydrate digestion and possible effect upon the rumen ecosystem. In: Notan. J.V. Leng, R.A. Demeyer. D.E. (eds.). The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion 1989; 153-169p, Armidale NSW2351. Australia: penambul books.
3. Chuch DC, Pond WC. Fundamentos de nutrición y alimentación de animales, 2ed, México DF, Limusa, 1990; 438p.

4. Cain BF, Griffin WJ, Wall ME. New Zeland J. Sci. 4,3. 1961; citado por Domínguez Xorje en métodos de investigación fitoquímica, México, Editorial Limusa, 1973. 281p.
5. Contreras FA. Trabajo para el Departamento Bioquímico de la Secretaría de Salud Pública de la municipalidad de Rosario. Foro de Bioquímica. http://orbita.Starmedia.Com/forobioq/art_tóxico.html.
6. Domínguez Xorje. En: Métodos de investigación fitoquímica, México, Editorial Limusa, 1973; 281p.
7. Galindo w., Rosales M., Murgueitio E. y Larrahonda J-»Sustancias antinutricionales en las hojas de guamo, nacedero y matarraton» Livestock Research for Rural Development. [http://www,Cipav.org.co/lrrd/lrrd1/1/mauricio](http://www.Cipav.org.co/lrrd/lrrd1/1/mauricio), Vol. 1, N° 1, Nov. 1989; 7 p.
8. Griffin WJ., Owen WR y Perkin JE. Planta Médica 16,75.1968; citado por Domínguez Xorje En: Métodos de investigación fitoquímica, México, Editorial Limusa, 1973; 281p.
9. Jones . W.T. and Mangan . J. L. Complexes of condensed Otannins of saifoin (*onobychis vicifolia Scop.*) with fraction I leaf protein and with submxillary mucoprotein and their revsal by polyethylene glycol and pH. J.Sci. Fd. Agric. 1977; 28: 126-136
10. Kiang AK. y Douglas B. Proc. Third Congress, Pan Indian Ocean Science Association, Section G., 19 .1957, citado por Domínguez Xorje En: Métodos de investigación fitoquímica, México, Editorial Limusa, 1973; 281p.
11. Martínez C., Guías de Análisis Orgánico cualitativo. Facultad de Ciencias, Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá DC, 1972; 132 p.
12. McDonald P, Edwards RA , Greenlg JF. Nutrición animal, 3ed, Zaragoza, Acribia, 1986; 517p.
13. M-Reactivos. <http://Galeón.hispavista.com/labquímica/sopacadémico/reactivos/mreactivos.htm...>
14. Rincón J. Leguminosas arbóreas del municipio de Villavicencio, reconocimiento y caracterización nutricional. Tesis de pregrado, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad de los Llanos,. Villavicencio, Colombia, 1996;196p.
15. Roa ML, Céspedes D y Muñoz J. Evaluación nutricional de tres especies de árboles forrajeros en bovinos fistulados en el pie de monte llanero. Rev ACOVEZ, 1999; 24: 14- 18.
16. Wall ME, J.Am. Pharm Assoc. Sci. Ed. 43,1. 1954; citado por Domínguez Xorje en Métodos de investigación fitoquímica, México, editorial Limusa, 1973; 281p.
17. Webb LJ. An Australian Phytochemical survey I. Alkaloids and Cyanogenetic compounds in Queensland plants, Boletín 241, C.S.I.R.O. Melbourne. 1949; citado por Domínguez Xorje En: Métodos de investigación fitoquímica, México, Editorial Limusa, 1973; 281p.