



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DETERMINACIÓN FITOQUÍMICA DE LOS PRINCIPALES GRUPOS DE
METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Leucaena leucocephala* Y *L. esculenta* DE
LA LOCALIDAD DE TLAYACAPAN, MORELOS.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARÍA DE LOS ÁNGELES MORA VILLA

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. CLAUDIA TZASNA HERNÁNDEZ DELGADO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

COMITÉ TUTOR:

DR. RAFAEL LIRA SAADE
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.
DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO SEPTIEMBRE DE 2023.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**DETERMINACIÓN FITOQUÍMICA DE LOS PRINCIPALES GRUPOS DE
METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Leucaena leucocephala* Y *L. esculenta* DE
LA LOCALIDAD DE TLAYACAPAN, MORELOS.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARÍA DE LOS ÁNGELES MORA VILLA

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. CLAUDIA TZASNA HERNÁNDEZ DELGADO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

COMITÉ TUTOR:

DR. RAFAEL LIRA SAADE
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.
DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO SEPTIEMBRE DE 2023.

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
OFICIO: CGEP/CPCB/FESI/0523/2023
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **17 de abril de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **MORA VILLA MARÍA DE LOS ÁNGELES** con número de cuenta **517007789** con la tesis titulada "**Determinación fitoquímica de los principales grupos de metabolitos secundarios de *Leucaena leucocephala* y *L. esculenta* de la localidad de Tlayacapan, Morelos**", realizada bajo la dirección de la **DRA. CLAUDIA TZASNÁ HERNÁNDEZ DELGADO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. RICARDO REYES CHILPA
Vocal: DR. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO
Vocal: DRA. ANDREA MARTÍNEZ BALLESTÉ
Vocal: DRA. ANA MARÍA GARCÍA BORES
Secretario: DR. RAFAEL LIRA SAADE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 26 de junio de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA

c. c. p. Expediente del alumno

AGNS/GGM/EARR/ggm



Agradecimientos institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología que otorgó el apoyo económico requerido para la realización de este proyecto otorgando una beca CONACyT de posgrado con número de CVU de 777911.

De igual manera se agradece a Proyectos de Investigación PAPIIT, el cual financió parte del proyecto con número de registro: PAPIIT- DGAPA IG200821.

A los miembros del Comité Tutor: Dra. Claudia Tzasná Hernández Delgado por haber hecho posible mi estancia en el Laboratorio de Bioactividad de Productos Naturales, Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM y fungir como mi asesora durante la realización del presente proyecto, así como al Dr. Rafael Lira Saade y Dr. Manuel Jiménez Estrada por sus valiosas aportaciones al estudio y su apoyo. Sus comentarios enriquecieron enormemente la investigación.

Agradecimientos

A mis padres Lety y Sergio por la dedicación, amor y esfuerzo que me dieron en todo momento, gracias por enseñarme lo importante de la vida. A mi hermana Marisol por apapacharme, quererme, por los ánimos y también por sus opiniones al escrito. A mi hermana Anaid por la ayuda estadística y el apoyo en el trabajo. A mis tíos y a mis abuelitos por amarme y recordarme que no hay nada más importante que el cariño mutuo. A mis lomitos adorados que hacen de la vida un lugar mejor.

A mi compañero de vida y querido Luis Octavio y a mis amigos Fabián Vidal, Moisés Hernández y David Valencia que han estado conmigo antes y durante este largo proceso, cerca y lejos físicamente, tomándose el tiempo para un mensaje de ánimo y por ser un apoyo invaluable más allá de lo académico. A todos ustedes, muchas gracias por su apoyo incondicional en el trabajo, sus horas de diversión, reflexión y cariño.

A mis amigos y compañeros de laboratorio de Bioactividad de Productos Naturales y Fitoquímica cuya ayuda y presencia fue muy valiosa en la realización del trabajo. En especial a la M. en C. Nallely Álvarez, a la Dra. Julieta Orozco, al M. en C. Erick Nolasco, y al Dr. Antonio Estrella cuyos consejos me ayudaron a mejorar en el trabajo día a día.

A mi asesora y una increíble persona a la Dra. Claudia Tzasná Hernández Delgado por enseñarme más allá de lo académico y ser un impresionante apoyo, muchas gracias por todo. De igual manera un agradecimiento a mi gran equipo del comité tutorial, al Dr. Rafael Lira y al Dr. Manuel Jiménez que siempre estuvieron al pendiente de mí en todo momento. Agradezco a todos los miembros de mi jurado por tomarse el tiempo y por contribuir enormemente al presente trabajo.

A la Dra. Rocío Serrano a quien le tengo mucho cariño, admiración y amistad, además sin su invaluable ayuda durante estos años no habría crecido como profesionalista ni como persona. Gracias infinitas por apoyarme, explicarme y tenerme paciencia. Por último y no por ello menos importante, agradezco a la Dra. Ana María García, a la Dra. Montserrat Espinosa, al Dr. Israel Valencia y al Dr. Guillermo Avila que fueron guías importantes para mi estancia durante el doctorado.

A mi madre Leticia Villa Carrillo.

A mi padre Sergio Salvador Mora Ramírez.

A mis hermanas Marisol y Anaid.

A mis tíos Mary y Arturo.

A mis queridos abuelitos Rodolfo y Guille†.

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN GENERAL	5
4. ANTECEDENTES	12
5. JUSTIFICACIÓN	14
6. HIPÓTESIS	14
7. OBJETIVO GENERAL	14
CAPÍTULO I. REVISIÓN DEL GÉNERO <i>Leucaena</i>	15
PUBLICACIÓN	
“Especies del género <i>Leucaena</i> (Fabaceae) en México: Una revisión de su actividad antimicrobiana, mecanismos de acción, etnobotánica y fitoquímica” (“Species of the genus <i>Leucaena</i> (Fabaceae) in Mexico: A review of its antimicrobial activity, mechanisms of action, ethnobiology and phytochemistry”).	
CAPÍTULO II. INVESTIGACIÓN ANTIMICROBIANA	41
PUBLICACIÓN	
“Evaluación de la actividad antimicrobiana de semillas de <i>Leucaena leucocephala</i> y <i>L. esculenta</i> recolectadas en Tlayacapan, Morelos (Mexico)” (“Evaluation of the antimicrobial activity of <i>Leucaena esculenta</i> and <i>Leucaena leucocephala</i> seed collected from Tlayacapan, Morelos (Mexico)”)	
CAPÍTULO III. INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA Y ENSAYOS BIODIRIGIDOS	59
PUBLICACIÓN. ARTÍCULO DE REQUISITO.	
“Estudio biodirigido de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana y aislamiento de D-pinitol de semillas de <i>Leucaena esculenta</i> y <i>L. leucocephala</i> ” (“Bio-guided study of secondary metabolites with antimicrobial activity and isolation of D-pinitol from <i>Leucaena esculenta</i> and <i>L. leucocephala</i> seeds”)	
8. DISCUSIÓN GENERAL	79
9. CONCLUSIONES	85
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
11. ANEXO	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Distribución de <i>L. leucocephala</i> en México	7
Fig. 2 Estructuras vegetales de <i>L. leucocephala</i>	7
Fig. 3 Distribución de <i>L. esculenta</i> en México	8
Fig. 4 Estructuras vegetales de <i>L. esculenta</i>	9
Fig. 5 Localización del municipio de Tlayacapan, Morelos	10
Fig. 6. Ubicación geográfica de la localidad Tlayacapan, Morelos	10
Fig. 7. Cromatograma UV-VIS. Fracción 10. <i>L. leucocephala</i>	93
Fig. 8. Cromatograma UV-VIS. Fracción 8. <i>L. leucocephala</i>	94
Fig. 9. Cromatograma UV-VIS. Fracción 5. <i>L. leucocephala</i>	95
Fig. 10. Cromatograma UV-VIS. Fracción 5. <i>L. esculenta</i>	96
Fig. 11. Cromatograma UV-VIS. Fracción 4. <i>L. esculenta</i>	97
Fig. 12. Cromatograma UV-VIS. Fracción 3. <i>L. esculenta</i>	98
Fig. 13. Espectro UV-VIS de los compuestos fenólicos con actividad biológica	99

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contribución de estudios etnobotánicos, antimicrobianos y fitoquímicos de especies del género <i>Leucaena</i>	12
---	----

1. RESUMEN

El conocimiento tradicional de los grupos humanos sobre los recursos vegetales contribuye a enriquecer el conocimiento en el campo de las plantas medicinales, el cual ha sido asociado a países con alta diversidad biológica y cultural, como lo es el caso de México. La localidad de Tlayacapan, localizada en el estado de Morelos, cuenta con una variedad de microclimas, lo que la hace muy atractiva para diversos estudios biológicos y etnobotánicos. *L. leucocephala* (guaje blanco) y *L. esculenta* (guaje rojo) (Fabaceae) son especies popularmente conocidas como “guajes” en México y particularmente usadas por habitantes de la localidad de Tlayacapan como recursos alimenticios y medicinales para aliviar padecimientos relacionados al aparato digestivo. El objetivo del presente trabajo fue la determinación fitoquímica de los principales grupos de metabolitos secundarios, así como la evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de semillas de ambas especies de guaje de la localidad de Tlayacapan, Morelos.

Los extractos fueron obtenidos por la técnica de maceración y concentrados a presión reducida. Respecto a la actividad antimicrobiana se llevaron a cabo las técnicas: difusión en agar, microdilución en caldo y bioautografía. Se utilizaron un total de 25 cepas bacterianas. Para la determinación fitoquímica se realizaron diversas técnicas cromatográficas tales como: cromatografía en columna abierta, cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), además de la determinación colorida de grupos de metabolitos secundarios con reactivos específicos. Por otro lado, se emplearon técnicas espectroscópicas para la elucidación de los productos naturales de interés presentes en las muestras.

Para los bioensayos, los extractos metanólicos de semillas del guaje blanco y rojo, presentaron los mayores rendimientos y la mayor actividad inhibitoria en contraste de los demás extractos. Fueron inhibidas principalmente cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* con halos de 7 a 10 mm en promedio y valores de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) alrededor de los 2000 a los 4000 µg/mL respectivamente. Mediante técnicas coloridas se evidenció presencia de alcaloides, triterpenos, esteroides, fenoles,

monoterpenos y saponinas los cuales diversos autores indican con potencial antimicrobiano. Como resultado del fraccionamiento biodirigido, fueron seleccionadas 6 subfracciones que presentaron actividad antimicrobiana sobre *S. aureus* y *E. coli* para realizar análisis en el HPLC. En dichas muestras se reconocieron compuestos fenólicos como, quercetina, diversas catequinas, apigenina y ácidos fenólicos, los cuales tienen diversos reportes de poseer actividad antimicrobiana. Por último, fue aislado el D-pinitol del extracto metanólico de semillas de *L. leucocephala* sin poseer actividad antimicrobiana sobre ninguna cepa probada.

Debido a los resultados obtenidos, los extractos de semillas de ambas especies de guajes tienen potencial antimicrobiano sobre cepas de interés médico, lo que contribuye a validar mediante un estudio biodirigido el conocimiento y uso tradicional en la localidad de Tlayacapan, Morelos.

2. ABSTRACT

The traditional knowledge of human groups on plant resources contributes to enriching knowledge in the field of medicinal plants, which has been associated with countries with high biological and cultural diversity, such as Mexico. The town of Tlayacapan, located in the state of Morelos, has a variety of microclimate's, which makes it very attractive for various biological and ethnobotanical studies. *L. leucocephala* (white guaje) and *L. esculenta* (red guaje) (Fabaceae) are species popularly known as "guajes" in Mexico and used by the inhabitants of the town of Tlayacapan as food and medicinal resources to alleviate ailments related to the digestive system. The objective of this work was the phytochemical determination of the main groups of secondary metabolites, as well as the evaluation of the antimicrobial activity of seed extracts of both species of guaje from the town of Tlayacapan, Morelos.

The extracts were obtained by the maceration technique and concentrated under reduced pressure. Regarding antimicrobial activity, the following techniques were carried out: agar diffusion, broth microdilution and bioautography. A total of 25 bacterial strains was used. For the phytochemical determination, various chromatographic techniques were performed such as: open column chromatography, thin layer chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC), in addition to the colorful determination of secondary metabolite groups with specific reagents. On the other hand, spectroscopic techniques were used to elucidate the natural products of interest present in the samples.

For the bioassays, the methanolic extracts of white and red guaje seeds presented the highest yields and the highest inhibitory activity in contrast to the other extracts. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains were mainly inhibited with halos of 7 to 10 mm on average and values of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) around 2000 to 4000 µg/mL, respectively. Using colorful techniques, the presence of alkaloids, triterpenes, steroids, phenols, monoterpenes and saponins was evidenced, which various

authors indicate have antimicrobial potential. As a result of the biodirected fractionation, 6 subfractions that presented antimicrobial activity against *S. aureus* and *E. coli* were selected for HPLC analysis. Phenolic compounds such as quercetin, various catechins, apigenin and phenolic acids were recognized in these samples, which have various reports of having antimicrobial activity. Finally, D-pinitol was isolated from the methanolic extract of *L. leucocephala* seeds without having antimicrobial activity on any tested strain.

Due to the results obtained, the seed extracts of both gourd species have the antimicrobial potential strains of medical interest, which contributes to validate the knowledge and traditional use in the town of Tlayacapan, Morelos, through a bio-directed study.

3. INTRODUCCIÓN GENERAL

La humanidad desde milenios ha utilizado diferentes recursos naturales para cubrir sus necesidades básicas, sobresaliendo los vegetales como fuente alimenticia y medicinal. El uso terapéutico de las plantas está normalmente ligado a países con ricas bases culturales y de alta biodiversidad, como el caso de China, Brasil o México (Biodiversidad Mexicana, 2021). Estos recursos, suelen ser el instrumento base para la medicina tradicional contribuyendo a la prestación de servicios de salud a nivel mundial (OMS, 2013). Se calcula que el 70 a 80% de los habitantes del planeta cubren sus necesidades primarias de salud con remedios tradicionales vegetales (OMS, 2013; Royaka *et al.*, 2014). Es importante mencionar que en el mundo hay un aproximado de 400,000 especies de plantas, de las cuales solo son empleadas como medicinales de 20,000 a 55,000 especies; de todas ellas, solo el 15 o 20% han sido evaluadas respecto a sus propiedades biológicas (Soejarto *et al.*, 2005; Abreu *et al.*, 2008; Biodiversidad Mexicana, 2021; Encyclopedia of Life, 2021).

Llorente y Ocegueda (2008) en su obra "*Capital Natural de México*" indica que México es considerado un país "megadiverso", ya que forma parte del selecto grupo de naciones poseedoras de la mayor cantidad y diversidad de animales, plantas, y grupos étnicos. Cifras de Biodiversidad Mexicana (2021) indican que el país posee alrededor del 12% de la diversidad mundial de especies y para el caso de plantas vasculares la nación se ubica en 5° lugar a nivel mundial con un total de 23,424 especies aproximadamente. Respecto a la cantidad de grupos culturales, El Instituto Nacional de los Pueblos Indígenas (2020), reporta un total de 68 etnias, lo que representa un 6.5% de la población del país con un aproximado de 8,000,000 de habitantes indígenas.

México es un país con una amplia tradición en el uso de plantas medicinales que representan un conjunto de conocimientos y prácticas basadas en la experimentación empírica por sus pueblos indígenas; la cual requiere de una corroboración tanto química como biológica, con el fin de brindar un uso seguro para la población (Viesca, 1999). Se calcula que la flora medicinal mexicana contiene

entre 5,000 y 10,000 especies de plantas con potencial terapéutico benéfico (Aguilar, 1999; Lozoya, 1994; Zolla, 2020), de las cuales Ocegueda *et al.*, (2005) indica que 4,000 especies tienen efectos empíricos comprobables y que en la actualidad cerca de 20 millones de habitantes recurren a las plantas como único recurso medicinal, por lo tanto combinar el conocimiento popular con el científico puede ser una buena alternativa para los planes de salud (BDMTM, 2016; Zolla, 2020).

El género *Leucaena*, perteneciente a la subfamilia de las Mimosoideae de la familia Fabaceae, cuenta con 24 especies reportadas de árboles y arbustos, distribuidos de Texas, EE. UU. a Perú (Zárate, 1994). Popularmente en México son conocidos como guajes, donde algunas especies tienen frutos y semillas utilizadas principalmente para la alimentación, vivienda y terapéutica de diversas etnias del territorio mexicano (Zárate, 1994; Zolla, 1980; Rojas *et al.*, 2001). De igual manera, son usadas en alimentación forrajera animal, en abonos verdes, conservación de suelos, semillas para collares, fuente vegetal de aceite combustible para energía, entre otros (CONABIO NaturaLista, 2015).

***L. leucocephala* (Lam.) de Wit.**

Especie mejor conocida como guaje blanco o verde, es un árbol de crecimiento rápido, nativo de la Península de Yucatán y con distribución en casi todo el territorio mexicano, sobre todo en la parte sur del país (fig. 1) (SIRE-CONABIO, 2010 y Zárate, 1987). Alcanza una longitud que va desde 1 hasta 6 m de altura, pero puede llegar a medir hasta 20 m y tener un diámetro de 15 a 40 cm (Zárate, 1994). El follaje es perennifolio y la floración y fructificación puede ocurrir todo el año dependiendo de la disponibilidad de agua siendo que los frutos maduran de marzo a abril principalmente (SIRE-CONABIO, 2010 y Zárate, 1987).

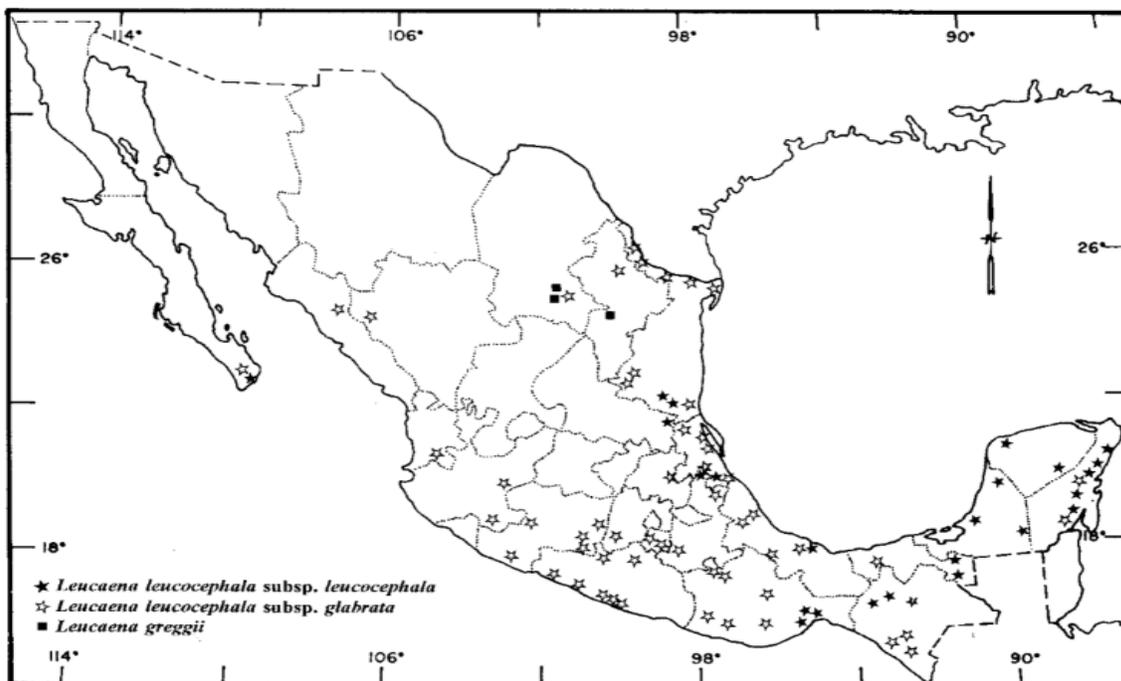


Fig. 1. Distribución en México de la especie *L. leucocephala*. Tomado de Zárate (1994).

La especie puede reconocerse por presentar flores blancas en cabezuelas, más de 10 pares de pinnas, folíolos elípticos, de 2-4.5 mm de largo, glándulas del pecíolo obovadas o elípticas. El fruto es una vaina oblonga color café de más de 11 a 25 cm de largo y las semillas están ubicadas transversalmente o en forma oblicua (fig. 2A-D) (Vibrans, 2011).

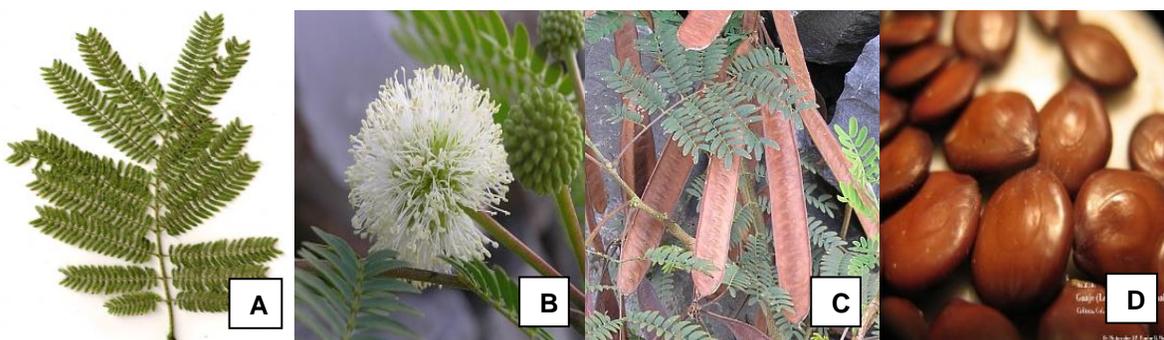


Fig. 2. Estructuras vegetales del guaje blanco *L. leucocephala*. A. Hojas compuestas. B. Flores blancas en cabezuelas. C. Fruto tipo vaina oblonga color café. D. Semillas café aplanadas. Imágenes tomadas de sitios web: CONABIO Naturalista (2015) y CONAFOR (2016).

***L. esculenta* (Moc. Et Sessé ex Dc.) Benth.**

Especie distribuida en el centro del país (fig. 3), es conocida como guaje rojo o colorado, es un árbol de 4 a 12 m (hasta 15 m) de altura; 35 cm de diámetro. Es un árbol caducifolio, la caída de las hojas inicia en enero y se extiende hasta abril. La floración tiene una duración de 7 meses, y se presenta de julio a enero; el pico de floración se presenta en los meses de noviembre y diciembre. Los frutos jóvenes se presentan desde noviembre, aunque su madurez se alcanza de diciembre a abril (SIRE-CONABIO, 2010 y CONAFOR, 2016).

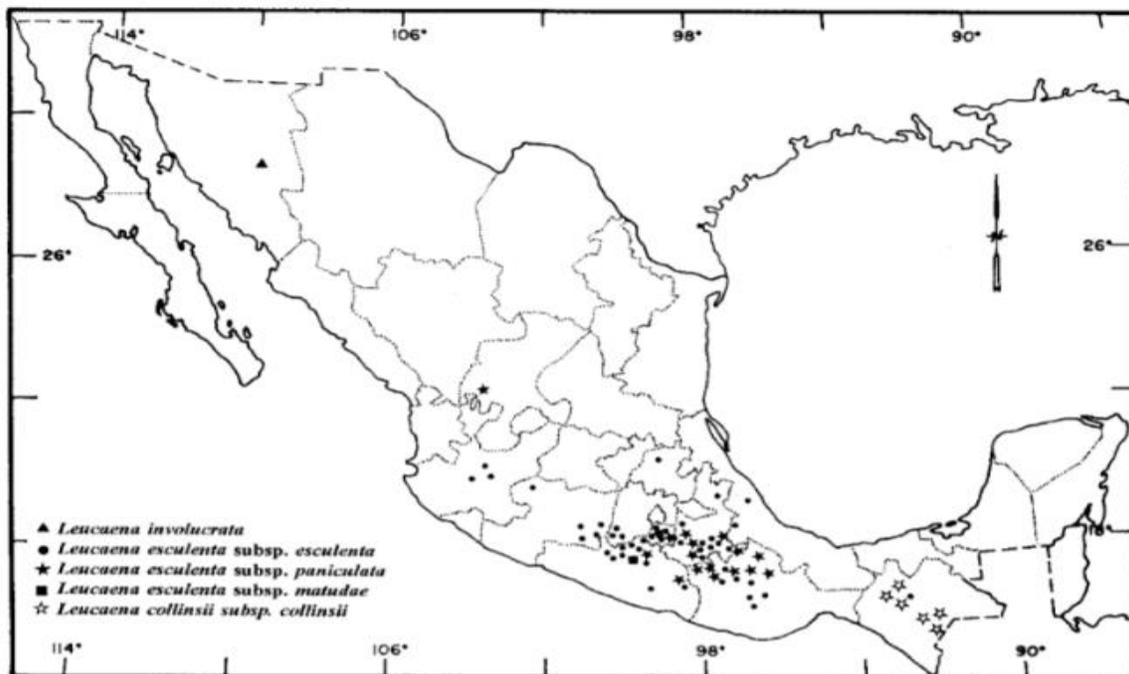


Fig. 3. Distribución en México de la especie *L. esculenta*. Tomado de Zárate-Pedroche (1994)

Esta especie posee hojas bipinnadas de 30 a 40 pares de pinnas, foliolos de 3.5-6.5 mm de largo, glándulas oblongas entre el primer par de pinnas (Zárate, 1994 y Orwa *et al.*, 2009). Tiene flores blancas en cabezuelas globosas y olorosas de 25-28 mm (BDMTM, 2016). Los frutos son vainas de 10 a 15 cm de largo color café-purpúreo con 15 a 20 semillas color marrón brillante (fig. 4A-D) (CONAFOR, 2016).



Fig. 4. Estructuras vegetales del guaje rojo *L. esculenta*. A. Hojas compuestas. B. Flores blancas en cabezuelas. C. Fruto tipo vaina oblonga color café rojizo. D. Semillas café rojizas abultadas. Imágenes tomadas de sitios web: CONABIO Naturalista (2015) y CONAFOR (2016).

Estudios etnobotánicos y fitoquímicos de México hechos en Morelos, Oaxaca y Guerrero principalmente, reportan efectos afrodisíacos, eupépticos, antisépticos, antiparasitarios (Zárate, 1987; Zárate, 1994) y antimicrobianos (Peralta *et al.*, 2017; Sepúlveda *et al.*, 2018; Mora *et al.*, 2021) de extractos de hojas y semillas de *L. leucocephala* y *L. esculenta* principalmente (Román, 2015). Dichos efectos serán abordados a profundidad durante el trabajo y también en el último capítulo correspondiente al artículo de revisión de las especies del género *Leucaena* presentes en México.

Área de estudio

Morelos ocupa el 0.25% del territorio mexicano y en él se registra un 10% de las plantas vasculares reportadas para el país. El municipio de Tlayacapan se ubica en la región Noreste del estado (fig.5) y está geográficamente embebida entre dos regiones consideradas como centros de endemismos: el Eje Neovolcánico y la Cuenca del Balsas (fig. 6) (CONABIO Y UAEM, 2006), además contiene una gran gama de microclimas, lo que hace a la región de Tlayacapan muy atractiva para estudios biológicos y de forma particular para estudios etnobotánicos. En la zona, la vegetación es fundamentalmente boscosa en las partes altas del Municipio, abundan los árboles de encino, ocote, laurel y tepeguaje, en la parte media abundan los árboles de cazahuate, pochote, palo dulce, copal, fresno, guaje colorado, zapote blanco y negro, chirimoyo, aguacate, limón, guayabo, ciruelo, y en la parte baja o

sea a la altura del ejido, mangos, mameyes, limones, naranjas, plátanos, anonas y chicos (Secretaría de Desarrollo Agropecuario, 2012).



Fig. 5. Municipio de Tlayacapan en la zona Noreste del estado de Morelos. Imagen tomada de Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México, 2016.

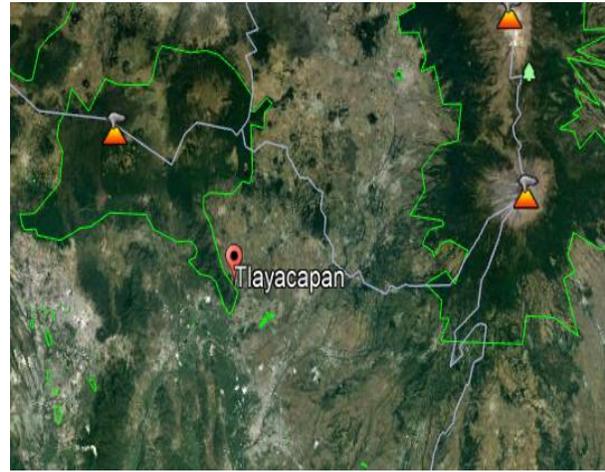


Fig. 6. La localidad de Tlayacapan se ubica entre la cuenca del Balsas y el eje Neovolcánico. Al sureste el corredor Chichinautzin (izquierda). Imagen tomada de GoogleEarth, 2021.

Problemática social

Es importante recalcar la incidencia de enfermedades de origen infeccioso en la zona. Para el estado de Morelos, los Servicios de Salud (Fragoso-Velázquez, 2012) del estado reportan una tasa de mortalidad infantil del 2.6 % por causa de infecciones relacionadas al aparato digestivo en el 2010. Particularmente, el municipio de Tlayacapan no presenta una mortalidad general (de todos los estratos poblacionales) elevada respecto a la totalidad del estado, la mortalidad infantil se ubica dentro de los 6 municipios con más pérdidas por año y el que tiene mayores pérdidas anuales en niños de 5 años por enfermedades diarreicas. Lo anterior debido a las condiciones de salud con las que se cuentan en la zona, por lo cual el mismo sector salud recomienda acciones preventivas para disminuir las muertes por esta causa en los niños de 5 años y menores.

Para la realización de estudios de bioprospección, los estudios etnodirigidos representan una excelente opción ya que las plantas que son utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades son colectadas

y analizadas, partiendo del hecho que han sido sometidas a un monitoreo empírico a través del tiempo por las comunidades autóctonas, informando, además, la forma de uso, parte y cantidades empleadas (Hernández-Delgado, 2004).

En 2015 Román llevó a cabo un estudio etnobotánico en la zona de Tlayacapan, obteniendo un listado de especies donde se identificaron 162 con uso medicinal, contra 36 consideradas como comestibles, estos datos revelan que el uso terapéutico de las plantas fue la categoría más importante para este municipio. De igual manera, Román (2015), indicó que las semillas de dos especies del género *Leucaena* fueron consideradas por los habitantes de la zona, de las más usadas para curar afecciones de posible origen infeccioso en forma de infusión. En el municipio se ubica *L. leucocephala* y *L. esculenta* las cuales son llamados popularmente como guajes (blanco y rojo respectivamente) y ambas especies son nativas de México.

Debido a que existe un renovado interés en la flora medicinal por ser fuente de nuevos medicamentos y por el desconocimiento en el campo de las plantas medicinales, los estudios etnobiológicos son de suma importancia ya que contribuyen a la recopilación del conocimiento ancestral de comunidades indígenas y dan la pauta a la comprobación científica de las propiedades que se le atribuyen a cada organismo, siendo en este caso la actividad antimicrobiana. Por ello el presente trabajo se centra en la evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de semillas de *L. leucocephala* y *L. esculenta*, así como en la determinación fitoquímica de los principales grupos de metabolitos secundarios de ambas especies de guaje de la localidad de Tlayacapan, Morelos.

4. ANTECEDENTES

L. esculenta y *L. leucocephala* son dos de las especies del género que cuentan con más estudios a nivel mundial, ambas son mexicanas, de amplia distribución y de diferentes usos, ya sean comestibles, medicinales o agroforestales (tabla 1).

Tabla 1. Contribución cronológica de algunos estudios etnobotánicos, antimicrobianos y fitoquímicos de especies del género *Leucaena*.

Referencia	Especie	País de referencia	Aportación
Zárate, 1994	<i>L. esculenta</i>	México	Se utiliza como afrodisiaco, eupéptico, para la gastralgia y males relacionados al aparato digestivo.
Galindo <i>et al.</i> , 1995	<i>L. leucocephala</i>	Cuba	En rumiantes fue suministrada la planta junto con su dieta diaria dando como resultado el aumento de bacterias celulolíticas.
Nwe <i>et al.</i> , 2001	<i>L. leucocephala</i>	Myanmar	Efecto antibacteriano de extractos de hojas sobre <i>Vibrio cholerae</i> y <i>Shigella flexneri</i> . La infusión se reporta para el tratamiento de infecciones del estómago, para la diarrea y como diurético.
Aderibigbe <i>et al.</i> , 2011	<i>L. leucocephala</i>	Nigeria	Efecto antimicrobiano de la porción aceitosa de las semillas con efectos significativos sobre cepas bacterianas Gram positivas y negativas, dependientes de la concentración.
Mathur <i>et al.</i> , 2013	<i>L. leucocephala</i>	India	Actividad antimicrobiana de extractos alcohólicos y acuosos de hojas sobre <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
Román, 2014	<i>L. esculenta</i> y <i>L. leucocephala</i>	México	Contenido de compuestos fenólicos en semillas frescas de ambas especies de guaje como: taninos, flavonoides y antocianinas.

Roman-Salazar, 2015	<i>L. leucocephala</i> <i>L. esculenta</i>	México	Usos medicinales para tratar afecciones del estómago e hígado en la localidad de Tlayacapan, Morelos.
Savita y Preeti, 2015	<i>L. leucocephala</i>	India	Se evaluó el efecto antimicrobiano de las hojas para tres diferentes solventes (metanol, acetona y cloroformo) obteniendo efecto inhibitorio para <i>E. coli</i> y <i>Bacillus subtilis</i> .
Abu <i>et al.</i> , 2016	<i>L. leucocephala</i>	Malasia	Actividad antimicrobiana sobre cepas bacterianas Gram positivas y negativas.
BDMTM, 2016	<i>L. esculenta</i>	México	Reportada para tratar el dolor de estómago e infecciones del aparato digestivo, remedio contra la indigestión y usada para “abrir” obstrucciones. También se utiliza para eliminar amibas.

5. JUSTIFICACIÓN

Considerando principalmente, uno, que existe una gran diversidad de metabolitos en las plantas; dos, un renovado interés en la flora medicinal por ser fuente de tratamientos médicos y tres, la problemática de la creciente tasa de infecciones bacterianas y la resistencia de éstas, la realización de ensayos biológicos y fitoquímicos contribuye además de al acervo de información nacional, a la identificación de posibles moléculas activas de interés médico.

La presente investigación es trascendente porque se llevó a cabo con semillas de *L. leucocephala* y *L. esculenta*, estructura vegetal que tiene pocos reportes sobre su actividad antimicrobiana, además de que son las partes usadas por la comunidad de Tlayacapan, Morelos, lo que ayuda a validar su uso.

Dado lo anterior es importante evaluar la actividad antimicrobiana de las especies de guajes reportadas como medicinales y caracterizar la composición química de los mismos.

6. HIPÓTESIS

Debido a que las semillas de las especies de *L. leucocephala* y *L. esculenta* fueron reportadas para el tratamiento de afecciones de posible origen infeccioso y que los extractos de hojas de estas especies fueron descritos por tener efecto antimicrobiano por los compuestos polares principalmente, se esperaría que los metabolitos fenólicos contenidos en las semillas tuvieran actividad biológica importante para cepas microbianas de interés médico.

7. OBJETIVO GENERAL

Determinar los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana de *L. leucocephala* y *L. esculenta* de la localidad de Tlayacapan, Morelos mediante un estudio de bioprospección.

CAPÍTULO I.

REVISIÓN DEL GÉNERO *Leucaena*

Como resultado del trabajo de gabinete y considerando la importancia de los estudios integrales, se preparó un manuscrito en formato “artículo de revisión” que será enviado a una revista indexada para su posterior publicación, el trabajo lleva por título: **“Especies del género *Leucaena* (Fabaceae) en México: Una revisión de su actividad antimicrobiana, mecanismos de acción, etnobotánica y fitoquímica. Species of the genus *Leucaena* (Fabaceae) in Mexico: A review of its antimicrobial activity, mechanisms of action, ethnobiology and phytochemistry”**, el cual se presenta a continuación.

Especies del género *Leucaena* (Fabaceae) en México: Una revisión de su actividad antimicrobiana, mecanismos de acción, etnobotánica y fitoquímica

*^aMora-Villa, M. A., ^aSerrano-Parrales, R., ^bJiménez-Estrada, M., ^cLira-Saade, R., ^aHernández-Delgado, T.

^a Laboratorio de Bioactividad de Productos Naturales, UBIPRO, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. De los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla 54090, Estado de México, México.

^b Laboratorio de Productos Naturales. Instituto de Química, UNAM, México. Circuito exterior s/num. Ciudad Universitaria, Alcaldía Coyoacan, C.P. 04510, Cd. de México.

^c Laboratorio de Recursos Naturales, UBIPRO, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. De los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla 54090, Estado de México, México.

RESUMEN

Las enfermedades infecciosas están entre las primeras causas de mortalidad a nivel mundial. Para lidiar con ello, se ha retomado la búsqueda de principios activos en las plantas. Este trabajo presenta una revisión de la literatura sobre el estado del conocimiento de las propiedades del género *Leucaena* contra agentes causantes de estas enfermedades. El género consta de 24 especies de árboles y arbustos, 13 de ellas presentes en México. Además de ser un recurso alimenticio y forrajero, seis especies en el país son reportadas como medicinales: *L. collinsii*, *L. esculenta*, *L. lanceolata*, *L. leucocephala*, *L. macrophylla* y *L. pulverulenta*. De éstas, *L. collinsii*, *L. esculenta* y *L. leucocephala* tienen estudios de sus características antimicrobianas *in vitro* sobre diferentes cepas de interés médico. Las hojas y semillas son las partes más utilizadas para aliviar distintas dolencias, sobre todo infecciones gastrointestinales por parásitos o bacterias. En los extractos polares de estas especies, se identificaron compuestos fenólicos, saponinas y alcaloides con propiedades antimicrobianas los cuales afectan la permeabilidad de la membrana, la activación enzimática, síntesis proteica, etc. Con base en el potencial antimicrobiano de estas especies, estudios etnobotánicos, fitoquímicos y de actividad biológica son fundamentales para contribuir en la búsqueda de nuevos fármacos.

Palabras clave: *Leucaena*, etnobotánica, fitoquímica, metabolitos secundarios, antimicrobianos.

Species of the genus *Leucaena* (Fabaceae) in Mexico: A review of its antimicrobial activity, mechanisms of action, ethnobiology and phytochemistry

ABSTRACT

Infectious diseases are among the leading causes of mortality worldwide. To deal with this problem, the search for active ingredients in plants has been resumed. This paper presents a review of the literature on the state of knowledge of the properties of the genus *Leucaena* against the causative agents of these diseases. The *Leucaena* genus consists of 24 species of trees and shrubs, with 13 species known from Mexico. In addition to being a food and forage resource, six species in the country are reported as medicinal: *L. collinsii*, *L. esculenta*, *L. lanceolata*, *L. leucocephala*, *L. macrophylla* and *L. pulverulenta*. It should be noted that *L. collinsii*, *L. esculenta* and *L. leucocephala* have *in vitro* antimicrobial studies on different strains of medical interest. The leaves and seeds are the most used parts to alleviate different illness, especially gastrointestinal infections due to parasites or bacteria. In the polar extracts of these species, phenolic compounds, saponins, and alkaloids with antimicrobial properties were identified, which affect membrane permeability, enzyme activation, protein synthesis, among others. Based on the antimicrobial potential of these species, ethnobotanical, phytochemical and biological activity studies are essential to contribute to the search for new drugs.

Key words: *Leucaena*, ethnobotany, phytochemistry, secondary metabolites, antimicrobials.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades humanas tienen diferentes causales. Sin embargo, las provocadas por agentes infecciosos son inquietantes por su contribución a la mortalidad a nivel mundial. Si bien, la mayor causa de defunción en el mundo es la cardiopatía isquémica, responsable del 16% del total de muertes en el mundo, las infecciones y sobre todo de las vías respiratorias inferiores siguen siendo la enfermedad transmisible más mortal del mundo, situándose como la cuarta causa de defunción y en países con bajos ingresos representa la segunda causa de mortalidad (OMS, 2017; OMS 2018, OMS, 2020). Aunado a esto, el uso continuo de fármacos promueve el desarrollo de resistencia antimicrobiana, con posibilidades de ser la primera causa de mortalidad a nivel mundial para el 2030 (OMS, 2017; Flatley, 2019; Miethke *et al.*, 2021).

Para lidiar con dicha problemática, se ha retomado la búsqueda de principios activos en los recursos vegetales, ya que las plantas son materia de fácil obtención, manejo, pocos cuidados y bajos costos para la mayoría de las comunidades humanas (Waizel, 2006); además, para el 70 a 80% de la población mundial las plantas medicinales constituyen el sistema de atención primaria de salud. (OMS, 2013; Royaka *et al.*, 2014). En el mundo hay un aproximado de 400,000 especies de plantas (374,000 spp.), alrededor de 90% (308,312 spp.) plantas con flores (Christenhusz & Byng, 2016; Biodiversidad Mexicana, 2021; Encyclopedia of Life, 2021^b). Se estima que entre 20,000 y 55,000 especies vegetales se han empleado

medicinalmente (Soejarto *et al.*, 2005), de las cuales solo una pequeña cantidad se ha investigado para desarrollar medicamentos. De todas, solo el 15 a 20% de las plantas terrestres han sido evaluadas (Abreu *et al.*, 2008). Finalmente, se calcula que menos del 10% de las plantas medicinales han sido estudiadas a fondo, considerando ensayos farmacológicos completos (Akerele, 1993; Llorente & Ocegueda, 2008). En consecuencia, las plantas medicinales representan un conjunto de materia prima para el descubrimiento de nuevos fármacos.

Una de las estrategias para la obtención de principios activos, que son generalmente producto del metabolismo secundario de las plantas, se centra en la búsqueda de los productos naturales en los taxa más diversos y utilizados en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades de origen infeccioso (Abreu *et al.*, 2008). Cabe resaltar que se conocen más de 100,000 metabolitos secundarios y sólo el 1% cuenta con estudios fitoquímicos (Bhalla *et al.*, 2005). Por su parte, 25 familias botánicas contienen más del 50% de la diversidad, lo que las hace excelentes para estudios de tipo biológico. Las familias Asteraceae, Poaceae, Orchidaceae y Fabaceae representan el primero, segundo, tercero y cuarto lugares consecutivamente en número de especies en México (Villaseñor, 2004).

Las leguminosas (Fabaceae) son una familia de plantas herbáceas, arbustivas o arbóreas, perennes y anuales, pertenecientes al orden Fabales. Constituyen un grupo de distribución cosmopolita asociada especialmente a climas cálidos. Los miembros de esta familia se reconocen principalmente por el fruto tipo legumbre, hojas compuestas y nódulos asociados a bacterias nitrificantes (Villaseñor, 2004; Lewis *et al.*, 2005; Watson y Dallwitz, 2008).

En la actualidad se han descrito e identificado aproximadamente 770 géneros y 20,140 especies. Un gran número tiene importancia económica y cultural en el ramo alimenticio (*Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum* y *Lens culinaris*), forrajero (*Leucaena leucocephala*, *Acacia farnesiana* y *Macroptilium atropurpureum*), tintóreo (*Indigofera* spp.), industrial (*Genista tinctoria* y *Glycyrrhiza glabra*), medicinal (*Astragalus garbancillo*, *Caesalpinia spinosa*, *Lupinus* spp. y *Senna* spp. entre otras) y ornamental (*Spartium junceum* y *Robinia pseudoacacia*) entre otros usos (Graham & Vance, 2003; Vibrans, 2010; Llamas & Acedo, 2016; Castañeda *et al.*, 2017^b; Stevens, 2017; Schikorr *et al.*, 2019; Hasanuzzaman *et al.*, 2020).

Biológicamente, las especies de esta familia son importantes fijadoras de nitrógeno atmosférico, transfiriéndolo al suelo gracias a las relaciones que mantienen con bacterias de la familia Rhizobiaceae (en su mayoría), mediante nódulos en sus raíces (Wunderlin, 1982; Sprent, 2001). Por otro lado, estas plantas albergan especies animales, con las cuales tienen diversas interacciones biológicas. Tal es el caso de la relación simbiótica de algunas especies de hormigas con plantas del género *Acacia*, donde la leguminosa brinda casa y alimento y el insecto proporciona protección a la planta ante depredadores (Graham & Vance, 2003).

Las interacciones biológicas y la fisiología de las plantas dependen, en parte, de la composición química característica de las especies de cada familia. Las especies de la familia presentan gran diversidad de alcaloides (verdaderos, protoalcaloides y pseudoalcaloides) como defensa ante la herbivoría. Uno de los más característicos es la mimosina, la cual es considerado como un agente tóxico y antinutricional (Yik *et al.*, 2011; NCBI, 2022). Además, es común la presencia de compuestos nitrogenados en las semillas (García, 2009). Su riqueza proteica y alta en compuestos glicosilados las hace importantes por el valor nutritivo de las

semillas. Compuestos fenólicos como los flavonoides están presentes en la mayoría de las especies de la familia, tales como kaempferol, quercetina y miricetina, además de protoantocianidinas y antocianinas que brindan color a las semillas y flores (Freire, 2006; García, 2009; Castañeda *et al.*, 2017^a).

Dentro de esta familia, se distinguen tres subfamilias con estrechas relaciones de evolución: Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae o Faboideae. El género *Leucaena* es uno de los 82 que tiene la subfamilia Mimosoideae. Su centro de origen fue en México y muchas de las especies han sido utilizadas para la alimentación, vivienda y terapéutica de diversas etnias del territorio mexicano (Zolla, 1980; Zárate, 1994; Rojas *et al.*, 2001). En estudios etnobotánicos y fitoquímicos hechos en México, se reportan efectos afrodisíacos, eupépticos, antiparasitarios y antimicrobianos de extractos de hojas y semillas de *L. leucocephala* y *L. esculenta* principalmente (Zárate, 1987; Román, 2015; Peralta *et al.*, 2017; Sepúlveda *et al.*, 2018; Mora *et al.*, 2021). Pero, se carece de una evaluación integral de los conocimientos acumulados hasta la fecha.

La selección de la literatura para esta revisión consistió en la búsqueda organizada de datos científicos sobre etnobotánica, actividad antimicrobiana y análisis fitoquímicos de las especies del género *Leucaena* (Fabaceae). Las bases de datos fueron: SciFinder (<https://scifinder.cas.org/>), Scopus (<http://www.scopus.com/>), PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), Google Scholars (<http://www.scholar.google.com/>) y Scielo (<http://www.scielo.org/>), principalmente. La búsqueda de artículos fue llevada a cabo también en diversas editoriales y agregadores como: American Chemical Society, Science Direct, Springer, Francis y Taylor, Wiley y BioMed Central, entre otras. Las palabras utilizadas en los términos de búsqueda tanto en español como en inglés fueron: *Leucaena*, metabolitos secundarios, análisis fitoquímicos, etnobotánica, composición química y actividad antimicrobiana. La literatura obtenida se cribó, eliminando artículos redundantes que se encuentran en diversas bases de datos. Se estudiaron los criterios de los artículos seleccionados, considerando principalmente la temática y que se centrasen en especies mexicanas. Fueron consultados un total de 120 fuentes de información donde 80 fueron artículos científicos, 20 páginas oficiales y boletines especializados, 17 libros y/o capítulos de estos y 3 tesis doctorales.

La presente revisión muestra aspectos biológicos, etnobotánicos y fitoquímicos reportados para las especies del género *Leucaena* en México haciendo énfasis en aquellas que han sido evaluados *in vitro* por su actividad antimicrobiana en cepas de interés médico. Con base en estas consideraciones, el potencial antimicrobiano de especies del género *Leucaena* fue analizado destacando también el mecanismo de acción de sus metabolitos secundarios.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Género *Leucaena* Benth.

El género *Leucaena* consta de 24 especies de árboles y arbustos, distribuidos desde Texas, EE. UU. hasta Perú. El centro de origen es México. Actualmente una especie tiene distribución pantropical debido a los fenómenos migratorios humanos e introducciones dirigidas, sobre todo por ser forrajera y de rápido crecimiento: *L. leucocephala* (Grether *et al.*, 2006; Govindarajulu *et al.*, 2011; Abair *et al.*, 2019). Morfológicamente las especies del

género son de hábitos arbóreos o arbustivos. Las hojas de *Leucaena* son siempre bipinnadas (de 2 a 60) y pecioladas, varían en tamaño (de 5 a 30 cm). Existe siempre una o más glándulas foliares, las cuales pueden ser funcionales como nectarios extraflorales en hojas y tener asociación con varias especies de hormigas. Las inflorescencias son más o menos esféricas; consisten de numerosas flores con cáliz y corola reducida, pero con numerosos estambres vistosos de color blanco o amarillo, incluso rojizos, que dan esa forma globosa característica. El fruto es dehiscente en ambas suturas, comprimido y de consistencia membranácea a cartácea. Las semillas son orbiculares o planas a biconvexas, castaño-rojizas o amarillentas; la testa a veces está endurecida y engrosada (Bentham, 1875; Zárate, 1994).

Popularmente en México son conocidos como “guajes”, esta palabra proviene del vocablo nahuatl “huaxin” que significa “vaina” y del cual emana también el nombre de “Oaxaca” uno de los 32 estados de México, y donde estas plantas son abundantes. (Zárate, 1994). Algunas especies tienen frutos y semillas comestibles y son parte importante de la gastronomía local; son usadas también en alimentación animal, en abonos verdes, conservación de suelos y son fuente vegetal de aceite combustible (NaturaLista, 2015). Además de ser utilizadas como recurso nutrimental, son un aporte medicinal importante; las hojas, los botones y las semillas son las partes más utilizadas para aliviar distintas dolencias, sobre todo referentes a infecciones gastrointestinales por parásitos o bacterias (Zárate, 1987; Zárate, 1994; Zárate, 1999; Peralta *et al.*, 2017; Zeineldin *et al.*, 2018). Además de la mimosina, agente antinutricional y antimicrobiano (Hegarty *et al.*, 1964; Tran *et al.*, 2016), también es reportado ácido cinámico, 3-O-galato de epicatequina, 3-O-arabinofuranosido de quercetina, 3-O-ramnosido de quercetina y apigenina (Aderogba *et al.*, 2010). Otros metabolitos encontrados en las hojas, flores, vainas y semillas son: taninos, antocianinas, glicósidos, saponinas, terpenos, cumarinas esteroideas y diversos compuestos fenólicos (Reda *et al.*, 2015; Savita & Preeti, 2015). En estudios antibacterianos, se reporta actividad de los extractos de hojas y semillas de *L. leucocephala*, principalmente sobre cepas de *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Nwe *et al.*, 2001; Mathur *et al.*, 2013; Savita & Preeti, 2015; Dago *et al.*, 2020), además de otras actividades biológicas antimicrobianas importantes.

México tiene un total de 13 especies de guajes, distribuidas a lo largo del país (Zárate, 1994; Trópicos, 2022), algunas de ellas han sido estudiadas a fondo en varios ámbitos, otras, por el contrario, carecen de estudios. En la tabla I se condensa la información correspondiente a las especies mexicanas del género *Leucaena* y a continuación se describe en detalla para cada especie.

***Leucaena collinsii* Britton & Ros**

Son árboles de 3.5 a 10 m de alto; tienen corteza estriada de color pardo con lenticelas prominentes de color ferrugíneo; ramas cilíndricas; pinnas (7-) 11-20 pares; folíolos (35-) 40-56 pares; la inflorescencia es color blanco crema o verdosa; el fruto es tipo vaina, pardo o rojizo oscuro, liso y con venación poco prominente. Se distribuye en el estado de Chiapas, México y en gran parte de Guatemala. Florece y fructifica de abril a julio y de julio a marzo, respectivamente. La especie es conocida localmente como “guaje colorado”, “guash” o “chijlip” (en tojolab'al significa dulce). *L. collinsii* subsp. *collinsii* es la única subespecie registrada en México (Zárate, 1994; Encyclopedia of Life, 2021^a).

En Chiapas, las semillas tiernas y crudas se consumen para aliviar enfermedades gastrointestinales, son reportadas como un agente antimicrobiano, específicamente como antihelmítico (Zárate, 1999; De la Cruz *et al.*, 2014) y antirreumático (Zárate, 1994). *L. collinsii* es utilizada mayoritariamente para alimentación humana, uso forrajero, cerca viva, leña y fabricación de utensilios (Argel *et al.*, 1998; Pinto *et al.*, 2005).

Químicamente, en *L. collinsii* se encuentran taninos condensados (Osborne & McNeill, 2001; Stewart & Dunsdon, 1998), polifenoles (Pinto *et al.*, 2009) y carotenoides α y β (Yeverino, 1997). Los estudios *in vitro* con extracto metanólico de *L. collinsii* mostraron una relación entre su contenido de polifenoles y su actividad antihelmítica (AH) contra *Haemonchus contortus*. El alto contenido de polifenoles parece aumentar la eficacia de los extractos de plantas contra *H. contortus*, según lo evaluado por el ensayo de inhibición de exfoliación de larvas (LEIA) (Castañeda *et al.*, 2017^a).

***Leucaena confertiflora* Zárate**

Son arbustos o arbolitos de 0.5 a 4.0 m de alto; con ramas cilíndricas glabras; pinnas de 7 a 8 pares; folíolos oblongos de 12 a 27 pares; la inflorescencia se presenta en fascículos compactos con corola rojiza; la infrutescencia es subcoriácea o cartácea, morena rojiza brillante; las semillas son aplanadas y de color rojizo oscuro. *L. confertifolia* se distribuye en Oaxaca, Puebla y Veracruz, principalmente en zonas cultivadas o silvestres. Florece y fructifica de enero a marzo y de junio a marzo, respectivamente. Es conocida por los lugareños como “guaje zacatzín”. *L. confertifolia* subsp. *confertifolia* y *L. confertifolia* subsp. *adenotheloidea* son las dos subespecies registradas (Zárate, 1994; Encyclopedia of Life, 2021^a).

En Chapulco, Puebla, las semillas son vendidas en los mercados para comerse crudas o en guisos diversos (Zarate, 1994). Las vainas inmaduras son utilizadas como alimento principalmente (Argel *et al.*, 1998). No se conocen usos medicinales de esta especie. Se han reportado taninos condensados en el extracto metanólico de las hojas (Dalzell *et al.*, 1998; McNeill *et al.*, 1998; Dalzell & Shelton, 2002).

***Leucaena cuspidata* Standl.**

Son arbustos o árboles de 1.5 a 5.0 m de alto; presentan ramas cilíndricas glabras o pelosas; pinnas de 5 a 9 (-14) pares; folíolos 15 a 40 pares (45); inflorescencia amarillenta globosa; el fruto es glabro, oblongo, color moreno a rojizo claro; las semillas son oblicuas, moreno claro a oscuro. Se distribuye desde Querétaro hasta las zonas boscosas del estado de Hidalgo. Florece y fructifica de diciembre a mayo y de julio a noviembre respectivamente. Es conocida por los lugareños como “huaxi”, “efe” en ñañú que significa “guaje”. *L. cuspidata* subsp. *cuspidata* y *L. cuspidata* subsp. *jacalensis* son las únicas subespecies registradas (Zárate, 1994; Encyclopedia of Life, 2021^a).

Su principal uso es el comestible, las semillas son consumidas crudas en tortillas (Zárate, 1994). Las vainas inmaduras son utilizadas como alimento, principalmente (Argel *et al.*, 1998). No está reportado uso medicinal para esta especie. Las investigaciones indican la presencia de proantocianidinas en el extracto metanólico de las hojas (Dalzell & Shelton, 2002).

***Leucaena diversifolia* (Schltdl.) Benth.**

Son árboles de 2 a 6 (-9) m de alto; tienen ramas cilíndricas con corteza cinérea con lenticelas abundantes, glabras; pinnas de 3 a 17 pares; foliolos de 18 a 20 (-60) pares; la inflorescencia es globosa y blanca o color crema; el fruto es de tipo vaina, glabro y coriáceo, café rojizo oscuro; las semillas son obovadas, ligeramente romas, moreno rojizas. La especie se distribuye en Veracruz, así como en el sur y occidente de México. Florece y fructifica de abril a agosto y de agosto a enero respectivamente. Las comunidades que albergan a esta especie la nombran como: “guaje chiquito”, “guaje de pájaro” y “guaje blanco”. *L. diversifolia* subsp. *diversifolia* y *L. diversifolia* subsp. *stenocarpa* son las únicas subespecies registradas (Zárate, 1994; Encyclopedia of Life, 2021^a).

Sus semillas son comestibles, la planta se utiliza principalmente como cerca viva, su follaje para forraje de animales domésticos y su madera para la construcción (Argel *et al.*, 1998). Después de *L. leucocephala*, *L. diversifolia* es la especie más cultivada a nivel mundial (Cuchillo *et al.*, 2018); sin embargo, no se conocen usos medicinales como en el caso del guaje blanco. Se reportan taninos condensados en el extracto metanólico de las hojas (Stewart & Dunsdon, 1998; Dalzell & Shelton, 2002).

***Leucaena esculenta* (DC.) Benth.**

Son árboles de 4 a 15 m de alto; con corteza lisa, color gris claro brillante o parduzca; ramas carinadas o cilíndricas; pinnas de 18 a 32 (-65) pares; foliolos 39 a 64 (-85) pares; la inflorescencia es blanca y globosa; el fruto es cartaceo, generalmente rojizo o pardo; las semillas son obovadas, castaño rojizas o amarillentas. Se distribuye en la sierra Madre del Sur, en la Depresión del Balsas, la Depresión Tehuacán-Cuicatlán-Quioquepec y las zonas de la Alta Mixteca. Florece y fructifica de julio a marzo y de noviembre a marzo respectivamente. Es nombrado por los pobladores como: “guaje de campo”, “guaje Castilla”, “colorado” y “guaje rojo” o en otros idiomas como: “oaxin”, “oaxin chichiltic”, “guashi”, “efe”, “diwa”, entre otros. *L. esculenta* subsp. *esculenta*, *L. esculenta* subsp. *paniculata* y *L. esculenta* subsp. *matudae* son las tres registradas para esta especie. Algunas de las características como épocas de floración y distribución geográfica varían considerando la subespecie que se trate (Zárate, 1994; Encyclopedia of Life, 2021^a).

Las vainas, semillas, hojas y brotes tienen amplio uso como alimento, se venden crudas en los mercados de las localidades y se usan para salsas o guisos. Se puede consumir seca y tostada (Zárate, 1997). Medicinalmente las hojas y semillas son usadas como afrodisíaco, eupéptico y para la gastralgia, siendo para enfermedades del estómago y como antiparasitario sus principales menciones (Peralta *et al.*, 2017). Se usa la corteza molida tópicamente para las heridas que no cicatrizan o para “curar heridas difíciles” y para infecciones de la piel (Zárate, 1999; Casas *et al.*, 2001; Alonso *et al.*, 2017). El comer la semilla con frecuencia fortalece los pulmones ante infecciones. Como contraindicación se menciona que al consumir las semillas crudas provoca la caída del cabello (Zárate, 1994).

Se encuentran taninos condensados en el extracto metanólico de hojas de la especie (Stewart & Dunsdon, 1998; Osborne & McNeill, 2001; Dalzell & Shelton, 2002; Barahona *et al.*, 2003) y triptaminas en la corteza (Zárate, 1994). Resultados positivos por pruebas coloridas demostraron presencia de alcaloides, saponinas, triterpenos y esteroides en los extractos de semillas del guaje rojo (Mora *et al.*, 2021).

Los extractos acuosos y metanólicos de hojas del guaje rojo, tienen efecto significativo contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* (Tapia *et al.*, 2003). Los extractos acuoso y metanólico de las semillas es efectivo contra cepas bacterianas de *E. coli* y *S. aureus* con halos de inhibición microbiana (en la prueba de difusión en agar) de 16 mm en promedio, de igual manera, fue efectivo contra *Candida glabrata*, una especie de hongo levaduriforme y *Aspergillus niger* y *Fusarium moniliforme*, que son hongos filamentosos de importancia médica (Mora *et al.*, 2021).

***Leucaena greggii* S. Watson**

Son árboles de 3 a 8 m de alto, glabrescentes; pinnas de 5 a 7 pares; folíolos de 15 a 30 pares; con inflorescencia amarillenta; frutos apiculados, glabros o velutinos; semillas rojizas, obovadas a rómbicas. Su distribución abarca los estados de Coahuila y Nuevo León. La floración y fructificación ocurre de abril a julio y de julio a noviembre respectivamente (Zárate, 1994; Encyclopedia of Life, 2021^a).

Los usos centrales de *L. greggii* son como leña y forraje para cabras y cerdos, debido a su bajo contenido de mimosina y su alta tolerancia a las heladas (Argel *et al.*, 1998; Dalzell, 2019). Funge como planta importante en sistemas agroforestales y silvopastoriles, después de *L. leucocephala*, en la zona occidente de México (Martínez, 2005). En la literatura no se ha reportado su uso medicinal. Se indica presencia de taninos condensados en el extracto metanólico de las hojas (Stewart & Dunsdon, 1998; Dalzell & Shelton, 2002), así como α y β caroteno en el extracto hexánico (Yeeverino, 1997).

***Leucaena involucrata* Zárate**

Es árbol de 5 a 7 m de alto; presenta corteza grisácea parda con lenticelas amarillentas orientadas horizontalmente; las ramas son cilíndricas y glabras; con pinnas de 15 a 21 pares; folíolos de 33 a 49 pares; las inflorescencias son globosas amarillentas; la infrutescencia es cartácea endurecida, color castaño claro; las semillas son subromboides comprimidas lateralmente, color castaño oscuro rojizo. Solo se encuentra en una zona pequeña de Sonora, por lo que es endémica del estado. Es conocida como “barra blanca” (Zárate, 1994; Encyclopedia of Life, 2021^a). Al ser una especie de distribución restringida, no se cuentan con suficientes colectas y estudios etnobotánicos correspondientes, por lo que se desconoce su uso (Zárate, 1994).

***Leucaena lanceolata* S. Watson**

Son árboles o arbustos de 1.5 a 6.0 (-12) m de alto, con ramas flexuosas, de glabras a pilosas; pinnas de 2 a 6 pares; folíolos de 2 a 7 pares; inflorescencia crema; fruto linear oblongo rojizo y brillante; las semillas son obovadas oblongas a elípticas, de color castaño rojizas. Crece a lo largo de la costa del Pacífico, desde Sonora hasta Chiapas. La floración y fructificación ocurre de septiembre a junio y de junio a diciembre respectivamente. Se le conoce con diversos nombres como “guajillo”, “bolillo”, “guaje sabanero”, “angelito”, entre otros. *L. lanceolata* subsp. *sousae* y *L. lanceolata* subsp. *lanceolata* son las dos subespecies registradas (Zárate, 1994; Encyclopedia of Life, 2021^a).

La especie se utiliza como cerca viva, material de construcción, leña y forraje de ganado, aunado a esto, su tolerancia a la salinidad la hace potencialmente útil en sitios salobres y cálidos (Zárate, 1998; Argel *et al.*, 1998). Se reporta también que la especie es muy visitada

por las abejas *Apis mellifera* en busca de néctar y polen para la producción de miel (Román *et al.*, 2013). La hoja tierna y cruda se consume como quelite en la zona de Oaxaca; las semillas de las subespecies de *L. lanceolata* varían en sabor, una es más dulce mientras que la otra es más amarga (Zárate, 1994). Medicinalmente, las hojas tiernas y las semillas crudas se utilizan para tratar diversas infecciones (Zárate, 1997; Zárate, 1999).

Químicamente, las hojas son ricas en compuestos nitrogenados (Román *et al.*, 2013) y taninos condensados (Stewart & Dunsdon, 1998). Es una especie estudiada en el ámbito nutricional para el ganado, pero no hay registros de estudios de índole farmacológico o medicinal.

***Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit**

Son árboles glabrescentes de 3 a 6 (-12) m de alto; con ramas cilíndricas; pinnas de 6 a 9 pares; foliolos de 9 a 18 (-24) pares; la inflorescencia es color blanco; el fruto es de tipo vaina oblongo, café y liso; las semillas son obovadas, moreno rojizo claro a oscuro. Se distribuye naturalmente en la península de Yucatán, el istmo de Tehuantepec y a lo largo del golfo de México. Naturalizada en todos los trópicos y ampliamente distribuida como planta cultivada. Florece y fructifica a lo largo de todo el año, dependiendo de la cantidad de agua disponible. Es conocida localmente como: “guaje blanco”, “guaje verde”, “liliaque”, “liliak”, “guash”, “huaxi”, “xaxim”. Tiene dos subespecies: *L. leucocephala* subsp. *leucocephala* y *L. leucocephala* subsp. *glabrata*. (Zárate, 1994; Encyclopedia of Life, 2021^a). Esta es la especie que cuenta con más información en los aspectos etnobiológicos, fitoquímicos y medicinales.

Las semillas tostadas son consumidas en tacos o como botanas; frescas se utilizan en varios guisos y como parte de salsas, comidas o postres; las semillas maduras son usadas como sustituto de café en varios pueblos de México (Lim, 2012). Son un importante recurso agroforestal y fuente nutricional del ganado en muchas zonas ganaderas, además de mejoradoras de suelos pobres por su asociación con bacterias nitrificantes (Drumond & Ribaski, 2010; Dueñas *et al.*, 2020). Es reportada actividad analgésica, anticancerígena, antiinflamatoria, antihelmíntica, antidiabética, antimicrobiana, entre otras (Lim, 2012). Las hojas y las semillas son empleadas contra enfermedades infecciosas gastrointestinales, así como en enfermedades de la piel y parasitarias (Zárate, 1999). Se usa para eliminar parásitos nemátodos de vida libre, como *Caenorhabditis elegans* (Ketzis, 2008).

Los estudios fitoquímicos reportan la presencia de flavonoides, saponinas, fenoles, terpenoides (Revathi, 2018) y taninos condensados (Stewart & Dunsdon, 1998; Espinoza *et al.*, 2003). Algunos compuestos han sido identificados mediante GC-MS como: neofitadieno (9.48%), octadecaeno (3.15%), 1-octadecieno (3.85%), fitol (52.51%) y hexacosano (7.26%) (Umaru *et al.*, 2018). Por otro lado, tres estudios fitoquímicos completos llevados a cabo por Chung-Yi y Yau-Der (2010^{a,b}) y Chen y Wang (2011) encontraron poliprenoles y esteroides. Los diez principales poliprenoles eran: ficaprenol-11, escualeno, lupeol, β -sitostenona, ácido transcumárico, ácido *cis*-coumarico, feofitina a, ester metílico de feoforbido a, 132-hidroxi-(132-S) metil de feoforbido b y aristofil c. Además, encontraron cuatro esteroides: 5 α , 8 α epidioxi-(24 ξ)-ergosta-6,22-dien-3 β ol, β -sitosterol, β -sitostenona y estigmastenona los cuales fueron aislados de la parte aérea.

L. leucocephala. presenta actividad inhibitoria sobre *E. coli* (Ketzis, 2008). Los taninos presentes en las hojas tienen efecto larvicida sobre *Haemonchus contortus* (Alonso *et al.*,

2008), del extracto acuoso de hojas sobre *Pheritima postuma* (Ramán *et al.*, 2018); del extracto clorofórmico sobre *Ascaris suum* (Villaseñor *et al.*, 1998); la fracción polifenólica del extracto etanólico sobre larvas de *H. contortus* (Ademola *et al.*, 2005). Además, muestra efecto acaricida del extracto etanólico de hojas sobre larvas de *Rhipicephalus microplus*, el cual ha sido asociado a metabolitos secundarios como terpenos, coumarinas, y sobre todo taninos (Fernández *et al.*, 2011; González *et al.*, 2019). El extracto con taninos mostró actividad antibacteriana contra ciertas bacterias Gram positivas y Gram negativas; se observó en *Staphylococcus epidermidis* (12 mm de diámetro), seguida de *Salmonella choleraesuis*, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter anitratus*, *S. aureus*, y la menor se encontró con *S. faecalis*, que produjo una zona de inhibición de 7.0 mm de diámetro (Abu *et al.*, 2016). Por otro lado, el extracto metanólico y acuoso de las semillas de guaje demostró actividad antibacteriana significativa contra cepas de *E. coli* y *S. aureus* y antifúngica sobre *C. glabrata*, *Trichophyton mentagrophytes* y *F. sporotrichioides* (Mora *et al.*, 2021). La parte oleosa del extracto hexánico de hojas de *L. leucocephala* se puede utilizar contra el tratamiento de enfermedades bacterianas, en particular contra las causadas contra *Klebsiella pneumoniae* y *S.aureus* (Umaru *et al.*, 2018).

***Leucaena macrophylla* Benth.**

Son árboles o arbustos de 1.5 a 12.0 m de alto; con ramas glabras o villosas; pinnas de 1 a 4 pares; foliolos de 1 a 4 pares; la inflorescencia es de color blanco crema; la infrutescencia es rojiza glabra, morena rojiza brillante; las semillas son oblongas y castaño rojizo. Es conocida desde Nayarit hasta Oaxaca, se encuentra en selvas bajas caducifolias y el borde de potreros. Su floración y fructificación es de octubre a diciembre (extendiéndose hasta abril). Es nombrada como “guaje blanco”, “guajillo”, “zacaguaje”, “guaje de venado”, “guaje de risa” o “guaje de cerro”. Tiene dos subespecies: *L. macrophylla* subsp. *macrophylla* y *L. macrophylla* subsp. *nelsonii* (Zárate, 1994; Encyclopedia of Life, 2021^a).

Las semillas de *L. macrophylla* se comen secas como esquites o tiernas en moles o guisos con salsas y las hojas como quelites en la zona sur de Morelos (Zárate, 1999), las vainas inmaduras son utilizadas principalmente como alimento (Argel *et al.*, 1998). Medicinalmente las hojas son usadas en infusión a bajas concentraciones pues es considerada tóxica y causante de pérdida de cabello (Zárate, 1997), también se usa en el tratamiento contra la fiebre causada por enfermedades infecciosas (Lawal *et al.*, 2010).

Químicamente, se ha reportado mimosina, así como compuestos con fósforo, como los fitatos, otros grupos de metabolitos secundarios en la especie son los polifenoles (García *et al.*, 2008) y los taninos condensados (Stewart & Dunsdon, 1998; Hernández *et al.*, 2015). No se cuenta con estudios antimicrobianos de esta especie.

***Leucaena pulverulenta* (Schltdl.) Benth.**

Es un árbol de 3 a 8 m de alto; con ramas cilíndricas; pinnas de 7 a 25 pares; foliolos de 25 a 54 pares; las inflorescencias son globosas, de color crema o blancas; la infrutescencia es oblonga, color castaño oscuro; las semillas son elípticas, moreno rojizas. Su distribución corresponde a la vertiente oriental de la sierra Madre Oriental, hasta su límite sur y continuando al sur con una porción de la sierra Madre del Sur. Su floración y fructificación es de febrero a julio y de marzo a enero respectivamente. Es conocida como “guañas”, “guashe” o “huache” (Zárate, 1994; Encyclopedia of Life, 2021^a).

Se utilizan los botones florales y las semillas tiernas para comidas diversas, mayoritariamente para alimentación humana, además la planta tiene uso forrajero, como cerca viva y leña (Argel *et al.*, 1998). Medicinalmente es reportada en la región totonaca, por usarse mezclada con otras plantas para curar males estomacales (Zárate, 1994; Zárate, 1999). Desde el punto de vista fitoquímico, se indica presencia de taninos condensados (Stewart & Dunsdon, 1998) y carotenoides α y β (Yeverino, 1997). No se cuenta con estudios antimicrobianos de esta especie.

***Leucaena retusa* Benth.**

Son arbolitos de 2-5 m de alto; con ramas glabrescentes; pinnas de 2 a 5; foliolos de 6 a 8 pares; la inflorescencia es de color amarillenta; la infrutescencia es linear oblonga y glabra, con semillas dispuestas oblicuamente; las semillas son obovadas, castaño rojizo oscuro. Esta especie se distribuye en el norte del país en los estados de Chihuahua y Coahuila. Es útil como forrajera y como restauradora de suelos (Zárate, 1994; Whisenant *et al.*, 1995; Encyclopédia of Life, 2021^a). No se encontraron referencias a otros usos ni propiedades medicinales conocidas. Únicamente taninos condensados son reportados en la literatura (Stewart & Dunsdon, 1998; Bayourthe *et al.*, 2014).

***Leucaena shannonii* Donn. Sm.**

Es un árbol de 2 a 9 m de alto; con ramas velutinas; pinnas de 4 a 8 pares; foliolos de 9 a 22 pares; la inflorescencia es blanca; el fruto oblongo de color café castaño y con semillas obovadas, castaño oscuro rojizo a amarillento. Su distribución abarca los estados de Campeche y Chiapas en México, así como los países de Guatemala, El Salvador, Honduras y Nicaragua. Florece y fructifica de junio a octubre y de octubre a marzo respectivamente. Es conocido como “cascahuité”, “guaje”, “guajillo” y “frijolillo” (Zárate, 1994; Encyclopédia of Life, 2021^a).

El único uso que se reporta para esta planta es como cerca viva en algunas localidades de Chiapas (Zárate, 1994). Tiene un alto valor como forraje de abejas, leña y postes (Argel *et al.*, 1998). En la literatura únicamente se reconoce la presencia de taninos condensados (Stewart & Dunsdon, 1998), así como α y β caroteno (Yeverino, 1997).

La tabla I resume los usos y muestra que diez especies son usadas como cerca viva (y leña), así que es él o los usos más importantes registrados. Seguido de ello, el uso alimenticio humano y forrajero para el ganado, se registra para nueve del total de especies vegetales. Medicinalmente se registró el uso de seis especies: *L. collinsii*, *L. esculenta*, *L. lanceolata*, *L. leucocephala*, *L. macrophylla* y *L. pulverulenta*, principalmente para tratar afecciones gastrointestinales, aunque únicamente tres de estas especies (*L. collinsii*, *L. esculenta* y *L. leucocephala*) tiene reportes de actividades antimicrobianas en estudios *in vitro*. Por su parte, el uso melífero se reporta para dos especies: *L. lanceolata* y *L. shannonii*.

Por otro lado, en la tabla I se observa que las hojas son la parte vegetal más utilizada (10 especies), seguida de las semillas (8 especies), vainas (4 especies), corteza (3 especies) y botones o brotes (2 especies).

En relación con los metabolitos reportados y los extractos de los cuales se obtuvieron, es evidente que en 12 de las 13 especies los extractos de análisis fueron polares, los cuales utilizaron solventes como agua, etanol y metanol principalmente. En estos estudios se

encuentra presencia importante de compuestos fenólicos como taninos y otros polifenoles responsables de tener actividad antimicrobiana significativa sobre diferentes cepas de interés médico como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* principalmente (Tabla I).

Finalmente, se identificó una especie que no cuenta con información acerca de los usos, parte vegetal más usada, reportes fitoquímicos o farmacológicos: *L. involucrata*. Además, cabe mencionar que los resultados reportados no son mutuamente excluyentes, por lo que una especie puede tener varios usos y utilizar distintas partes de la planta al mismo tiempo.

Tabla I. Distribución, usos y aspectos etnobotánicos, fitoquímicos y de actividades biológicas de las 13 especies mexicanas del género *Leucaena*.

Especies	Distribución	Usos	Parte de la planta usada	Extracto	Metabolitos identificados	Actividad antimicrobiana	Cepas susceptibles	Referencias
<i>L. collinsii</i>	Chiapas	Alimenticio, forraje, cerca viva, leña, fabricación de utensilios y medicinal	Hojas	E. m., E. h.	Taninos condensados polifenoles y carotenoides α y β caroteno	Antihelmíntica	<i>Haemonchus contortus</i>	Zárate, 1994; Yeverino, 1997; Argel <i>et al.</i> , 1998; Stewart & Dunsdon, 1998; Zárate, 1999; Osborne & McNeill, 2001; Pinto <i>et al.</i> , 2005; De la Cruz <i>et al.</i> , 2014; Castañeda <i>et al.</i> , 2017 ^b
<i>L. confertiflora</i>	Oaxaca, Puebla y Veracruz	Alimenticio	Semillas y vainas	E. m.	Taninos condensados	N.r.	N.r.	Zárate, 1994; Argel <i>et al.</i> , 1998; Dalzell <i>et al.</i> , 1998; McNeill <i>et al.</i> , 1998; Dalzell & Shelton, 2002
<i>L. cuspidata</i>	Hidalgo y Querétaro	Alimenticio	Semillas y vainas	E. m.	Taninos condensados	N.r.	N.r.	Zárate, 1994; Argel <i>et al.</i> , 1998; Dalzell & Shelton, 2002
<i>L. diversifolia</i>	Veracruz	Alimenticio, forraje, cerca viva, leña y construcción	Hojas, semillas y corteza	E. m.	Taninos condensados	N.r.	N.r.	Zárate, 1994; Argel <i>et al.</i> , 1998; Stewart & Dunsdon, 1998; Dalzell & Shelton, 2002
<i>L. esculenta</i>	Depresión del Balsas y Sierra Madre del Sur	Alimenticio, cerca viva, fabricación de utensilios y medicinal	Vainas, semillas, hojas, brotes y corteza	E. m.	Taninos condensados, triptaminas, alcaloides, saponinas, triterpenos y esteroides	Antiprotozoaria, antibacteriana y antifúngica	Protozoarios: <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Giardia lamblia</i> Bacterias: <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	Zárate, 1994; Stewart & Dunsdon, 1998; Osborne & McNeill, 2001; Dalzell & Shelton, 2002; Barahona <i>et al.</i> , 2003; Tapia <i>et al.</i> , 2003; Peralta <i>et al.</i> , 2017; Mora <i>et al.</i> , 2021

							Hongos: <i>Candida glabrata</i> , <i>Aspergillus niger</i> y <i>Fusarium moniliforme</i>	
<i>L. greggii</i>	Coahuila y Nuevo León	Forraje, cerca viva y leña	Hojas	E. m.	Taninos condensados y carotenoides α y β caroteno	N.r.	N.r.	Zárate, 1994; Yeverino, 1997; Argel <i>et al.</i> , 1998; Dunsdon, 1998; Dalzell & Shelton, 2002; Martínez, 2005; Stewart & Dalzell, 2019
<i>L. involucrata</i>	Sonora	N.r.	N.r.	N.r.	N.r.	N.r.	N.r.	Zárate, 1994
<i>L. lanceolata</i>	A lo largo de la costa del Pacífico, de Sonora hasta Chiapas	Alimenticio, forraje, cerca viva, leña, melífera y medicinal	Hojas y semillas	E. m.	Compuestos nitrogenados y taninos condensados	N.r.	N.r.	Zárate, 1994; Zárate, 1997; Argel <i>et al.</i> , 1998; Stewart & Dunsdon, 1998; Zárate, 1998; Zárate, 1999; Román <i>et al.</i> , 2013
<i>L. leucocephala</i>	En la Península de Yucatán, el Istmo de Tehuantepec y a lo largo del Golfo de México	Alimenticio, forraje, cerca viva y medicinal	Hojas y semillas	E. a., E. e., E. c., E. h., E. m.	Flavonoides, saponinas, fenoles, taninos condensados, glicósidos cardíacos y terpenoides. Poliprenoles: ficaprenol-11, escualeno, lupeol, β -sitostenona, ácido transcumarico, ácido cis-coumarico, feofitina-a, feoforbido-a metil	Antihelmíntica, acaricida, antibacteriana y antifúngica	Helminetos: <i>Caenorhabditis elegans</i> , <i>Haemonchus contortus</i> <i>Pheretima posthuma</i> , <i>Ascaris suum</i> Ácaros: <i>Rhipicephalus microplus</i> Bacterias: <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus</i> .	Zárate, 1994; Zárate, 1999; Stewart & Dunsdon, 1998; Villaseñor <i>et al.</i> , 1998; Espinoza <i>et al.</i> , 2003; Ademola <i>et al.</i> , 2005; Alonso <i>et al.</i> , 2008; Ketzis, 2008; Chung-Yi & Yau-Der (2010 ^{a,b}); Drumond & Ribaski, 2010; Chen & Wang 2011; Fernández, 2011; Lim, 2011; Abu Zarin <i>et al.</i> , 2016; Ramán <i>et al.</i> , 2018; Revathi, 2018; Umaru <i>et al.</i> , 2018;

					<p>ester, metil-132-hidroxi- (132-S) - feoforbido-b y aristofil-c.</p> <p>Esteroides: 5α, 8α epidioxi- (24ξ) - ergosta-6,22-dien-3βol, β-sitosterol, β-sitostenona y stigmastenona</p>		<p><i>epidermidis</i>, <i>Salmonella choleraesuis</i>, <i>Proteus vulgaris</i>, <i>Enterococcus faecium</i>, <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Acinetobacter anitratus</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Streptococcus faecalis</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i></p> <p>Hongos: <i>Candida glabrata</i>, <i>Trichophyton mentagrophytes</i> y <i>Fusarium sporotrichioides</i></p>	González <i>et al.</i> , 2019; Dueñas <i>et al.</i> , 2020; Mora <i>et al.</i> , 2021
<i>L. macrophylla</i>	Desde Nayarit hasta Oaxaca	Alimenticio, forraje y medicinal	Semillas, hojas y vainas	E.a.	Fitatos, polifenoles y taninos condensados	N.r.	N.r.	Zárate, 1994; Zárate, 1997; Argel <i>et al.</i> , 1998; Zárate, 1999; García <i>et al.</i> , 2008; Lawal <i>et al.</i> , 2010; Stewart & Dunsdon, 1998; Hernández <i>et al.</i> , 2015
<i>L. pulverulenta</i>	Sierra Madre Oriental	Alimenticio, forraje, cerca viva, leña y medicinal	Botones, semillas y hojas	E.a. E.h.	Taninos condensados y carotenoides α y β caroteno	N.r.	N.r.	Zárate, 1994; Yeveverino, 1997; Argel <i>et al.</i> , 1998; Stewart & Dunsdon, 1998; Zárate, 1999
<i>L. retusa</i>	Chihuahua y Coahuila	Forrajera y restauradora de suelos	Hojas	E.a.	Taninos condensados	N.r.	N.r.	Zárate, 1994; Whisenant <i>et al.</i> , 1995; Stewart & Dunsdon, 1998; Bayourthe <i>et al.</i> , 2014

<i>L. shannonii</i>	Campeche y Chiapas	Forraje de abejas, leña, postes y cerca vida	Hojas y corteza	E.a., E.h.	Taninos condensados y carotenoides α y β caroteno	N.r.	N.r.	Zárate, 1994; Yeverino, 1997; Argel <i>et al.</i> , 1998; Stewart & Dunsdon, 1998
---------------------	--------------------	--	-----------------	------------	--	------	------	---

E.a. Extracto acuoso; E.c. Extracto clorofórmico; E.e. Extracto etanólico; E.h: Extracto hexánico; E.m. Extracto metanólico; N.r. No reportado.

Mecanismos de acción antimicrobiano

Los mecanismos de acción antimicrobianos de los productos naturales son variados y dependen del tipo de moléculas que intervengan en las reacciones y del blanco microbiano a atacar. Los precursores de los metabolitos secundarios son los metabolitos primarios, por lo que suelen agruparse por la ruta biosintética de la cual se originan. A continuación, en la tabla II, se presentan los mecanismos de acción por grupos de productos naturales mostrando también, los metabolitos registrados en especies del género *Leucaena*. Clasificación tomada de Whittaker y Feeny (1971) con algunas modificaciones modernas (Anaya, 2003).

Respecto a los terpenos, el género *Leucaena* reporta presencia de triterpenos, terpenoides, diferentes poliprenoles (polímeros lineales de isopreno, unidad conformacional de los terpenos) como ficaprenol-11, escualeno, lupeol, β -sitostenona, ácido transcumarico, ácido cis-coumarico, feofitina-a, feoforbido-a metil ester, metil-132-hidroxi- (132-S) -feoforbido-b y aristofil-c y esteroides (conformados por terpenos precursores con anillos de ciclopentanoperhidrofenantreno) con como: 5α , 8α epidioxi- (24 ξ) -ergosta-6,22-dien-3 β ol, β -sitosterol, β -sitostenona y stigmastenona, estos últimos aislados de *L. leucocephala* (Chen & Wang 2011). Estos compuestos interactúan con la membrana celular y alteran la permeabilidad debido a su carácter no polar, por tanto, también crean una interferencia de la relación lípido-proteína (Sharma *et al.*, 2017; Al-Aamri *et al.*, 2018). Debido a esto, los extractos etanólicos, hidroalcohólicos y hexánicos de semillas y hojas son estudiados por sus efectos acaricidas, antihelmínticos y ovicidas principalmente, actuando sobre la fase de huevos y larvas donde la reserva lipídica es alta (González *et al.*, 2019; Rivero *et al.*, 2019; López *et al.*, 2022).

Por su parte, se identificó presencia de ácidos fenólicos tales como ácido caféico, ácido gálico, ácido p-cumárico, ácido cinámico y ácido tánico, los cuales actúan formando puentes de hidrógeno con las sustancias que integran las membranas de los microorganismos a través de la reacción de los grupos OH⁻ con grupos amino, de esta manera alteran la permeabilidad celular y por tanto su viabilidad (Teffo *et al.*, 2010). De igual manera, estos ácidos promueven la disrupción celular, por la formación de iones perjudiciales y también favorecen la quelación de iones como el Mg²⁺ (Wu *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018). Los flavonoides como la quercetina, catequina y sus derivados pueden aumentar la permeabilidad de la membrana citoplasmática, alterar el ácido nucleico y modificar las proteínas en las células bacterianas (Khameneh *et al.*, 2021; Sinsinwar & Vadivel, 2020). El mecanismo de acción antimicrobiana de los taninos condensados, comprende principalmente la inactivación enzimática a través de la formación de complejos con proteínas extracelulares y solubles (por su carácter polar) (Teffo *et al.*, 2010). De igual manera son sustancias quelantes formando complejos con los iones férrico o cúprico presentes en la membrana bacteriana ya que los grupos electronegativos de los polisacáridos son sitios de atracción de cationes metálicos (Vázquez *et al.*, 2018).

Las saponinas, un grupo de metabolitos glicosilados también reportados para las especies del género, actúan sobre las membranas bacterianas (principalmente) como agentes surfactantes, alterando la permeabilidad y fluidez de la membrana creando efectos detergentes en las mismas (Hernández & Hermosilla, 2014).

Finalmente, la mimosina, el compuesto nitrogenado presente en muchas leguminosas, actúa inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos y evitando así la división celular. Esta sustancia es tóxica y antinutricional (Cushnie *et al.*, 2014).

Tabla II. Mecanismos de acción de productos naturales en microorganismos bacterianos y los reportados para el género *Leucaena*

Grupo de metabolito	Producto natural	Metabolito reportado	Mecanismo de acción	Referencia
Terpenos	Aceites esenciales Esteriodes Poliprenoles	Poliprenoles: ficaprenol-11, escualeno, lupeol, β -sitostenona, ácido transcumarico, ácido cis-coumarico, feofitina-a, feoforbido-a metil ester, metil-132-hidroxi- (132-S) -feoforbido-b y aristofil-c. Esteroides: 5α , 8α epidioxi- (24 ξ) -ergosta-6,22-dien-3 β ol, β -sitosterol, β -sitostenona y stigmastenona	Interacción con la membrana celular y alteración de la permeabilidad. Interferencia de la relación lípido-proteína.	Núñez <i>et al.</i> , 2012; Sharma <i>et al.</i> , 2017; Al-Aamri <i>et al.</i> , 2018
	Lactonas sesquiterpénicas	No hay reporte	Forman enlaces covalentes alterando las funciones enzimáticas	Gyawali <i>et al.</i> , 2014; Wink, 2003
Compuestos fenólicos	Quinonas	No hay reporte	Reacciones de oxidación y reducción en adhesinas de superficie. Inactivación de proteínas. Reacción con grupos amino, hidroxilo y sulfhidrilo.	Cowan, 1999
	Ácidos fenólicos y flavonoides	Ácidos fenólicos: ácido caféico, ácido gálico, ácido p-cumárico, ácido cinámico y ácido tánico Flavonoides: Catequina epicatequina-3-O-galato, quercetina-3-O-arabinofuranosido, quercetina-3-O-ranmosido y apigenina	Reacción de los grupos OH con grupos amino, formación de puentes de hidrógeno e iónicos. Inhibición de enzimas. Alteración de la permeabilidad celular. Modificar las proteínas de las células bacterianas.	Cowan, 1999; Teffo <i>et al.</i> , 2010; Wu <i>et al.</i> , 2016; Li <i>et al.</i> , 2018; Khameneh <i>et al.</i> , 2021; Sinsinwar & Vadivel, 2020
	Cumarinas	No hay reporte	Inhiben el ADN girasa y topoisomerasa I y demás enzimas para la transcripción.	Cowan, 1999

			Agentes intercalantes en el ADN.	
	Flavonas	Apigenina	Alteran la estructura de los ácidos nucleicos. Inhiben la síntesis de ADN o ARN. Agentes intercalantes en el ADN formando puentes de hidrogeno.	Cowan, 1999; Teffo <i>et al.</i> , 2010
	Taninos	Presencia de taninos condensados, sin identificar el tipo	Inactivación enzimática. Forman complejos con proteínas extracelulares y solubles. Forman complejos con metales por quelación con iones férrico o cúprico.	Cowan, 1999; Ávalos & Pérez, 2009
Glicósidos	Glicósidos cianogénicos	No hay reporte	Liberación de HCN, el cual inhibe cadena respiratoria mitocondrial.	Sharma <i>et al.</i> , 2017; García, 2004
	Saponinas	Presencia de saponinas, sin identificar el tipo	Alteración de la permeabilidad y fluidez de la membrana celular por actuar como agentes surfactantes.	Wink, 2003; Hernández & Hermosilla, 2014; Lozada <i>et al.</i> , 2017
Alcaloides	Alcaloides	Mimosina	Inhiben síntesis de ácidos nucleicos. Alteración de la homeostasis bacteriana y la membrana plasmática. Inhibición de la división celular. Agentes intercalantes en el ADN.	Vogt, 1991; Moreno <i>et al.</i> , 2008; Cushnie <i>et al.</i> , 2014

ADN: ácido desoxiribonucleico, ARN: ácido ribonucleico, OH: grupos hidroxilo, HCN: ácido cianhídrico.

CONCLUSIONES

Seis de las trece especies del género *Leucaena* tenían reportes de usos medicinales, lo que las hace una fuente potencial de recursos y tratamientos terapéuticos futuros; cabe resaltar que únicamente tres de esas trece especies tienen estudios antimicrobianos sobre diferentes cepas de interés médico: *L. collinsii*, *L. esculenta* y *L. leucocephala*. Ésta última especie, de distribución pantropical, es la que cuenta con la mayor cantidad de información en muchos ámbitos de investigación. Las hojas y semillas son las partes vegetales más utilizadas por las poblaciones humanas. Los principales usos de las especies en México se centran en el forraje animal, alimenticio y cerca viva. En los extractos polares, principalmente los metanólicos, se identificaron una serie de metabolitos secundarios como taninos condensados, mimosina y algunos compuestos fenólicos como ácidos fenólicos y flavonoides, los cuales pueden explicar sus propiedades antimicrobianas. La actividad antimicrobiana de los extractos fue principalmente contra parásitos helmintos en etapa larval o de huevo, seguidos de bacterias y finalmente para algunas cepas de hongos. Estudios que involucren aspectos fitoquímicos, etnofarmacológicos y mecanismos de acción son escasos para las especies de este género y requieren ser más profundos, para demostrar la efectividad, vía de acción y uso seguro de los productos herbales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Conacyt, a la UNAM y al Posgrado en Ciencias Biológicas por permitir y promover el trabajo científico otorgando una beca de posgrado con número de CVU de 777911. Agradecemos la cooperación del Dr. Erick Nolasco y la Dra. Julieta Orozco por sus comentarios en la realización del trabajo.

REFERENCIAS

- Abair, A., Hughes, C.E. & Bailey, C.D. (2019). The evolutionary history of *Leucaena*: Recent research, new genomic resources and future directions. *Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales*, **7**(1), 65-73. [https://doi.org/10.17138/TGFT\(7\)65-73](https://doi.org/10.17138/TGFT(7)65-73)
- Abreu, G., Orlando, A. & Cuéllar, C.A. (2008). Estrategias en la selección de las plantas medicinales a investigar. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, **13**(3).
- Abu, Z.M., Wan, H.Y., Isha, A. & Armania, N. (2016). Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic potential of condensed tannins from *Leucaena leucocephala* hybrid-Rendang. *Food Science and Human Wellness*, **5**(2), 65-75. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2016.02.001>
- Ademola, I.O., Akanbi, A.I. & Idowu, S.O. (2005) Comparative nematocidal activity of chromatographic fractions of *Leucaena leucocephala* seed against gastrointestinal sheep nematodes. *Pharmaceutical Biology*, **43**(7), 599-604. <https://doi.org/10.1080/13880200500301761>
- Aderogba, M.A., Mc Gaw, L.J., Bezabih, B.T. & Abegaz, B.M. (2010). Antioxidant activity and cytotoxicity study of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit leaf extract constituents. *Nigerian Journal of Natural Products and Medicine*, **13**(1), 65-68. <https://doi.org/10.4314/njnpm.v13i1.61612>
- Akerele, O. (1993). Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. *Medicina tradicional. Foro mundial de la salud*. **14**(4), 390-395.
- Al-Aamri, M.S., Al-Abousi, N.M., Al-Jabri, S.S., Alam, T. & Khan, S.A. (2018). Chemical composition and *in vitro* antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil of *Citrus aurantifolia* L. leaves grown in Eastern Oman. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, **13**(2), 108-112. <https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2017.12.002>

- Alonso, A.J., Domínguez, F., Ruiz, A.J., Campos, N., Zapata, J.R., Carranza, C. & Maldonado, J.J. (2017). Medicinal Plants from North and Central America and the Caribbean Considered Toxic for Humans: The Other Side of the Coin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2017**(1), 1-28 <https://doi.org/10.1155/2017/9439868>
- Alonso, M.A., Torres, J.F., Sandoval, C.A., Aguilar, A.J. & Hoste, H. (2008). *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniferous plant extracts. *Veterinary Parasitology*, **153**(3-4), 313-319. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.01.042>
- Anaya, A.L. (2003). *Ecología Química*. México D.F. : Plaza y Valdés.
- Argel, P.J., Lascano, C.E. & Ramírez, L. (1998). *Leucaena in Latin American farming systems: Challenges for development*. Cali, Colombia: Consorcio Tropileche.
- Ávalos, A. & Pérez, E.C. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Serie Fisiología Vegetal*, **2** (3), 119-145.
- Barahona, R., Lascano, C.E., Narvaez, N., Owen, E., Morris, P. & Theodorou, M.K. (2003). *In vitro* degradability of mature and immature leaves of tropical forage legumes differing in condensed tannin and non-starch polysaccharide content and composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **83**(12), 1256-1266. <https://doi.org/doi:10.1002/jsfa.1534>
- Bayourthe, C. & Ali-Haimoud, L.D. (2014). Les extraits de plantes chez le ruminant: effets sur les fermentations dans le rumen et la qualité lipidique des produits animaux. *INRAE Productions Animales*, **27**(4), 317-328. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2014.27.4.3079>
- Bentham, G. (1875). Revision of the suborder Mimosaceae. *Transactions of the Linnean Society of London*, **30**(3), 335-668.
- Bhalla, R., Narasimhan, K. & Swarup, S. (2005). Metabolomics and its role in understanding cellular responses in plants. *Plant Cell Reports*, **24** (1), 562-57. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0054-9>
- Biodiversidad Mexicana (2021). Disponible en: <https://www.biodiversidad.gob.mx/especies/cuantasesp#dos> (Consultado en abril, 2021).
- Casas, A. (2001). Silvicultura y domesticación de plantas en Mesoamérica. En Rendon-Aguilar, B., Rebollar-Domínguez, S., Caballero-Nieto, J. & Martínez-Alfaro, M.A. (Eds). *Plantas, Cultura y Sociedad: Estudio sobre la Relación entre Seres Humanos y Plantas en los Albores del Siglo XX* (pp. 123-159). Ciudad de México, México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Castañeda, R., Gloria, S., Torres, A., Sandoval, C., González, P., Parra, T. & Céline, M. (2017^a) Is there a negative association between the content of condensed tannins, total phenols, and total tannins of tropical plant extracts and *in vitro* anthelmintic activity against *Haemonchus contortus* eggs? *Parasitology Research*, **116** (1), 3341-3348. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5650-4>
- Castañeda, R., Gutiérrez, H., Carrillo, É. & Sotelo, A. (2017^b). Leguminosas (Fabaceae) silvestres de uso medicinal del distrito de Lircay, provincia de Angaraes (Huancavelica, Perú). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, **16**(2), 136-149.
- Chen, C.Y. & Wang, Y.D. (2011). Secondary Metabolites from *Leucaena leucocephala*. *Chemistry of Natural Compounds*, **47**(1), 145-146.
- Christenhusz, M. J. M., & Byng, J. W. (2016). The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, **261**(3), 201. <https://doi:10.11646/phytotaxa.261.3.1>
- Chung-Yi, C. & Yau-Der, W. (2010^a). Polyprenol from the whole plants of *Leucaena leucocephala*. *Journal of Environmental Protection*, **1**,70-72. <https://doi.org/10.4236/jep.2010.11009>
- Chung-Yi, C. & Yau-Der, W. (2010^b). Steroids from the whole plants of *Leucaena leucocephala*. *Journal of Environmental Protection*, **1**,31-33. <https://doi.org/10.4236/ajac.2010.11004>
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**(4), 564-582. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>
- Cuchillo, H.M., Quiroz, E., Silva, L.M., Sotelo, M.E., Michael, P. & Delgadillo, P.C. (2018). *Leucaena diversifolia* (Schltdl.) Benth. En: Palma, G. & Gonzaéz, I.C. (Compil.) *Recursos arbóreos y arbustivos tropicales para una ganadería bovina sustentable*. (pp. 76-82) Colima, México: Universidad de Colima.
- Cushnie, T.P.T., Cushnie, B. & Lamb, A.J. (2014). Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **44**,377-386. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.06.001>
- Dago, Y., Milian, J., Calzadilla, K., Redonet, M., López, Y. & Hernández, 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.
- Dalzell, S. & Shelton, H. (2002). Genotypic variation in proanthocyanidin status in the *Leucaena* genus. *The Journal of Agricultural Science*, **138**(2), 209-220. <https://doi.org/10.1017/S0021859601001848>

- Dalzell, S. (2019). *Leucaena* cultivars current releases and future opportunities. *Tropical Grasslands*, **7**(2), 56-64. [https://doi.org/10.17138/tgft\(7\)56-64](https://doi.org/10.17138/tgft(7)56-64)
- Dalzell, S.A., Stewart, J.L., Tolera, A. & McNeill, D.M. (1998). Chemical composition of *Leucaena* and implications for forage quality. En: Shelton, H.M., Gutteridge, R.C., Mullen, B.F. & Bray, R.A. (Eds). *Leucaena - adaptation, quality and farming systems*. (pp. 227-246) Canberra, ACT, Australia. ACIAR.
- De la Cruz, L., Guzman, M. & Viveros, E. (2014). Traditional Medicinal Plants Used for the Treatment of Gastrointestinal Diseases in Chiapas, México. *World Applied Sciences Journal*, **31** (4), 508-515. <https://doi.org/10.5829/jidosi.wasj.2014.31.04.8381>
- Drumond, M.A. & Ribaski, J. (2010). *Leucena (Leucaena leucocephala)*: leguminosa de uso múltiple para o semiárido brasileiro. Embrapa Florestas-Comunicado Técnico (INFOTECA-E).
- Dueñas, Y.D., Domínguez, J.C., Reyes, K.C., Miranda, M.D., Quintana, Y.L. & Guanche, L.H. (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.
- Encyclopedia of Life (EOL). (2021^a). *Leucaena*. Disponible en: <https://eol.org/pages/28132> (Consultado en mayo 2021)
- Encyclopedia of Life (EOL). (2021^b). What is Biodiversity? Disponible en: <https://eol.org/docs/discover/plants> (Consultado en agosto 2021)
- Espinoza, F., Díaz, Y., Requena, F., Araque, C.A., Perdomo, E. & León, L. (2003). Selectivity, nutritive value and resistance to the psyllid insect of *Leucaena leucocephala* accessions. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, **11**(3).
- Fernández, A., Alonso, M.A., Acosta, R., Torres, J.F., Sandoval, C.A. & Rodríguez, R.I. (2011). *In vitro* acaricidal effect of tannin rich plants against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, **75** (2),113-118. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.09.016>
- Flatley, P.B. (2019). *Infectious Diseases*. U.S. Department of Health and Human Services National Institutes of Health. MedlinePlus.
- Freire, E. (2006). *Eudicotiledoneas Escenciales-Clado Rosides-Eurosides I-Fabales: Fabaceae*. La Plata. Argentina: Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura.
- García, B. & Francisco, J. (2009) *Familia Fabaceae*. Valencia, España: Universidad Politécnica de Valencia.
- García, D.E. (2004). Principales factores antinutricionales de las leguminosas forrajeras y sus formas de cuantificación. *Pastos y Forrajes*, **27**(2).
- García, D.E., Wencomo, H.B., Medina, M.G., Noda, Y., Cova, L.J. & Spengler, I. (2008). Evaluación de la calidad nutritiva de siete ecotipos de *Leucaena macrophylla* (Benth.) en un suelo ferralítico rojo lixiviado. *Revista de la Facultad de Agronomía*, **25**(1), 43-67.
- González, L.G., Ojeda, M.M., Casanova, L.F., Oros, O.I., Hernández, L.I., Piñeiro, Á.T. & Rodríguez, R.I. (2019). *In vitro* acaricide activity of extracts from three *Leucaena* spp. genotypes versus *Rhipicephalus microplus*. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, **10**(3), 692-704. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i3.4822>
- Govindarajulu, R., Hughes, C.E. & Bailey, C.D. (2011). Phylogenetic and population genetic analyses of diploid *Leucaena* (Leguminosae; Mimosoideae) reveal cryptic species diversity and patterns of divergent allopatric speciation. *American Journal of Botany*. **98** (1), 2049-2063. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100259>
- Graham, P.H. & Vance, C.P. (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, **131**(1), 872-877. <https://doi.org/10.1104/pp.017004>
- Grether, R., Martínez, M.L. & Zárate, S. (2006). *Mimosaceae*. Tribu *Mimoseae*. En: Dávila, A.P.D., Villaseñor, R., Medina, L. & Téllez, V. (Eds.). *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. (pp. 18-42) México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gyawali, R. & Ibrahim, S.A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, **46**, 412-429. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.047>
- Hasanuzzaman, M., Araújo, S., Gill, S.S. (2020). *The Plant Family Fabaceae*. Singapur: Springer Singapur.
- Hegarty, M.P., Schinkel, P.G. & Court, R.D. (1964). Reaction of sheep to the consumption of *Leucaena glauca* Benth. and to its toxic principle mimosine. *Australian Journal of Agricultural Research*, **15**, 153-157.
- Hernández, A.C. & Hermosilla, V.J. (2014). Efecto de la concentración de saponinas en la actividad hemolítica de extractos de ocho plantas de uso medicinal en Guatemala. Tesis. Guatemala.
- Hernández, M.D., Sosa, M.E. & Cecon, E. (2015). *Leucaena macrophylla*: An ecosystem services provider? *Agroforestral System*, **89**, 163-174. <https://doi.org/10.1007/s10457-014-9751-0>
- Khameneh, B., Eskin, N.A.M., Iranshahy, M. & Fazly, B.S. (2021). Phytochemicals: a promising weapon in the arsenal against antibiotic-resistant bacteria. *Antibiotics*, **10**, 1044. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091044>
- Ketzis, J.K. (2008). Endo-and Ecto-parasites. *Alternative Health Practices for Livestock*, 71.

- Lawal, I.O., Uzokwe, N.E., Igboanugo, A.B.I., Adio, A.F., Awosan, E.A., Nwogwugwu, J.O. & Adesoga, A.A. (2010). Ethno medicinal information on collation and identification of some medicinal plants in Research Institutes of South-west Nigeria. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **4**(1), 001-007. <https://doi.org/10.5897/AJPP.9000135>
- Lewis, G., Schrire, B., MacKinder, B. & Lock, M. (2005). Legumes of the world. Royal Botanical Gardens, Kew, UK. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, **77**, 75-77.
- Li, K., Guan, G., Zhu, J., Wu, H. & Sun, Q. (2018). Antibacterial activity and mechanism of a laccase-catalyzed chitosangallic acid derivative against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, **96**, 234-243. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.021>
- Lim, T. K. (2012). *Leucaena leucocephala*. In Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. Dordrecht: Springer Netherlands. **2**(1), 754-762. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1764-0_86
- Llamas, F. & Acedo, C. (2016). Las leguminosas (Leguminosae o Fabaceae): una síntesis de las clasificaciones, taxonomía y filogenia de la familia a lo largo del tiempo. *Ambiociencias - Revista de Divulgación Científica*. **14**, 5-18
- Llorente, J. & Ocegueda, S. (2008). Estado del conocimiento de la biota. En: Llorente, J. & Ocegueda, S. (Eds.). *Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad*. (pp. 283-322) México: Conabio.
- López, R.G., Rivero, P.N., Olmedo, J.A., Valladares, C.B., Rosenfeld, M.C., Hori, O.S. & Zaragoza, B.A. (2022). Effect of *Leucaena leucocephala* leaves hydroalcoholic extract over the hatching of *Haemonchus contortus* in vitro. *Abanico Veterinario*, **12**, 1-12. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2022.8>
- Lozada, E.E., Núñez, O.P., Rosero, M.A. & Aragadvay, R.G. (2017). Efectos fisiopatológicos de los compuestos secundarios en la alimentación de monogástricos. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, **4**(1), 82-92.
- Martínez, A. (2005). *Leucaena lanceolata* (Watson) especie forestal nativa, con potencial para ser introducida en sistemas silvopastoriles. Tesis. Universidad de Guadalajara. Zapopan, Jalisco.
- Mathur, P., Singh, A., Ranjan, S., Dharmendra, S. & Mishra, Y. (2013). Antimicrobial activity of indigenous wildy growing plants: potential source of green antibiotics. *African Journal of Biomedical Research*, **7**(29), 3807-3815. <https://doi.org/10.5897/AJMR2012.2368>
- McNeill, D., Osborne, N., Komolong, M. & Nankervis, D. (1998). Condensed tannins in the genus *Leucaena* and their nutritional significance for ruminants. En: Shelton, H., Gutteridge, R., Mullen, B. & Bray, R. (Eds.). *Leucaena. Adaptation, quality and framing systems*. (pp. 205-2014) Vietnam: Econpapers.
- Miethke M, Pieroni M, Weber T, Brönstrup M, Hammann P, Halby L, ... Müller R. (2021). Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. *Nature Reviews Chemistry*, **5**(10), 726-749. <https://doi.org/10.1038/s41570-021-00313-1>
- Mora, M.A., Serrano, R., Lira, R., Jiménez, M. & Hernández, T. (2021). Evaluación de la actividad antimicrobiana de semillas de *Leucaena esculenta* y *Leucaena leucocephala* recolectadas en Tlayacapan, Morelos, México. *Polibotánica* **52**, 175-191. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.52.12>
- Moreno, M.S., Crescente, V.O., Henriquez, G.W., Liendo, P.G. & Herrera, M.H. (2008). Three constituents with biological activity from *Coccoloba uvifera* sedes. *Ciencia*. **16**(1), 84-89.
- National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 3862, Mimosine. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mimosine> (consultado en noviembre, 2022).
- Naturalista, (2015). Género *Leucaena* (Guajes). CONABIO. Ciudad de México. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/taxa/47453-Leucaena> (Consultado en abril 2021).
- Núñez, L. & Aquino, M.D. (2012). Microbicide activity of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata*). *Brazilian Journal of Microbiology*. **43**(4), 1255-1260. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400003>
- Nwe, Y.W., Mar, M.N., Nyunt, W., Win, M., Saw, H.M. & Myint, K. (2001). Antibacterial activity of selected Myanmar medicinal plants. *Journal of Myanmar Academic Technology*, **1**, 75-88.
- OMS, (2013). *Estrategia sobre la medicina tradicional (2014-2023)*. Hong Kong SAR, China. Pp. 7-16. Disponible en: <https://cutt.ly/EnrV7xm> (Consultado en marzo, 2021).
- OMS, (2017). *Resistencia a los antimicrobianos. Nota descriptiva*. OMS. México, DF. 10p. Disponible en: <https://cutt.ly/knrBhJs> (Consultado en marzo, 2021).
- OMS, (2018). *Estadísticas Mundiales de la Salud. Desarrollo Sostenible*. OMS. Disponible en: <https://cutt.ly/VnrPGLt> (Consultado en marzo, 2021).
- OMS, (2020). *Las 10 principales causas de defunción. Nota descriptiva*. OMS. México, DF. Disponible en: <https://acortar.link/yqAqt> (Consultado en enero, 2023).
- Osborne, N.J. & McNeill, D.M. (2001). Caracterización de taninos condensados de *Leucaena* por tamaño y capacidad de precipitación proteica. *Revista de ciencia de la alimentación y la agricultura*, **81**(11), 1113-1119. <https://doi.org/10.1002/jsfa.920>

- Peralta, I., Gómez, A., Romero, P.A. & Reyes, A. (2017). Uso antropocéntrico del guaje *Leucaena esculenta* (Moc. & Sessé Ex. Dc.) Benth, en dos comunidades de la mixteca baja oaxaqueña, México. *Polibotánica*, **43**, 349-364. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.43.15>
- Pinto, R., Gómez, H., Martínez, B., Hernández, A., Medina, F.J., Gutiérrez, R., Escobar, E. & Vázquez, J. (2005). Árboles y arbustos forrajeros del sur de México. *Pastos y Forrajes*, **28** (2), 87-97.
- Pinto, R., Hernández, D., Ramírez, L., Sandoval, C.A., Cobos, M. & Gómez, H. (2009). Taninos y fenoles en la fermentación *in vitro* de leñosas forrajeras tropicales. *Agronomía Mesoamericana*, **20**(1), 81-89. URL: <https://cutt.ly/VF8yKc2>
- Raman, K., Rana, A. & Sharma, A. (2018). Phytochemical analysis & anthelmintic activity of leaves of *Leucaena leucocephala*. *World Journal of Pharmaceutical Research*, **7**(11), 822-833. <https://doi.org/10.20959/wjpr201811-12411>
- Reda, S.M., El-Souda, S.S., Hanan, A.A., Moharam, M.E. & Shaker, K.H. (2015). Antioxidant, antimicrobial activities of flavonoids glycoside from *Leucaena leucocephala* leaves. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **5**(6), 138-147. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50623>
- Revathi, D. (2018). Phytochemical analysis of *Leucaena leucocephala* on various extracts. *Journal of Phytopharmacology*, **7**(6), 480-482.
- Rivero, P.N., Jaramillo, C.A., Peláez, A.A., Rivas, J.M., Ballesteros, R.G. & Zaragoza, B.A. (2019). Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* pod on gastrointestinal nematodes of sheep (*in vitro*). *Abanico Veterinario*, **9** (2019), 1-9. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2019.95>
- Rojas, G., Lévaro, J., Tortoriello, J., Navarro, V. (2001). Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. *Journal of Ethnopharmacology*. **74**, 97-101. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(00\)00349-4](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(00)00349-4)
- Román, D. (2015). Uso potencial de recursos vegetales en el municipio de Tlayacapan, Morelos. Tesis. Instituto Politécnico Nacional. CDMX. México.
- Román, M.L., Martínez, L.A., Mora, A., Torres, P., Gallegos, A. & Avendaño, A. (2013). *Leucaena lanceolata* S. Watson ssp. *lanceolata*, especie forestal con potencial para ser introducida en sistemas silvopastoriles. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, **19**(1), 103-114. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2011.09.070>
- Royaka MB, Uprety Y, Poudel RC, Timsina B, Munzbergova Z, Asselin H, Tiwari A, Shrestha SS, Sigdel SR (2014). Traditional uses of medicinal plants in gastrointestinal disorders in Nepal. *Journal of Ethnopharmacology*. **158**, 221-229. Available at: <https://10.1016/j.jep.2014.10.014>
- Savita, S. & Preeti, S. (2015). Evaluation of antibacterial and antimutagenic potential of *Acokanthera oppositifolia* and *Leucaena leucocephala*. *American Journal of Pharmacy and Health Research*, **3**(1).
- Schikorr, F., Duno, R., Cetzal-Ix, W. (2019). El género *Indigofera* (Fabaceae) en la Península de Yucatán, México: plantas de valor tintóreo. *Acta botánica mexicana*, **(126)**, e1366. <https://doi.org/10.21829/abm126.2019.1366>
- Sepúlveda, J., Torres, J., Sandoval, C., Martínez, J. & Chan, J. (2018). 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*, **5**(2), 79-95.
- Sharma, A., Flores, R.C., Cardoso, A. & Villareal, M.L. (2017). Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. **208**, 264-329. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.045>
- Sinsinwar, S. & Vadivel, V. (2020). Catechin isolated from cashew nut shell exhibits antibacterial activity against clinical isolates of MRSA through ROS-mediated oxidative stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **104**, 1-19. <https://doi:10.1007/s00253-020-10853-z>
- Soejarto, D.D., Fonga, H.H.S., Tana, G.T., Zhang, H.J., Ma, C.Y. & Franzblau, S.G. (2005) Ethnobotany/ethnopharmacology and mass bioprospecting: Issues on intellectual property and benefit-sharing. *Journal of Ethnopharmacology*, **100**(1-2), 5-22. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.031>
- Sprent, J.I. (2001). Nodulation in legumes. *Annals of Botany*, **89**(6), 797-798. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf128>
- Stevens, P.F. (2017). *Angiosperm Phylogeny*. Website. Versión 14. Disponible en: <https://cutt.ly/ikHJ47w> (Consultado en abril, 2021).
- Stewart, J.L. & Dunsdon, A.J. (1998). Preliminary evaluation of potential fodder quality in a range of *Leucaena* species *Agroforestry Systems*, **40** (2), 177-198. <https://doi.org/10.1023/A:1006028931809>
- Tapia, M.E., Tapia, A., Cedillo, R., Osuna, L. & Meckes, M. (2003). Detección de actividad antiprotozoaria de plantas medicinales mexicanas. *Biología farmacéutica*, **41** (3), 180-183. <https://doi.org/10.1076/phbi.41.3.180.15100>

- Teffo, L.S., Aderogba, M.A. & Eloff, J.N. (2010). Antibacterial and antioxidant activities of four kaempferol methyl ethers isolated from *Dodonaea viscosa* Jacq. var. *angustifolia* leaf extracts. *South African Journal of Botany*, **76**, 25-29. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.06.010>
- Tran, D.X., La, H.A., Do, T., Phung, T.T., Truong, N.M., Tran, D.K. & Khuat, H.T. (2016). Weed allelochemicals and possibility for pest management. *International Letters of Natural Sciences*, **56**.
- Tropicos (2022). Missouri Botanical Garden. Disponible en: <https://tropicos.org> (consultado en noviembre, 2022).
- Umaru, I.J., Samling, B., Umaru, H.A. (2018). Phytochemical screening of *Leucaena leucocephala* leaf essential oil and its antibacterial potentials. *MOJ Drug Design Development & Therapy*, **2**(6), 224-228. <https://doi.org/10.15406/mojddt.2018.02.00066>
- Vázquez, O.A.R., Vega J.A.L. & Paz, D.B. (2018) Mechano-synthesis and antimicrobial effect of nanostructured metal oxides. *Mundo Nano*, **11** (21), 29-44. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2018.21.62545>
- Vibrans, H. (Ed.). (2010). Malezas de México. *Leucaena*. Disponible en: <https://cutt.ly/anrDduG> (Consultado en marzo 2021).
- Villaseñor, I.M., Gajo, R.M.T. & Gonda, R.C. (1998) Bioactivity studies on the alkaloid extracts from seeds of *Leucaena leucocephala*. *Phytotherapy Research*, **11**(8), 615-617.
- Villaseñor, J.L. (2004). Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, **75**, 105-135.
- Vogt, G. (1991). *In vivo* decondensation of chromatin and nucleolar fibrillar component by *Leucaena leucocephala* ingredient. *Biology of the Cell*, **72**, 211-215. <https://doi.org/10.1111/j.1768-322X.1991.tb03017.x>
- Waizel, J. (2006.) Las plantas en la historia de la medicina. En: Bucay, J. (Ed.). *Las plantas medicinales y las ciencias. Una visión multidisciplinaria*. (pp. 181-200) México, D.F. : Instituto Politécnico Nacional.
- Watson, L. & Dallwitz, M.J. (2008). Leguminosae. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. *Nordic Journal of Botany*, **14**(5), 486-486. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1994.tb00638.x>
- Whisenant, S.G., Thurow, T.L. & Maranz, S.J. (1995). Inicio de la restauración autógena en sitios semiáridos poco profundos. *Ecología de la Restauración*, **3** (1), 61-67. <https://doi.org/10.1111/j.1526-100x.1995.tb00076.x>
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, **64**, 3-19. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00300-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00300-5)
- Wu, Y., Bai, J., Zhong, K., Huang, Y., Qi, H., Jiang, Y. & Gao, H. (2016). Antibacterial activity and membrane-disruptive mechanism of 3-p-trans-Coumaroyl-2-hydroxyquinic acid, a novel phenolic compound from pine needles of *Cedrus deodara*, against *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, **21**, 1084. <https://doi.org/10.3390/molecules21081084>
- Wunderlin, R. (1982). The Leguminosae: A source book of characteristics, uses, and nodulation. *Economic Botany* **36**, 224. <https://doi.org/10.1007/BF02858721>
- Yeverino, M.L. (1997). Determinación cuantitativa de carotenoides en hojas de cinco especies del género *Leucaena* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Yik C, Ling EW, Ling P, Lim YY, Stanslas JK (2011). Assessment of phytochemical content polyphenolic composition antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **11**(12), 1472.
- Zárate, S. (1987). Guaje blanco. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. *Phytologia*, **63**(4), 304-306.
- Zárate, S. (1994). Revisión del género *Leucaena* en México. *Serie Botánica*, **65**(2), 83-162.
- Zárate, S. (1997). Domesticación de *Leucaena* cultivada (Leguminosae) en México: Los documentos del siglo XVI. *Economic Botany*, **51** (3), 238-250. <https://doi.org/10.1007/bf02862093>
- Zárate, S. (1998). Domesticación de *Leucaena* (Fabaceae, Mimosoideae) en México. *Ciencias Botánicas*, **62**,141-155. <https://doi.org/10.17129/botsci.1557>
- Zárate, S. (1999). Ethnobotany and domestication process of *Leucaena* in Mexico. *Journal of Ethnobiology*, **19**(1), 1-23.
- Zeineldin, M., Abdelmegeid, M., Barakat, R. & Ghanem, M. (2018). A review: herbal medicine as an effective therapeutic approach for treating digestive disorders in small ruminants. *Alexandria Journal for Veterinary Sciences*, **56**(1), 33-34. <https://doi.org/10.5455/ajvs.286678>
- Zolla, C. (1980). Traditional medicine in Latin America, with particular reference to Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, **2**,37-41. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(80\)90028-8](https://doi.org/10.1016/0378-8741(80)90028-8)

CAPÍTULO II.

INVESTIGACIÓN ANTIMICROBIANA

Como resultado del trabajo experimental antimicrobiano con los extractos de semillas de *L. leucocephala* y *L. esculenta* fue publicado el artículo: **“Evaluación de la actividad antimicrobiana de semillas de *Leucaena leucocephala* y *L. esculenta* recolectadas en Tlayacapan, Morelos (Mexico). Evaluation of the antimicrobial activity of *Leucaena esculenta* and *Leucaena leucocephala* seed collected from Tlayacapan, Morelos (Mexico)”**, el cual fue aceptado en la revista científica “Polibotánica” (ISSN: 2395-9525) arbitrada e indexada internacionalmente cuya cita es:

“Mora MA, Serrano R, Lira R, Jiménez M, Hernández T (2021). Evaluación de la actividad antimicrobiana de semillas de *Leucaena esculenta* y *Leucaena leucocephala* recolectadas en Tlayacapan, Morelos, México. *Polibotánica*, **52**, 175-191. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.52.12>”

El escrito incluye y describe la actividad antimicrobiana cualitativa y cuantitativa de los extractos vegetales sobre diferentes cepas de bacterias y hongos de interés médico.

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE SEMILLAS
DE *Leucaena esculenta* Y *Leucaena
leucocephala* RECOLECTADAS EN
TLAYACAPAN, MORELOS, MÉXICO**

**EVALUATION OF THE
ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF
Leucaena esculenta AND *Leucaena
leucocephala* SEED COLLECTED FROM
TLAYACAPAN, MORELOS (MEXICO)**

Mora-Villa, A.; R. Serrano-Parrales, R. Lira-Saade, M. Jiménez-Estrada y T. Hernández-Delgado.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE SEMILLAS DE *Leucaena esculenta* Y *Leucaena leucocephala* RECOLECTADAS EN TLAYACAPAN, MORELOS, MÉXICO.

EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Leucaena esculenta* AND *Leucaena leucocephala* SEED COLLECTED FROM TLAYACAPAN, MORELOS (MEXICO).

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE SEMILLAS DE
Leucaena esculenta Y *Leucaena leucocephala* RECOLECTADAS
EN TLAYACAPAN, MORELOS, MÉXICO**

**EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF
Leucaena esculenta AND *Leucaena leucocephala* SEED COLLECTED
FROM TLAYACAPAN, MORELOS (MEXICO)**

Mora-Villa, A.;
R. Serrano-Parrales,
R. Lira-Saade,
M. Jiménez-Estrada
y T. Hernández-Delgado

EVALUACIÓN DE LA
ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE
SEMILLAS DE *Leucaena
esculenta* Y *Leucaena
leucocephala*
RECOLECTADAS EN
TLAYACAPAN, MORELOS,
MÉXICO

EVALUATION OF THE
ANTIMICROBIAL
ACTIVITY OF *Leucaena
esculenta* AND *Leucaena
leucocephala* SEED
COLLECTED FROM
TLAYACAPAN, MORELOS
(MEXICO)

POLIBOTÁNICA

Instituto Politécnico Nacional

Núm. 52: 175-191. Julio 2021

DOI:
10.18387/polibotanica.52.12

A. Mora-Villa / angeles_moravilla@comunidad.unam.mx

R. Serrano-Parrales

Laboratorio de Bioactividad de Productos Naturales, UBIPRO,
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México,
Av. De los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala,
Tlalnepantla 54090, Estado de México, México.

R. Lira-Saade

Laboratorio de Recursos Naturales, UBIPRO, Facultad de Estudios Superiores-
Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México,
Av. De los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla 54090,
Estado de México, México.

M. Jiménez-Estrada

Laboratorio de Productos Naturales, Instituto de Química, UNAM,
México, Circuito exterior s/núm. Ciudad Universitaria,
Alcaldía Coyoacán, C.P. 04510, Cd. de México.

T. Hernández-Delgado

Laboratorio de Bioactividad de Productos Naturales, UBIPRO,
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México,
Av. De los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla 54090,
Estado de México, México.

RESUMEN: *Leucaena esculenta* y *Leucaena leucocephala* (Fabaceae) son especies conocidas en México como “guajes”, ambas se usan como recursos alimenticio y medicinal para aliviar enfermedades infecciosas. El objetivo del estudio fue determinar la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos, acetónicos y hexánicos de las semillas de *L. esculenta* y *L. leucocephala* recolectadas en la comunidad de Tlayacapan Morelos. Los extractos fueron obtenidos mediante la técnica de maceración con hexano, acetona y metanol a partir del mismo material vegetal y reducidos por destilación al vacío mediante el uso del rotavapor. La actividad antimicrobiana de los extractos se determinó, cualitativa y cuantitativamente en 20 cepas bacterianas, 3 cepas levaduriformes y 4 cepas de hongos filamentosos. En las pruebas cualitativas, se encontró actividad antimicrobiana en 6 cepas bacterianas (todas de *Staphylococcus aureus* y de *Escherichia coli*), 1 cepa de hongos levaduriformes y 4 de hongos miceliados. Mediante la técnica de microdilución en caldo, *E. coli* CUSI mostró valores de CMI de 2000 y 3000 µg/mL para *L. leucocephala* y *L. esculenta* respectivamente y para *S. aureus* CUSI, CMI = 4000 y 2000 µg/mL para *L. leucocephala* y *L. esculenta* respectivamente, ambas cepas sensibles a los extractos metanólicos. Los valores de CMB para las cinéticas de muerte (6000 µg/mL para *L. leucocephala* y 4000 µg/mL para *L. esculenta*) tuvieron efecto significativo en las primeras 10 horas de tratamiento. Por su parte, *Candida glabrata* fue susceptible a los

extractos metanólicos con valores de CFM de 4000 µg/mL (*L. leucocephala*) y 6000 µg/mL (*L. esculenta*). Mediante la técnica de inhibición del crecimiento radial, fue reportado, que los valores más bajos de CF₅₀ corresponden a los extractos acetónicos de semillas (*L. leucocephala* = 2.28 mg/mL y *L. esculenta* = 2.72 mg/mL) teniendo efecto significativo contra cepas de *Trichophyton mentagrophytes* y *Aspergillus niger* respectivamente. En los extractos metanólicos, acetónicos y hexánicos, se evidenció mediante pruebas coloridas, la presencia de alcaloides, triterpenos, monoterpenos, esteroides, saponinas y compuestos fenólicos, los cuales reportan potencial antimicrobiano. Los extractos metanólicos y acetónicos de semillas de ambos guajes presentaron actividad antimicrobiana sobre diferentes cepas de bacterias y hongos, validando así, el uso medicinal de este recurso por parte de la comunidad de Tlayacapan.

Palabras clave: Actividad antimicrobiana, *Leucaena leucocephala*, *Leucaena esculenta*, plantas medicinales, Tlayacapan.

ABSTRACT: *Leucaena esculenta* and *Leucaena leucocephala* (Fabaceae) are species known in Mexico as "guajes", both are used as food and medicinal resources to alleviate different infectious diseases. The objective of this study was to determine the antimicrobial activity of the methanolic, acetonetic and hexanic extracts of the seeds of *L. esculenta* and *L. leucocephala* collected in the community of Tlayacapan Morelos. The extracts were obtained by the maceration technique with hexane, acetone and methanol from the same plant material and reduced by vacuum distillation using a rotary evaporator. The antimicrobial activity of the extracts was determined qualitatively and quantitatively in 20 bacterial strains, 3 yeast strains and 4 strains of filamentous fungi. In qualitative tests, antimicrobial activity was found in 6 bacterial strains (all of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*), 1 strain of yeast fungi and 4 of mycelial fungi. Using the broth microdilution technique, *Escherichia coli* CUSI showed MIC values of 2000 and 3000 µg / mL for *L. leucocephala* and *L. esculenta* respectively and for *Staphylococcus aureus* CUSI, MIC = 4000 and 2000 µg / mL for methanolic extracts of *L. leucocephala* and *L. esculenta* respectively. The MBC values for the kinetics of death (6000 µg / mL for *L. leucocephala* and 4000 µg / mL for *L. esculenta*) had a significant effect in the first 10 hours of treatment. Meanwhile, *Candida glabrata* was susceptible to methanolic extracts with MFC values of 4000 µg / mL (*L. leucocephala*) and 6000 µg / mL (*L. esculenta*). In radial growth inhibition technique, it was reported that the lowest values of CF₅₀ correspond to the acetonetic extracts of seeds (*L. leucocephala* = 2.28 mg / mL and *L. esculenta* = 2.72 mg / mL) having a significant effect against strains *Trichophyton mentagrophytes* and *Aspergillus niger*, respectively. In qualitative tests for the determination of secondary metabolites, the presence of alkaloids, triterpenes, monoterpenes, steroids, saponins and phenolic compounds were found, which report antimicrobial potential. The methanolic and acetonetic extracts from the seeds of both guajes showed significant biological activity on different strains of bacteria and fungi, thus validating the medicinal use of this resource by the Tlayacapan community.

Key words: Antimicrobial activity, *Leucaena leucocephala*, *Leucaena esculenta*, medicinal plants, Tlayacapan.

INTRODUCCIÓN

Las especies vegetales han sido utilizadas por el hombre desde la antigüedad para cubrir sus necesidades básicas, entre las que destacan el uso alimenticio y medicinal. Además, desde hace años el uso terapéutico de las plantas se ha vinculado a países con gran base cultural y biodiversidad, como México (Waizel, 2006). En el territorio mexicano, el término "guaje" es utilizado para designar, entre otras acepciones, a una diversidad de especies vegetales que pertenecen al género *Leucaena* de la familia Fabaceae (Peralta *et al.*, 2017). Estudios etnobotánicos realizados en el estado de Morelos, identifican el uso medicinal de muchas leguminosas, entre ellas *L. leucocephala* y *L. esculenta* (guaje blanco y rojo respectivamente), las cuales se consideran, para curar enfermedades infecciosas como las respiratorias o gastrointestinales (Osuna *et al.*, 2005; Quevedo, 2015; Román, 2015).

El género *Leucaena*, originario de México, está compuesto por 24 especies de árboles y arbustos, distribuidos desde Texas, Estados Unidos hasta Perú. Muchas de las especies han sido utilizadas como alimentación, para la construcción de viviendas y en el área terapéutica de diversas etnias del territorio mexicano (Zárate, 1994). Estudios etnobotánicos y fitoquímicos en México (Orozco *et al.*, 2020; Sepúlveda *et al.*, 2018; Peralta *et al.*, 2017; Zárate, 1987) reportan efectos afrodisíacos, eupépticos, antiparasitarios y antimicrobianos de extractos de hojas y semillas de *L. leucocephala* y *L. esculenta*. En cuanto a los estudios antimicrobianos, se reporta actividad antimicrobiana de los extractos de hojas y semillas de *L. leucocephala* sobre cepas de *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Dago *et al.*, 2020; Savita & Preeti, 2015; Mathur *et al.*, 2013; Nwe *et al.*, 2001). Se sabe que la semilla fresca contiene compuestos fenólicos tales como taninos, flavonoides y antocianinas, entre otros metabolitos secundarios (Román *et al.*, 2014); estas biomoléculas tienen propiedades, antimicrobianas, antioxidantes, anticancerígenas, cicatrizantes, entre otros (Ávalos & Pérez, 2009). Sin embargo, algunas plantas del género poseen un alcaloide tóxico al que se le atribuye efecto antimotóxico conocido como mimosina, (Shelton *et al.*, 2019). En consecuencia, el estudio se enfocó en evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos, acetónicos y hexánicos de semillas de *L. leucocephala* y *L. esculenta* sobre diferentes cepas de interés médico. Con la finalidad de recabar datos sobre plantas nativas de México, ya que la mayoría de los reportes antimicrobianos provienen de investigaciones extranjeras.

MATERIALES Y MÉTODO

Material vegetal y zona de estudio

Las semillas de ambos guajes se recolectaron en la localidad de Tlayacapan, Morelos en julio de 2018 y fueron identificadas por el Biol. Daniel Román Salazar. La zona se encuentra geográficamente ubicada al norte a una latitud de 18°59'34", al sur a 18°53'37", al este a una longitud de 98°55'15" y 99°00'58" a el oeste. Un ejemplar de cada especie (número de registros: MVA118 y MVA119) fue depositado en el "Herbario IZTA" de la Facultad de Estudios Superiores (FES), Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Las semillas fueron extraídas de las vainas y el material vegetal se puso a secar por una semana a temperatura ambiente sin luz directa del sol, posterior a sequedad, fueron puestas en un molino manual para triturar el material y que éste estuviera en contacto con los solventes a utilizar.

Obtención de extractos.

Los extractos de *L. leucocephala* y *L. esculenta* fueron obtenidos mediante la técnica de maceración con solventes de diferente polaridad: hexano, acetona y metanol de forma subsecuente y a partir del mismo material vegetal. Se partió de un total de peso seco de semillas de: 434.34 g del guaje blanco y 458.63 g del guaje rojo colocados en matraces de 1L de capacidad durante 3 días por solvente. El macerado fue reducido cada vez mediante el uso de un equipo de arrastre de vapor a presión reducida acoplado a un rotavapor Heidolph Laborota 4001. El equipo se controla de manera que no sobrepase la temperatura de ebullición de cada solvente (hexano: 60 a 65 °C, acetona: 50 a 60 °C y metanol: 65 a 70 °C). Los extractos son colocados en un desecador y posterior a la evaporación del solvente, es calculado su rendimiento a través de una relación matemática del peso total del material respecto al del extracto obtenido. (Domínguez, 1978; Sierra *et al.*, 2018).

Bioensayos

Cepas utilizadas

Cepas de bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y *Enterococcus faecalis* ATCC 14506 (cepas de catálogo); *S. aureus* FES-C y *S. epidermidis* FES-C (cepas donadas por el Laboratorio de Microbiología de Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FES-C), UNAM); *S. aureus*

23MR, *S. aureus* CUSI y *S. aureus* cc (cepas multirresistentes de casos clínicos donadas por el Laboratorio de Análisis de la Clínica Universitaria de Salud Integral (CUSI) de la FES Iztacala, UNAM). Cepas de bacterias Gram negativas: *Vibrio cholerae* ATCC 39540, *Enterobacter gergoviae* ATCC 33028 y *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Salmonella typhimurium* ATCC 19430, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Serratia marcescens* ATCC 14756, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhi* ATCC 7251, *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27853 (cepas de catálogo); *Escherichia coli* 82MR, *E. coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* CUSI (donadas por el Laboratorio de Análisis clínicos de la CUSI de la FES Iztacala, UNAM).

Cepas de hongos levaduriformes: *Candida albicans* 17MR (donada por el laboratorio de análisis clínicos CUSI, FES Iztacala, UNAM); *C. glabrata* y *C. tropicalis* (aisladas de casos clínicos y donadas por el Hospital Ángeles Metropolitano). Cepas de hongos filamentosos: *Trichophyton mentagrophytes* (CDBB-H1112), *Aspergillus niger* (donado por el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO), FES Iztacala, UNAM); *Fusarium moniliforme* (CDBBH-265) y *F. sporotrichioides* (NRLL3299).

Evaluación de la actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de los extractos de semilla de *L. esculenta* y *L. leucocephala* fue evaluada mediante el método de difusión en agar (Balouiri *et al.*, 2016; CLSI, 2012b). Se prepararon inóculos bacterianos en 10 mL de caldo Müller-Hinton (Bioxon) y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Los inóculos se ajustaron con solución salina estéril para obtener la turbidez del estándar de McFarland No. 0.5 (10^8 UFC/mL). Se sembraron inóculos bacterianos en placas de agar Müller-Hinton con un hisopo para el crecimiento del césped microbiano. Sobre la superficie del agar se colocaron discos de papel filtro (Whatman N° 5) de 5 mm de diámetro impregnados 24 horas antes, con 2mg de extracto (por disco). Como control positivo se utilizaron discos impregnados con 25 µg de cloranfenicol y como control negativo discos con 10 µL de solvente (hexano, acetona o metanol). Las placas se incubaron a 37 °C durante 18 h. Los halos de inhibición se reportan en mm.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) se estimó, mediante el método de microdilución en caldo (CLSI, 2012a). Se utilizaron diluciones de extractos de semillas de: 0, 125, 250, 750, 1000, 1500, 2000, 3000 y 4000 µg/mL. Los tubos se inocularon con una suspensión de microorganismos de 50µL de 10^5 UFC/mL en caldo Müller-Hinton (Bioxon) y 50 µL más del extracto de semillas en las placas estériles de 96 pozos. Los valores de CMI se definen como la concentración mínima de extracto que evita el crecimiento bacteriano visible después de 20 h de incubación a 37 °C. El valor de CMB se define como la concentración mínima en la que no hay crecimiento bacteriano alguno, es decir que se destruye el 100% de la población bacteriana, después de 20 h de incubación a 37 °C. Para revelar los resultados se utiliza TTC al 0.08% que indica respiración microbiana. Se utilizó cloranfenicol como fármaco de referencia y como controles negativos únicamente el solvente correspondiente.

La cinética de muerte muestra el efecto antimicrobiano dependiente del tiempo y de la concentración. Se empleó una suspensión bacteriana de 10^5 UFC/mL en caldo Müller-Hinton y cuatro tubos donde, el primer, segundo y tercer tubo contuvieron el extracto antibacteriano en concentraciones finales de $\frac{1}{2}$ CMI, CMI y CMB. El cuarto tubo correspondió al grupo control sin la presencia de extracto vegetal. Los inóculos microbianos (100 µL) se agregaron a cada tubo y se incubaron por 24 h a 37 °C, tiempo durante el cual se tomaron alícuotas de 50 µL a la hora: 0, 2, 4, 6, 8, 12 y 24. Posteriormente, las muestras se sembraron en placas de agar Müller-Hinton e incubaron por 24 h a 37 °C. Finalmente, se realizó el conteo en placa de las UFC, las cuales representaron el número de supervivientes, expresando el resultado en log₁₀ (Balouiri *et al.*, 2016; CLSI, 1998).

Evaluación de la actividad antifúngica

La actividad antifúngica se determinó utilizando el método de difusión en agar para la prueba de susceptibilidad de levaduras (CLSI, 2004). Se prepararon inóculos de levadura en 10 mL de caldo Dextrosa Sabouraud (Bioxon) y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Los inóculos se ajustaron con solución salina estéril para obtener la turbidez del estándar de McFarland No. 0.5 (10^8 UFC/mL). Los inóculos de levadura se sembraron con un hisopo en placas de agar papa dextrosa (PDA) (Bioxon) para aplicar un césped fúngico. Sobre la superficie del agar se colocaron discos de papel filtro (Whatman N° 5) de 5 mm de diámetro impregnados con 2 mg de extracto (por disco) con 24 horas previas de preparación. Como control positivo se utilizaron discos impregnados con 30 µg de nistatina y como control negativo discos con 10 µL de disolvente. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Los halos de inhibición se reportan en mm.

La concentración fungicida mínima (CFM) se estimó con el método de microdilución en caldo. La técnica con cepas levaduriformes se realizó de la misma forma que con las cepas bacterianas (CLSI, 2012a). Se utilizaron diluciones de los extractos metanólicos, acetónicos y hexánicos en concentraciones de 0, 125, 250, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000 y 6000 µg /mL. Los tubos se inocularon con una suspensión de microorganismos de 10^5 UFC/mL en caldo Dextrosa Sabouraud (Bioxon). Los valores de CFM se definen como la concentración de extracto más baja que evita el crecimiento visible de levaduras después de 20 h de incubación a 37 °C. Se utilizó nistatina como fármaco de referencia y como controles negativos únicamente el disolvente correspondiente. (Balouiri *et al.*, 2016).

La prueba de susceptibilidad de hongos filamentosos, se llevó a cabo con el método de inhibición del crecimiento radial (CLSI, 2010). En placas de Petri con agar papa-dextrosa (PDA) fue inoculado el micelio (1 mm de diámetro) en el centro de cada placa. Sobre la superficie del agar se colocaron discos de papel filtro (Whatman N° 5) de 5 mm de diámetro impregnados con 2 mg de extracto, separados tres cm del botón de micelio sembrado, medida que permite el crecimiento adecuado del hongo. Como control positivo se utilizaron discos impregnados con 56 µg de ketoconazol y como control negativo discos con 10 µL de disolvente. Las placas se incubaron a 28 °C durante 72 a 96 h, hasta que el micelio cubrió la superficie del agar. Se consideró que los discos con los extractos que mostraban áreas de inhibición del crecimiento micelial tenían actividad antifúngica y se notificaron como positivos. (Curiel *et al.*, 2017; Balouiri *et al.*, 2016; Scrase, 1995).

La estimación de la concentración fungicida media (CF_{50}) se determinó en placas de 12 pocillos. El extracto a diferentes concentraciones fue incorporado al agar PDA fundido. Posteriormente, se inoculó la placa con una muestra de micelio de 1 mm de diámetro en el centro de cada pocillo. Las placas se incubaron a 28 °C durante 48 - 72 h, hasta que el crecimiento micelial cubrió la superficie del agar en los pocillos de control, lo que representó el 100% de crecimiento del hongo. Se midió el diámetro del micelio de cada pozo a las diferentes concentraciones y con ello se determinó la actividad antifúngica y la CF_{50} (Curiel *et al.*, 2017; Balouiri *et al.*, 2016). El efecto antifúngico se estimó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad antifúngica (\%)} = ((D_c - D_s) / D_c) \times 100$$

Donde:

D_c = diámetro de crecimiento en la placa de control

D_s = diámetro de crecimiento en la placa que contiene el agente antifúngico ensayado.

Obteniendo el porcentaje, se calculó la CF_{50} , mediante un modelo logarítmico. Se grafica la concentración (eje x) respecto al porcentaje de inhibición o actividad antifúngica (eje y). En la ecuación logarítmica que brinda el programa Excel, se busca el valor (x) de la concentración para un porcentaje de inhibición del 50% ($y=50$).

Finalmente, cabe resaltar, que todas las técnicas microbiológicas para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de semillas de ambas especies de guaje, fueron llevadas a cabo en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar, con equipo y material previamente esterilizado en autoclave Modelo CVQ-B100L y acorde a los procedimientos del CLSI.

Determinación cualitativa de metabolitos secundarios

Los grupos funcionales de los metabolitos contenidos en el extracto se detectaron mediante un análisis fitoquímico cualitativo a partir de una solución estándar de cada extracto de 2 mg/ ml disuelto en metanol. Los compuestos fenólicos se detectaron a través de la prueba de cloruro férrico, observándose una coloración azul o verde. La prueba de taninos utiliza el tubo de solución fenólica positiva más reactivo de gelatina obteniendo un precipitado verde. Los alcaloides se detectaron mediante la prueba de Dragendorff a través de un precipitado rojo, mientras que con el reactivo de Mayer la prueba positiva para alcaloides es un precipitado lechoso. La prueba de glucósidos utiliza como reactivos α -naftol y HCl concentrado, observando un anillo púrpura. La detección de saponinas consistió en espuma que permanece durante al menos un minuto posterior a agitación vigorosa. Respecto a la prueba de cumarinas se utilizó NaOH al 10% y HCl al 10%, con un viraje inicial de amarillo a transparente como prueba positiva. Los triterpenos y esteroides se detectaron a través de la prueba de Lieberman-Buchard mediante una tinción azul o verde para esteroides y para triterpenos coloración roja, violeta o naranja. La prueba de monoterpenos se realiza con vainillina y H_2SO_4 obteniendo un halo azul, verde, violeta o naranja (Bulugahapitiya, 2018; Miranda & Cuellar, 2001; Domínguez, 1978; Marcano & Hasegawa, 2002).

Análisis estadísticos

Los resultados se expresan como el promedio y desviación estándar, $n=3$ de los datos de las pruebas cualitativas antimicrobianas realizadas; los valores se calcularon con el programa PAST (2020) versión 4.03. (Hammer *et al.*, 2020). Por otro lado, se realizó un ANOVA de correlación para cada tendencia de crecimiento bacteriano con un $\alpha=0.05$, para encontrar significancia en las cinéticas de muerte; los valores se calcularon con la versión 3.6.1. de R-Studio (2019) (Ross & Gentleman, 2019). Los valores de CF_{50} se calcularon mediante el modelo logarítmico utilizando el programa Microsoft Excel versión 19.0 (2018) (Brodie & Simonyi, 2020). La significancia de los valores de la CF_{50} se realizó con un ANOVA de correlación con un $\alpha=0.05$.

RESULTADOS

Rendimientos

Los rendimientos de los extractos de semillas obtenidos fueron los siguientes: guaje blanco: hexano 8.48 g (1.95%), acetona 2.94 g (0.67%) y metanol 23.02 g (5.29%); guaje rojo: hexano 19.67 g (4.28%), acetona 2.98 g (0.64%) y metanol 19.82 g (4.32%). Se partió de un total de peso seco de semillas de: 434.34 g del guaje blanco y 458.63 g del guaje rojo.

Actividad antibacteriana

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos de hexano, acetona y metanol de *L. leucocephala* y *L. esculenta* se muestran en el cuadro 1.

Se puede observar que 5 de los 6 extractos de semillas de guajes fueron activos para 6 cepas bacterianas, todas del género *Staphylococcus* y *Escherichia*. Se aprecia también, que los extractos de *L. leucocephala* mostraron actividad antibacteriana en un mayor número de cepas. Extracto hexánico: una cepa, extracto acetónico: 2 cepas y extracto metanólico: 4 cepas. Mientras que los extractos de semillas de *L. esculenta* mostraron actividad solo para el extracto hexánico: 2 cepas y metanólico: 4 cepas. Para la determinación de la CMI mediante la técnica de microdilución en caldo se observa que el valor más bajo registrado es de 2000 $\mu\text{g/mL}$ para

el extracto metanólico de guaje blanco sobre *E. coli* CUSI y para los extractos hexánico y metanólico del guaje rojo sobre *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* CUSI respectivamente.

Cuadro 1. Actividad antibacteriana de los extractos hexánico, acetónico y metanólico de *L. leucocephala* y *L. esculenta*.

Cepa	Halos de inhibición (mm)				CMI µg/mL			
	Hexano	Acetona	Metanol	Control positivo	Hexano	Acetona	Metanol	Control positivo
<i>L. leucocephala</i>								
E.c. CUSI	na	na	6.33±0.6	23.00±0.00	na	na	2000	4.0
E.c. MR	na	na	na	22.67±0.47	na	na	na	4.0
S.a. MR	na	na	9.33±0.6	22.33±0.47	na	na	4000	7.0
S.a. ATCC	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0	22.33±0.47	3000	4000	4000	2.0
S.a. CUSI	na	7.0±0.0	7.33±0.6	22.33±0.47	na	4000	4000	4.0
S.a. FES-C	na	na	na	22.33±0.47	na	na	na	4.0
<i>L. esculenta</i>								
E.c. CUSI	na	na	6.67±0.58	23.00±0.00	na	na	3000	4.0
E.c. MR	na	na	6.33±0.58	22.67±0.47	na	na	3000	4.0
S.a. MR	na	na	na	22.33±0.47	na	na	na	7.0
S.a. ATCC	6.33±0.58	na	na	22.33±0.47	2000	na	na	2.0
S.a. CUSI	na	na	7.33±1.53	22.33±0.47	na	na	2000	4.0
S.a. FES-C	6.0±0	na	6.0±0	22.33±0.47	3000	na	3000	4.0

E.H: Extracto hexánico, E.A: Extracto acetónico, E.M: Extracto metanólico, C.p: control positivo, E.c. CUSI: *E. coli* CUSI, E.c. MR: *E. coli* 82MR, S.a. MR: *S. aureus* 23MR, S.a. ATCC: *S. aureus* ATCC 29213, S.a. CUSI: *S. aureus* CUSI, S.a. FES-C: *S. aureus* FES-C. na: no actividad. Control positivo: Cloranfenicol. El control negativo en todos los casos no tuvo efecto alguno sobre las cepas bacterianas.

Los resultados obtenidos en las cinéticas de muerte se pueden observar en las figuras 1, 2 y 3 para la cepa de *S. aureus* CUSI, la cual fue susceptible a los extractos acetónico y metanólico de ambas especies de guajes. El efecto antibacteriano de los extractos de semillas de ambas especies del género *Leucaena* fue significativo con un $\alpha=0.05$ para las CMB evaluadas.

En la figura 1, se observa el efecto bactericida desde la primera hora de exposición de la cepa bacteriana al extracto acetónico de semillas de guaje blanco, ya que eliminó el 99.99% de UFC con una concentración de 6000 µg/mL. En el segundo caso (Fig. 2), la cepa mostró una disminución significativa de UFC respecto al control luego de doce horas de exposición del microorganismo al extracto metanólico de la semilla de guaje blanco a una concentración de 6000 µg/mL. Por otro lado, en la figura 3 se observa que el microorganismo expuesto al extracto metanólico de semillas de guaje rojo mostró un efecto bacteriostático y una disminución significativa en la población bacteriana en comparación con el grupo control a una concentración de 4000 µg/mL.

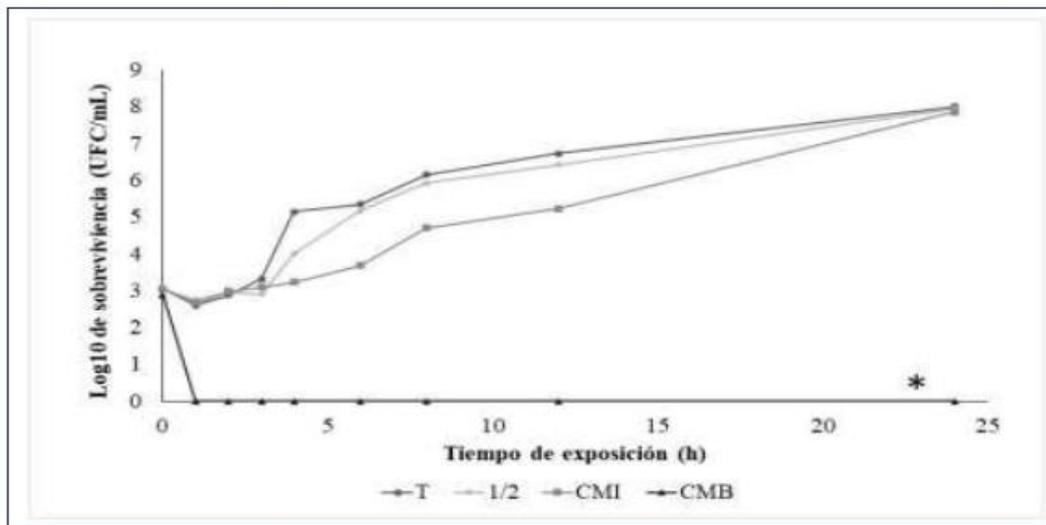


Fig. 1. Cinética de muerte para *S. aureus* CUSI del extracto acetónico de semilla de *L. leucocephala*. T: testigo: sin extracto, ½ CMI: 2000 µg/mL, CMI: 4000 µg/mL, CMB: 6000 µg/mL. *Significancia de CMB. $\alpha=0.05$

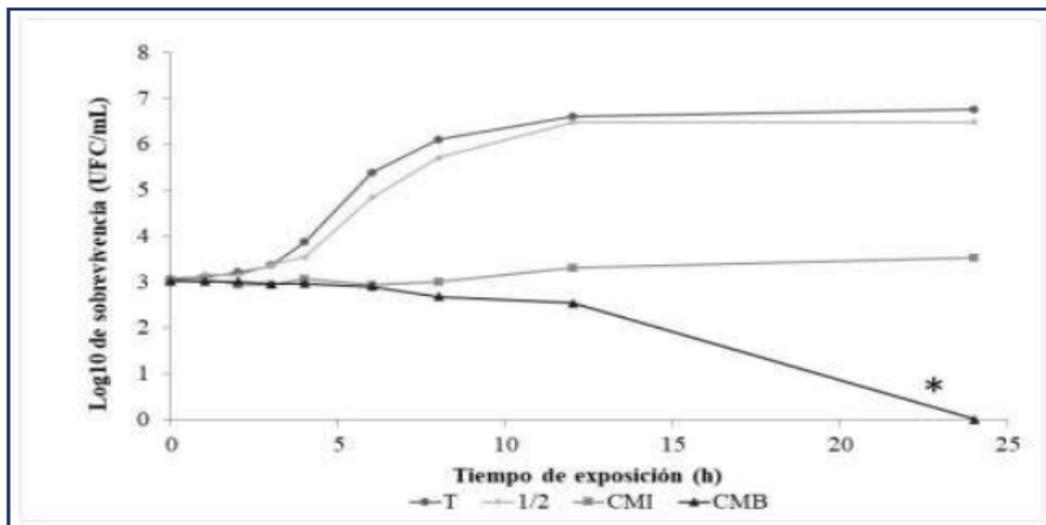


Fig. 2. Cinética de muerte para *S. aureus* CUSI del extracto metanólico de semilla de *L. leucocephala*. T: testigo: sin extracto, ½ CMI: 2000 µg/mL, CMI: 4000 µg/mL, CMB: 6000 µg/mL. *Significancia de CMB. $\alpha=0.05$

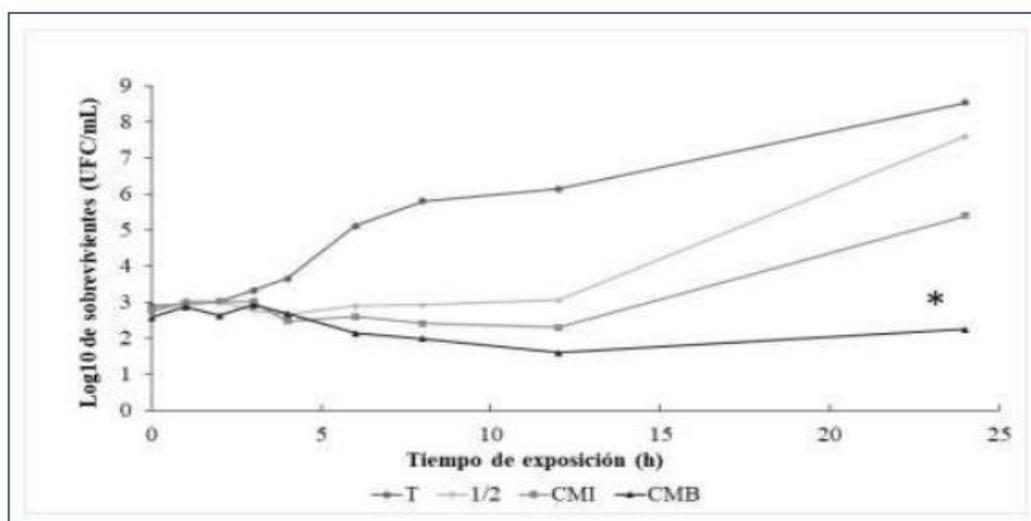


Fig. 3. Cinética de muerte para *S. aureus* CUSI del extracto metanólico de semilla de *L. esculenta*. T: testigo: sin extracto, 1/2 CMI: 1000 µg/mL, CMI: 2000 µg/mL, CMB: 4000 µg/mL. *Significancia de CMB. $\alpha=0.05$

Actividad antifúngica

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de hexano, acetona y metanol de *L. leucocephala* y *L. esculenta* se muestran en el cuadro 2. Se observó que tanto el extracto metanólico de semillas de guaje blanco como de guaje rojo tuvieron efectos inhibitorios contra *C. glabrata*. Para la determinación de la CFM se observa que el valor más bajo registrado es de 4000 µg/mL para el extracto metanólico de guaje blanco sobre *C. glabrata*. Se aprecia que los extractos de *L. leucocephala* mostraron actividad antifúngica en un mayor número de cepas de hongos miceliados. Extracto hexánico: una cepa, extracto acetónico: 2 cepas y extracto metanólico: 1 cepa. Mientras que los extractos de semillas de *L. esculenta* mostraron actividad solo para el extracto acetónico: 2 cepas. La CF_{50} determinada para las diferentes cepas de hongos filamentosos se realizó con una $p < 0.05$, por lo que se demuestra una disminución significativa del crecimiento radial de estos hongos al contacto con los extractos vegetales. Los valores de los controles positivos de la prueba se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 2. Actividad antifúngica de los extractos hexánico, acetónico y metanólico de *L. leucocephala* y *L. esculenta*.

Cepa	Extractos									
	Halos de inhibición (mm)			CFM µg/mL	CF ₅₀ (mg/mL)					
	E.H	E.A	E.M		E.H	p	E.A	p	E.M	p
<i>L. leucocephala</i>										
C. g.	na	na	7.33± 0.6	4000	-	-	-	-	-	-
T.m.	na	+	na	-	na	-	2.28	2.03e ⁻⁰⁷	na	-
A.s.	na	na	na	-	na	-	na	-	na	-
F.m.	+	na	na	-	2.94*	9.04 e ⁻⁰³	-	-	-	-
F.s.	na	+	+	-	-	-	2.93	9.13 e ⁻⁰⁴	4.22	4.0 e ⁻⁰⁴
<i>L. esculenta</i>										
C. g.	na	na	6.0±0.0	6000	-	-	-	-	-	-
T.m.	na	na	na	-	na	-	na	-	na	-
A.s.	na	+	na	-	na	-	2.72	6.82 e ⁻⁰⁵	na	-
F.m.	na	+	na	-	na	-	4.69	3.21 e ⁻⁰³	na	-
F.s.	na	na	na	-	na	-	na	-	na	-

Levaduras: C.g. *C. glabrata*: aislada de un caso clínico donada por el Hospital Ángeles Metropolitano. Hongos filamentosos: T.m. *T. mentagrophytes* CDBB-H1112. A.s. *A. niger* (donada por el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la UBIPRO, FES Iztacala), F.m. *F. moniliforme* (CDBBH-265), F.s. *F. sporotrichioides* (NRLL3299). E.H: extracto hexánico, E.A: extracto acetónico, E.M: extracto metanólico; + : prueba positiva; - : no aplica. na: no actividad. p: valor de p <0.05. *: CF₂₅ mg/mL. El control negativo en todos los casos no tuvo efecto alguno sobre las cepas bacterianas

Cuadro 3. Actividad antifúngica de los fármacos control.

Cepa	Controles positivos			
	Halos de inhibición (mm)			
	Nistatina (30 µg/disco)	Ketoconazol (56 µg/disco)	CFM µg/mL	CF ₅₀ µg/mL
C. g.	22.00±0.00	-	8.0	-
T. m.	-	+	-	2
A. s.	-	+	-	15
F.m.	-	+	-	2
F.s.	-	+	-	2

Levaduras: C.g. *C. glabrata*: aislada de un caso clínico donada por el Hospital Ángeles Metropolitano. Hongos filamentosos: T.m. *T. mentagrophytes* CDBB-H1112. A.s. *A. niger* (donada por el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la UBIPRO, FES Iztacala), F.m. *F. moniliforme* (CDBBH-265), F.s. *F. sporotrichioides* (NRLL3299). +: prueba positiva; -: no aplica. na: no actividad.

Los metabolitos secundarios contenidos en los extractos indicaron la presencia de grupos como alcaloides, glucósidos, saponinas, compuestos fenólicos, triterpenos, esteroides y monoterpenos. (cuadro 4).

Cuadro 4. Grupos de metabolitos secundarios de los extractos hexánico, acetónico y metanólico de *L. leucocephala* y *L. esculenta*.

Grupos de metabolitos secundarios	E.H		E.A		E.M	
	L. l.	L. e.	L. l.	L. e.	L. l.	L. e.
Compuestos fenólicos	-	-	+	-	+	-
Taninos	-	-	-	-	-	-
Alcaloides (Dragendorff)	-	+	-	-	-	-
Alcaloides (Mayer)	+	+	+	+	-	-
Glicósidos	-	-	-	-	+	+
Saponinas	-	-	-	-	+	+
Cumarinas	-	-	-	-	-	-
Triterpenos y esteroides	+	+	+	+	-	-
Monoterpenos	+	+	+	+	-	-

E.H: extracto hexánico, E.A: extracto acetónico, E.M: extracto metanólico; L. l. *L. leucocephala*. L. e. *L. esculenta*;
+: prueba positiva; -: prueba negativa

DISCUSIÓN

El mayor rendimiento, corresponde a los extractos metanólicos de ambas especies de guaje, lo que sugiere que la mayoría de los metabolitos contenidos en estas plantas son de naturaleza polar, como fenoles, taninos o saponinas, entre otros. Trabajos realizados por Savita & Preeti (2015) con tres extractos diferentes de hojas de *L. leucocephala* reportaron que el extracto metanólico tuvo un rendimiento de 2.43% en comparación con los extractos obtenidos con acetona y cloroformo (1.05 y 0.96% respectivamente). Un estudio de Román *et al.* (2014) reporta un mayor contenido de lípidos en las semillas del guaje rojo (3.65%) con respecto al guaje blanco (2.11%), lo que podría explicar un alto rendimiento con el extracto hexánico, ya que los compuestos lipídicos son solubles en disolventes apolares.

El efecto de los extractos metanólicos del guaje blanco y rojo sobre las cepas bacterianas, muestra diámetros de inhibición mayores respecto a los demás extractos. Reda *et al.* (2015) indica que gran parte de la actividad antimicrobiana se debe a flavonoides, compuestos fenólicos y saponinas los cuales están relacionados con solventes de alta polaridad, como etanol, metanol o agua. Asimismo, se observó que el efecto inhibitorio fue mayor en los extractos de guaje blanco (*L. leucocephala*) en comparación con los extractos de semillas de guaje rojo (*L. esculenta*) para estudios bacterianos. Por su parte, los extractos de hexano pueden contener metabolitos de naturaleza no polar como triterpenos o esteroides, los cuales han sido reportados por Aderibigbe *et al.* (2011) por poseer actividad antimicrobiana. Este mismo autor indica en un estudio realizado con las semillas del guaje blanco, halos de inhibición dependientes de la concentración para bacterias Gram positivas y negativas, como *S. aureus* con halos de inhibición de hasta 12 mm promedio y para *E. coli* de hasta 18 mm promedio. Nwe et

al. (2001) reporta actividad antibacteriana en cepas de *S. aureus* con halos de inhibición de 26 mm promedio para extractos alcohólicos de hojas de *L. glauca*, sin embargo otros autores como Reda *et al.* (2015) y Mathur *et al.* (2013) reportan que los extractos polares de hojas de *L. leucocephala* fueron activos para cepas de *S. aureus* y *E. coli* con diámetros de inhibición de 10 mm a 15 mm, rangos muy similares obtenidos por la presente investigación para esas cepas en el caso de extractos de semillas.

Un estudio realizado por Abu *et al.* (2016) donde se analizaron las propiedades antimicrobianas cuantitativas del extracto acuoso de hojas de *L. leucocephala* para dos cepas del género *Staphylococcus*, reportó valores de CMI superiores a los reportados para este trabajo: CMI para *S. aureus*: 1250 $\mu\text{g} / \text{mL}$, mientras que para *S. epidermidis*: 6250 $\mu\text{g} / \text{mL}$. En el presente trabajo, las diferentes cepas de *S. aureus* reportaron valores de CMI de 2000 a 4000 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Un informe de Savita & Preeti (2015) obtuvo los siguientes datos de CMI para *E. coli* para 3 disolventes diferentes a partir del extracto de hojas de *L. leucocephala*, extracto metanólico: 620 $\mu\text{g} / \text{mL}$, acetona: 5000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ y finalmente para el clorofórmico 1250 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Los valores reportados por este autor son inferiores a los de la presente investigación, donde solo se obtuvieron para el extracto de hexano de la semilla: CMI > 3000 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Se obtuvieron tres cinéticas de muerte de la cepa *S. aureus* CUSI donde se apreció un efecto significativo de la CMB en la disminución de la población bacteriana. Para *L. leucocephala*, la CMB de 6000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ del extracto acetónico mata al 99.9% de las bacterias en la primera hora del tratamiento, en tanto que la CBM del extracto metanólico disminuye las UFC/mL a partir de las 12 horas de exposición. Respecto a *L. esculenta*, la CMB de 4000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ para el extracto metanólico marca un decremento significativo de la población bacteriana en la décimo segunda hora de tratamiento, observándose un efecto de tipo bacteriostático. Dado lo anterior, el efecto antibacteriano puede deberse a la participación de diferentes metabolitos secundarios de naturaleza polar y una disminución significativa de UFC de *S. aureus* CUSI entre las primeras doce horas de exposición a los extractos de semillas de ambos guajes.

El efecto de los extractos del guaje rojo y blanco sobre las diferentes cepas de hongos mostró en el caso de levaduras, que de las 3 cepas con las que se trabajó, únicamente una fue susceptible: *C. glabrata* con halos de 6 y 7 mm de diámetro. Estos datos se asemejan a lo reportado por Mulaudzi (2015), con baja o nula acción del extracto acuoso de hojas de *L. leucocephala* con diámetros de 9 mm en promedio para *C. albicans*. Mathur *et al.* (2013) y Abu *et al.* (2016) no registran actividad del extracto acuoso ni del alcohólico sobre *C. albicans* ni *C. tropicalis*. Por otro lado, Reda *et al.* (2015) en su investigación, reporta halos de inhibición de 14 mm para el extracto crudo de hojas de *L. leucocephala* sobre *C. albicans*. Por lo que los extractos polares de *L. leucocephala* y *L. esculenta* presentan baja efectividad sobre las diferentes cepas de levaduras probadas.

Por otro lado, al aplicar los diferentes extractos de *L. leucocephala* y *L. esculenta* a las cepas de hongos miceliados, se encontró que los extractos acetónicos fueron efectivos para más cepas. Como en el caso de las cepas bacterianas, se demostró también que el guaje blanco es más efectivo que el guaje rojo para inhibir el crecimiento de las cepas de hongos filamentosos. Reda *et al.* (2015) indica que el extracto de hojas de *L. leucocephala* tuvo efecto sobre *A. niger*. A pesar de este reporte otros dos estudios indican efecto inexistente del extracto de guaje blanco sobre *A. niger* (Abu *et al.*, 2016; Aderibigbe *et al.*, 2011).

Posterior al análisis exploratorio, fue determinada la Concentración Fungicida Media (CF₅₀), la cual se define como la concentración de un extracto o compuesto que disminuye la población en un 50%. Se hace mención que para obtener estas curvas, la actividad de los antifúngicos al igual que la de los antibacterianos depende de una serie de factores como son: la temperatura de incubación, el pH y el medio de cultivo, cuya influencia viene determinada por su incidencia en la velocidad de crecimiento del hongo (Cantón & Pemán, 1999). La actividad cuantitativa sobre las cepas de hongos filamentosos mostró valores de CF₅₀ significativos para todos los casos, por

lo que existe efecto inhibitorio de las poblaciones de hongos miceliados por parte de los extractos de semillas de ambos guajes. Cabe resaltar que no hay reportes de evaluaciones cuantitativas de CF_{50} para las cuatro cepas utilizadas en la literatura científica existente hasta la fecha, sin embargo, un trabajo con una leguminosa del género *Lupinus* mostró nula inhibición de extractos acuosos de las hojas con base de liofilizados, probándolos en cepas de *T. rubrum*. Argumenta el autor, la importancia del proceso de extracción ya que el efecto fungicida que se adjudica a los alcaloides contenidos en las hojas puede perderse en el proceso de obtener los extractos (Coloma, 2009).

La investigación sobre antimicrobianos mostró que hay diferencia significativa en el uso de extractos metanólicos y acetónicos de ambos guajes, sobre ciertas cepas microbianas, que si bien no equipara a la actividad de los fármacos control se demostró su efectividad en términos estadísticos. Es importante considerar que un extracto es una mezcla de compuestos y estos pueden tener cierta actividad biológica con menor efecto que un compuesto aislado o un fármaco como los controles positivos utilizados (Ávalos & Pérez, 2009).

La variabilidad de los datos puede deberse a las condiciones del medio al que están sometidas las especies vegetales. Bhalla *et al.* (2005) indica que la concentración, presencia o efecto de metabolitos secundarios varía respecto a condiciones como depredación, polinización o relaciones de simbiosis, entre otros factores. Además, las condiciones ambientales adecuadas como la incidencia de luz, temperatura, presión, altitud, humedad y tipo de suelo, entre otros, son elementos importantes a considerar en el efecto de los extractos vegetales sobre las actividades biológicas, ya que son los metabolitos especializados los que proporcionan principalmente los resultados esperados.

Se debe considerar además del efecto de los extractos, los mecanismos de acción de los antimicrobianos y las diferencias estructurales y fisiológicas entre las cepas utilizadas. Los agentes antimicrobianos actúan por una serie de mecanismos que son muy diferentes entre sí y cuyas dianas se encuentran en diferentes regiones de la célula, en general estas dianas son: la pared, la membrana celular, la síntesis proteica por inhibición de funciones ribosómicas, la síntesis de ácidos nucleicos o la inhibición de otras vías metabólicas (Errecalde, 2004; Murray *et al.*, 2017).

El guaje rojo y el guaje blanco pertenecen a la familia de las leguminosas; se ha investigado que cantidades apreciables de aminoácidos tóxicos y sustancias como taninos y saponinas existen frecuentemente en las hojas y semillas de esta familia. Las saponinas, son capaces de inhibir el crecimiento bacteriano, como se reporta en semillas de *Acacia auriculiformis* (Yik *et al.*, 2011). La mimosina, un alcaloide reportado para plantas del género *Leucaena*, contiene en las hojas, tallos y semillas de *L. leucocephala* cantidades de aproximadamente 30 mg / g (D'Mello, 1992). Asimismo, Yik *et al.* (2011) indica la presencia del alcaloide mimosina en semillas de *L. leucocephala* de 23 mg / g de peso seco. Compuestos fenólicos fueron reportados en hojas, flores, tallos, semillas y raíces, como: taninos, flavonoides, antocianinas o cumarinas, además de otros metabolitos como glucósidos, terpenos y esteroides con potencial antimicrobiano (Reda *et al.*, 2015; Savita & Preeti, 2015). Finalmente, Aderibigbe *et al.* (2011) evidenciaron la presencia de triterpenos y esteroides de semillas de *L. leucocephala*, además de otros glicolípidos y carotenoides.

Cabe señalar que en las pruebas coloridas no se obtuvieron resultados positivos para los taninos, sin embargo la literatura reporta estos metabolitos secundarios, este resultado podría deberse al tipo de solvente utilizado, la cantidad de extracto y la cantidad de metabolitos secundarios contenidos en el muestras, ya que tienden a estar en cantidades ínfimas para dar resultados positivos (Ringuelet & Viña, 2013) y que al tener un contenido de taninos muy bajo, el viraje de color es invisible a simple vista dando falsos negativos.

CONCLUSIONES

Los extractos metanólicos y acetónicos de semillas de ambos guajes presentaron una mayor actividad biológica sobre cepas de *S. aureus* y *E. coli* (bacterias) y *Trichophyton mentagrophytes* y *Aspergillus niger* (hongos miceliados). Por otro lado, los valores de CMB y CF₅₀ fueron significativos inhibiendo el desarrollo microbiano. Además, se propone que los metabolitos involucrados en la actividad antimicrobiana son de naturaleza polar, como saponinas, alcaloides, compuestos fenólicos, entre otros. El presente estudio contribuye a validar el uso en la medicina popular de *L. leucocephala* y *L. esculenta* para tratar algunas enfermedades infecciosas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Conacyt, al Posgrado en Ciencias Biológicas y a la UNAM por permitir y promover el trabajo científico otorgando una beca de posgrado con número de CVU de 777911. Agradecemos la cooperación del Dr. Erick Nolasco, Dra. Julieta Orozco, Dr. Antonio Estrella y Dra. Anaid Mora por su asistencia técnica.

LITERATURA CITADA

- Abu, M., Yin, H., Isha, A., & Armania, N. (2016). Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic potential of condensed tannins from *Leucaena leucocephala* hybrid-Rendang. *Food Science and Human Wellness*, 5(2), 65–75. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fshw.2016.02.001>
- Aderibigbe, S. A., Adentunji, O. A., & Odeniyi, M. A. (2011). Antimicrobial and pharmaceutical properties of the seed oil of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. (Leguminosae). *African Journal of Biomedical Reserch*, 14(1), 63–68. <https://cutt.ly/PI2ii3c>
- Ávalos, G. A., & Pérez, E. C. (2009). Metabolismo secundario de planta. *Serie Fisiología Vegetal.*, 2(3), 119–145. <https://cutt.ly/lI2iLbA>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bhalla, R., Narasimhan, K., & Swarup, S. (2005). Metabolomics and its role in understanding cellular responses in plants. *Plant Cell Rep*, 24, 562–571. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00299-005-0054-9>
- Brodie, R., & Simonyi, C. (2020). *Excel* (19.0).
- Bulugahapitiya, V. P. (2018). *Plants Based Natural products Extraction , Isolation and Phytochemical screening* (Issue April). Indika Graphics. <https://cutt.ly/r10CQbr>
- Cantón, E., & Pemán, J. (1999). Curvas de letalidad en antifúngicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 16, 82–85. <https://cutt.ly/FI2pWi9>
- CLSI. (1998). *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents. Approved Guideline*. CLSI document M26-A.
- CLSI. (2004). *Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Guideline*. CLSI document M44-A. CLSI.
- CLSI. (2010). *Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi, Approved guideline*. CLSI document M51-A.
- CLSI. (2012a). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard*. (9th ed.). CLSI document M07-A9.
- CLSI. (2012b). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard* (7th ed.). CLSI document M02-A11.

- Coloma, J. M. (2009). *Evaluación in vitro de la actividad antifúngica de los alcaloides del chocho (Lupinus mutabilis Sweet)* [Escuela Superior Politécnica Chimborazo]. <https://cutt.ly/D12kkK0>
- Curiel, E. , Hernández, M., Ramírez, J., Rivas, A., Ortiz, M., Serrano, R., & Hernández, T. (2017). Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae). *American Journal of Plant Sciences*, 8, 511–1524. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.87104>
- D’Mello, J. P. (1992). Chemical constraints to the use of tropical legumes in animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, 38(3), 237–261. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0377-8401\(92\)90105-F](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0377-8401(92)90105-F)
- Dago, Y., Milian, J., Calzadilla, K., Redonet, M., López, Y., & Hernández, 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. http://scielo.sld.cu/pdf/cfp/v8n1/en_2310-3469-cfp-8-01-154.pdf
- Domínguez, X. (1978). *Métodos de Investigación Fitoquímica* (3ª ed.). Limusa.
- Errecalde, J. O. (2004). *Mecanismo de acción de antibióticos. Uso de Antimicrobianos en Animales de Consumo Humano*. 67. <https://doi.org/92-5-305150-7>
- Hammer, Ø., Harper, D., & Ryan, P. . (2020). *PAST* (4.03).
- Marcano, D., & Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica orgánica*. Universidad Central de Venezuela.
- Mathur, P., Singh, A., Vivek, S., Singh, D., & Yati, M. (2013). Antimicrobial activity of indigenous wildy growing plants: potential source of green antibiotics. *African Journal of Biomedical Reserch*, 7(29), 3807–3815. <https://cutt.ly/UI0u6qB>
- Mulaudzi, T. M. (2015). *Bioactivity and chromatographic profiles of the selected medicinal plants against Candida albicans*. University of Veda.
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2017). *Microbiología médica* (8th Ed.). Elsevier.
- Nwe, W., Mar, N., Nyunt, W., Myint, W., Hla, S., & Myint, K. (2001). Antibacterial Activity of Selected Myanmar Medicinal Plants. *Journal Myanmar Academic Technology*, 1, 75–88. <https://cutt.ly/Y10wSrb>
- Orozco, J., Lira, R., Jiménez, M., Ávila, J. G., Serrano, R., & Hernández, T. (2020). Plantas medicinales de Oaxaca, México: Etnobotánica y actividad antibacteriana. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 19(2), 221–235. <https://doi.org/https://doi.org/10.37360/blacpma.20.19.2.14>
- Osuna, L., Tapia, M. E., & Aguilar, A. (2005). *Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico*. Universitat de Barcelona. <https://cutt.ly/O11tr10>
- Peralta, I., Gómez, A., Romero, P. A., & Reyes, A. (2017). Uso antropocéntrico del guaje *Leucaena esculenta* (Moc. & Sessé Ex. DC.) Benth, en dos comunidades de la mixteca baja oaxaqueña, México. *Polibotánica.*, 43, 1–16. <http://www.scielo.org.mx/pdf/polib/n43/1405-2768-polib-43-00349.pdf>
- Quevedo, Y. (2015). Plantas medicinales: un estudio de caso etnobotánico en la localidad de Ocotepc, municipio de Cuernavaca, Morelos. In *Biblioteca.Upaep.Mx*. http://biblioteca.upaep.mx/pdf/L_PS_Flores_Diaz_MC.pdf
- Reda, S. M., ElSouda, S. S., Hanan, A. , Moharam, M. , & Shaker, K. (2015). Antioxidant, antimicrobial activities of flavonoids glycoside from *Leucaena leucocephala* leaves. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(6), 138–147. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50623>
- Ringuelet, J. A., & Viña, S. (2013). *Productos naturales vegetales*. Editorial Universidad de La Plata. <https://cutt.ly/sl2vJ33>
- Román, D. (2015). *Uso potencial de recursos vegetales en el municipio de Tlayacapan, Morelos*. Instituto Politécnico Nacional.
- Román, N., García, M., Castillo, A. M., Sahagún, J., & Jiménez, A. (2014). Componentes nutricionales y antioxidantes de dos especies de guaje (*Leucaena* spp.): un recurso ancestral subutilizado. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 20(2), 157–170. <https://doi.org/https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2013.07.023>

Recibido:
31/julio/2020

Aceptado:
4/julio/2021

- Ross, I., & Gentleman, R. (2019). *RStudio Team* (3.6.1).
- Savita, S., & Preeti, S. (2015). Evaluation of antibacterial and antimutagenic potential of *Acokanthera oppositifolia* and *Leucaena leucocephala*. *American Journal of Pharmacy and Health Research*, 2015(3), 1. <https://cutt.ly/G10uuH1>
- Scrase, R. (1995). Cultivating mushrooms, from pure culture to spawn production. *Mycologist*, 9(2), 53–56. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0269-915X\(09\)80207-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0269-915X(09)80207-3)
- Sepúlveda, J., Torres, J., Sandoval, C., Martínez, J., & Chan, J. (2018). 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*, 5(2), 79–95. <https://cutt.ly/Q11k1Re>
- Sierra, M., Barros, R., Gómez, D., Mejía, A., & Suárez, D. (2018). *Productos naturales: Metabolitos secundarios y aceites esenciales*. UNIAGRARIA. <https://cutt.ly/7luelzL>
- Waizel, J. (2006). Las plantas en la historia de la medicina, breve visión histórica. In J. Waizel (Ed.), *Las plantas medicinales y las ciencias. Una visión multidisciplinaria*. (pp. 181–201). Instituto Politécnico Nacional.
- Yik, C., Ling, E., Ling, Y., Lim, Y., Stanslas, J., & Goh, J. (2011). . Assessment of phytochemical content polyphenolic composition antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11(12), 1472. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-12>
- Zárate, S. (1987). Guaje blanco. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. *Pytologia*, 63(4), 304–306. <https://cutt.ly/i11hWOH>
- Zárate, S. (1994). Revisión del género *Leucaena* en México. *Anales Del Instituto de Biología*, 62(2), 83–162. <http://revistas.unam.mx/index.php/bot/article/view/1863>

CAPÍTULO III.

INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA Y ENSAYOS BIODIRIGIDOS

Como resultado del trabajo fitoquímico biodirigido con los extractos activos de semillas de *L. leucocephala* y *L. esculenta* fue publicado **el artículo de requisito:** “**Estudio biodirigido de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana y aislamiento de D-pinitol de semillas de *Leucaena esculenta* y *L. leucocephala*. Bio-guided study of secondary metabolites with antimicrobial activity and isolation of D-pinitol from *Leucaena esculenta* and *L. leucocephala* seeds**”, el cual fue aceptado en la revista científica “Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas” (ISSN: 0717-7917) arbitrada e indexada internacionalmente cuya cita es:

“Mora-Villa A, Estrella-Parra A, Avila-Acevedo G, Jiménez-Estrada M, Lira-Saade R, Hernández-Delgado T (2023). Estudio biodirigido de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana y aislamiento de D-pinitol de semillas de *Leucaena esculenta* y *L. leucocephala*. *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe De Plantas Medicinales Y Aromáticas*, **22**(5), 657-675. <https://doi.org/10.37360/blacpma.23.22.5.48>”

El trabajo muestra la actividad antimicrobiana de compuestos fenólicos contenidos en los extractos polares de ambas semillas de guaje, además de la caracterización química de un compuesto aislado mediante técnicas espectroscópicas.

Artículo Original / Original Article

Estudio biodirigido de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana y aislamiento de D-pinitol de semillas de *Leucaena esculenta* y *L. leucocephala*

[Bio-guided study of secondary metabolites with antimicrobial activity and isolation of D-pinitol from *Leucaena esculenta* and *L. leucocephala* seeds]

Ángeles Mora-Villa¹, Antonio Estrella-Parra², Guillermo Ávila-Acevedo², Manuel Jiménez-Estrada³,
Rafael Lira-Saade⁴ & Tzasná Hernández-Delgado¹

¹Laboratorio de Bioactividad de Productos Naturales; ²Laboratorio de Fitoquímica & ⁴Laboratorio de Recursos Naturales, UBIPRO, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México

³Laboratorio de Productos Naturales. Instituto de Química, UNAM, Ciudad de México, México

Reviewed by:
Ignacio Agudelo
Universidad de Buenos Aires
Argentina

Juan Bueno
Fundación BIOLABB
Colombia

Correspondence:
Ángeles MORA-VILLA:
angel_es_micamuso@hotmail.com

Section Biological activity

Received: 22 August 2022
Accepted: 20 November 2022
Accepted corrected: 14 December 2022
Published: 30 September 2023

Citation:

Mora-Villa A, Estrella-Parra A, Ávila-Acevedo G,
Jiménez-Estrada M, Lira-Saade R,
Hernández-Delgado T
Estudio biodirigido de metabolitos secundarios con
actividad antimicrobiana y aislamiento de D-pinitol
de semillas de *Leucaena esculenta* y
L. leucocephala
Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat
22 (5): 657 - 675 (2023).
<https://doi.org/10.37360/blacpma.23.22.5.48>

Abstract: Phytochemical bio-guided studies are used to find compounds with biological activity. Flavonoids from seeds of *Leucaena* species have antimicrobial activity in strains of medical interest, therefore, fresh seeds were collected from the town of Tlayacapan, Morelos, Mexico. The methanolic extracts were obtained by the maceration technique, targeted fractionation was performed using adsorption and molecular exclusion chromatographic techniques; to observe the antimicrobial activity, agar diffusion techniques were used; spectrometric and spectroscopic techniques were used for the characterization of D-pinitol, resulting from the fractionation of *L. leucocephala*. Antimicrobial activity was found on strains of *Escherichia coli* CUSI and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 of the most polar fractions, identifying the responsible compounds by HPLC: caffeic acid, gallic acid, p-coumaric acid, quercetin, catechin and apigenin, these compounds can inhibit the activation enzymatic, synthesis of nucleic acids and proteins, chelating with different ions, etc.

Keywords: Antimicrobial; Chromatography; D-pinitol; *Leucaena*; Natural products.

Resumen: Los estudios biodirigidos fitoquímicos son empleados para encontrar compuestos con actividad biológica. Los flavonoides de semillas de especies de *Leucaena* son reportados por tener actividad antimicrobiana sobre cepas de interés médico, por tanto, se colectaron semillas frescas de la localidad de Tlayacapan, Morelos, México. Se obtuvieron los extractos metanólicos mediante la técnica de maceración, el fraccionamiento dirigido se realizó empleando técnicas cromatográficas de adsorción y exclusión molecular; la actividad antimicrobiana se determinó mediante técnicas de difusión en agar; se utilizaron técnicas espectrométricas y espectroscópicas para la caracterización del D-pinitol, resultado del fraccionamiento de *L. leucocephala*. Se encontró actividad antimicrobiana sobre cepas de *Escherichia coli* CUSI y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 de las fracciones más polares, identificando los compuestos responsables vía HPLC: ácido caféico, ácido gálico, ácido p-cumárico, quercetina, catequina y apigenina, dichos compuestos pueden inhibir activación enzimática, síntesis de ácidos nucleicos y proteínas. quelarse con diferentes iones. etc.

Palabras clave: Antimicrobiano; Cromatografía; D-pinitol; *Leucaena*; Productos naturales.

INTRODUCTION

La acción preventiva o curativa de las plantas se debe a principios activos que son producto del metabolismo secundario de las mismas. Son conocidos más de 100.000 metabolitos secundarios y sólo el 1% cuenta con estudios fitoquímicos de caracterización e identificación de moléculas y de actividades biológicas de importancia médica (Akerle, 1993; Bhalla et al., 2005; Llorente y Ocegueda, 2008). Las especies de la familia Fabaceae representan buenas candidatas para realizar estudios de actividades biológicas debido a su diversidad taxonómica, fitoquímica y por ser de alto consumo por la población en general (Villaseñor, 2004).

El género *Leucaena* es uno de los 754 géneros que tiene la familia Fabaceae, cuenta con 24 especies a nivel mundial y 13 de ellas se encuentran en México. Tradicionalmente han sido utilizadas para la alimentación, vivienda y terapéutica de diversas etnias del territorio mexicano, donde son popularmente conocidas como "guajes" (Zolla, 1980; Zárate, 1994; Rojas et al., 2001).

Las especies más representativas del género *Leucaena* son *L. leucocephala* y *L. esculenta*, coloquialmente conocidas como "guaje blanco" y "guaje rojo" respectivamente. *L. leucocephala* es característicamente un árbol glabrescente de hasta 12 m de alto, con ramas cilíndricas, pinnas de 6 a 9 pares, foliolos de 9 a 18 (-24) pares; inflorescencia blanca; fruto tipo vaina oblongo, café y liso; las semillas son obovadas moreno rojizo claro a oscuro; naturalizada pantropical y ampliamente distribuida como planta cultivada. Por su parte, *L. esculenta* es un árbol de hasta 15 m de alto, con corteza lisa, color gris claro brillante, ramas carinadas, pinnas de 18 a 32 pares, foliolos 39 a 64 (-85) pares; inflorescencia blanca y globosa; fruto tipo vaina membranaceo rojizo o pardo; las semillas son obovadas castaño rojizas o amarillentas; se distribuye en la sierra Madre del Sur, en la Depresión del Balsas, la Depresión Tehuacán-Cuicatlán-Quioatepec y las zonas de la Alta Mixteca. En México, ambas especies, son principalmente utilizadas como recurso comestible, cerca viva, forrajera y medicinal (Zárate, 1994; Zárate, 1997).

En estudios etnobotánicos hechos en México, se reportan efectos analgésicos, anticancerígenos, antiinflamatorios, antidiabéticos, afrodisíacos, eupépticos, antiparasitarios y antimicrobianos de extractos de hojas y semillas de *L. leucocephala* y *L.*

esculenta (Zárate, 1987; Zárate, 1999; Lim, 2012; Román, 2015; Peralta et al., 2017; Sepúlveda et al., 2018; Mora et al., 2021). Específicamente, en estudios antimicrobianos mediante la técnica de difusión en agar, se reporta actividad de los extractos de hojas y semillas de *L. leucocephala*, principalmente sobre cepas de *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* con halos de inhibición promedio de 15 mm para *E. coli* y *S. aureus* (Nwe et al., 2001; Mathur et al., 2013; Savita y Preeti, 2015; Dago et al., 2020). En el caso de *L. esculenta*, los extractos acuosos y metanólicos de las semillas fueron efectivos contra cepas bacterianas de *E. coli* y *S. aureus* con halos de inhibición de 16 mm en promedio (Mora et al., 2021). En términos cuantitativos y mediante la técnica de microdilución en caldo Abu et al. (2016) y Mora et al. (2021), reportaron valores de CMI del extracto acuoso y metanólico de hojas y semillas de *L. leucocephala* y *L. esculenta* para *S. aureus* de CMI de 2000 a 6000 µg/mL. Mientras que un informe de Savita y Preeti, (2015) obtuvo los siguientes datos de CMI para *E. coli* a partir del extracto de hojas de *L. leucocephala*, extracto metanólico: 620 µg/mL, acetona: 5000 µg/mL y finalmente para el clorofórmico 1250 µg/mL. Las CMI de los antibióticos convencionales suelen oscilar entre 0.01 y 10 µg/mL, mientras que los compuestos vegetales se clasifican habitualmente como antimicrobianos si sus CMI oscilan entre 100 y 1000 µg/mL (Bubonja-Šonje et al., 2020). Por su parte, Ríos y Recio, (2005) proponen que la CMI para la actividad antimicrobiana de un extracto de planta y un compuesto aislado para que se consideren significativos debe estar por debajo de 100 µg/mL y por debajo de 10 µg/mL, respectivamente. Sin embargo, es importante mencionar que la actividad antimicrobiana de un extracto es significativamente diferente a la de un compuesto puro ya que en el primer caso se trata de una mezcla donde los compuestos activos pueden estar en baja concentración, inhibirse en presencia de otros compuestos o incluso ser inactivos; en tanto que, al tratarse de compuestos puros, estos actúan potenciando su actividad. Según Fabry et al. (1998), se considera que las plantas con CIM por debajo de 8000 µg/mL muestran cierta actividad antimicrobiana, Gibbons, (2004); Ríos y Recio, (2005) y Oliveira et al., (2013) afirman que los

extractos de plantas y productos naturales con CIM por debajo de 1000 µg/mL son buenos candidatos para fármacos antimicrobianos.

Respecto a estudios fitoquímicos en *L. leucocephala* se reporta la presencia de flavonoides, saponinas, fenoles, glicósidos cardíacos, terpenoides (Revathi y Deivasigamani, 2018) y taninos condensados (Stewart y Dunsdon, 1998; Espinoza et al., 2003). Algunos compuestos han sido identificados mediante GC-MS como: neofitadieno (9.48%), octadecaeno (3.15%), 1-octadeceno (3.85%), fitol (52.51%) y hexacosano (7.26%) (Umaru et al., 2018). Por otro lado, otros compuestos como derivados de quercetina y catequina, apigenina y ácidos fenólicos fueron identificados en extractos polares de hojas y semillas de guaje blanco (Chung-Yi y Yau-Der, 2010a; Chung-Yi y Yau-Der, 2010b; Chen y Wang, 2011). En tanto que *L. esculenta* tiene presencia de taninos condensados en el extracto metanólico de hojas (Stewart y Dunsdon, 1998; Osborne y McNeill, 2001; Dalzell y Shelton, 2002; Barahona et al., 2003) y triptaminas en la corteza (Zárate, 1994).

Para lidiar con la creciente mortandad que producen las enfermedades infecciosas respiratorias e intestinales, además de la problemática de la resistencia microbiana a los antibióticos comerciales, se ha retomado la búsqueda de principios activos de plantas en los taxa más diversos y utilizados en la medicina tradicional para el tratamiento de estos padecimientos (Miethke et al., 2021). Aunado a esto, los recursos vegetales son muy utilizados ya que las plantas son materia de fácil obtención, manejo, requieren de pocos cuidados y representan bajos costos para la mayoría de las comunidades humanas (Waizel, 2006; OMS, 2013; Royaka et al., 2014; OMS, 2017; Flatley, 2019).

La elucidación de compuestos vegetales de interés médico se lleva a cabo de diferentes maneras, Atanasov et al. (2015), remarca 5 principales estrategias entre las cuales detalla dos principales por su facilidad, precisión y ventajas, una es la metabolómica, la cual se utiliza para medir de forma global los metabolitos de bajo peso molecular, lo que permite la comparación simultánea de diferentes muestras y por tanto, destacar los compuestos producidos como biomarcadores para ser empleados como antimicrobianos potenciales (Wu et al., 2015), sin embargo tiende a ser costosa. Por otro lado, los estudios biodirigidos fitoquímicos son una de las

estrategias de obtención de metabolitos con actividades biológicas más usuales, estos se basan en que, los extractos que muestran la actividad de interés son seleccionados y sometidos a fraccionamiento por cromatografías (Lautié et al., 2020), y en el caso de los productos naturales antimicrobianos son probados mediante métodos microbianos en agar y con las cepas correspondientes (Abreu et al., 2008). Si bien, existen diferencias sobre la obtención de metabolitos según la técnica, es importante resaltar la enorme diversidad de moléculas como potenciales antibióticos y tratar así, de superar las limitaciones en los diversos sectores de investigación y financiación para potenciar el desarrollo de productos seguros y de calidad (Miethke et al., 2021).

Debido a los antecedentes etnobotánicos, antimicrobianos y fitoquímicos se considera que los metabolitos secundarios, particularmente flavonoides de semillas de ambas especies de *Leucaena* poseen actividad antimicrobiana sobre cepas de interés médico, el objetivo del presente estudio fue la identificación de productos naturales capaces de inhibir desarrollo bacteriano a través de un estudio biodirigido fitoquímico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de colecta

Las semillas de ambos guajes se recolectaron en la localidad de Tlayacapan, Morelos (18°57'20"N y 98°58'52" W, 1640 msnm), en julio de 2018. Un ejemplar completo de cada especie fue depositado en el Herbario IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI), UNAM.

Obtención de los extractos y particiones

Las semillas fueron colectadas en fresco (500 g de cada especie), secadas a temperatura ambiente y sin exposición solar directa, posterior a ello, fueron trituradas con un molino para plantas. Los extractos se obtuvieron a través de la técnica de maceración (Sierra et al., 2018) mediante el uso de solventes de diferente polaridad: hexano, acetona y metanol de forma subsecuente y partiendo del mismo material vegetal colocados en matraces de 1L de capacidad (durante 3 días por solvente). Las particiones se realizaron con 20 y 18 g de los extractos metanólicos (dada su actividad biológica) de ambas especies de *Leucaena*, las cuales fueron obtenidas con la maceración de estas en hexano, metanol y agua y separadas mediante un embudo de separación. Los

extractos y particiones se filtraron y concentraron a presión reducida con un rotavapor Heidolph Laborota 4001 acoplado a un equipo de destilación simple (Domínguez, 1978). El rendimiento de cada uno de ellos fue determinado por diferencia de peso, tomando como el total la materia base en cada cálculo: semillas, extractos o particiones (expresado en gramos y en porcentajes). Se partió de un total de peso seco de semillas de: 434.34 g *L. leucocephala* y 458.63 g *L. esculenta*.

Ensayos coloridos cualitativos

Los grupos de metabolitos secundarios fueron identificados mediante el uso de ensayos coloridos (Tabla N° 1). Para ello se realizó una solución patrón con 5 mg de cada extracto a probar disuelto en 2 mL de metanol, esta reaccionó con una serie de reactivos específicos para conocer presencia o ausencia de grupos polares del extracto metanólico como fenoles, taninos, alcaloides, glucósidos, saponinas y cumarinas (Domínguez, 1985; Marcano & Hasegawa, 2002; Bulgahapitiya, 2018; Mora et al., 2021).

Tabla N° 1
Pruebas coloridas para la presencia de grupos de metabolitos secundarios

Grupo de MS	Reactivos	Metodología	Prueba positiva
Fenoles	Cloruro férrico	1 mL de solución patrón + 3 gotas de cloruro férrico	Coloración azul o verde
Taninos	Reactivo de gelatina	Tubo de solución positiva de fenoles + 3 gotas de reactivo de gelatina	Precipitado azul o verde
Alcaloides	Dragendorff y/o Mayer	1 mL de solución patrón + 3 gotas de reactivo de Dragendorff y/o Mayer	Precipitado rojizo (Dragendorff), precipitado lechoso (Mayer)
Glucósidos	α -naftol y HCl	1 mL de solución patrón + 3 gotas de α -naftol y 3 gotas de HCl concentrado	Anillo morado
Saponinas	Agua destilada	10 mg de extracto + agua destilada → agitar por al menos dos minutos	Espuma que permanece por al menos un minuto
Cumarinas	NaOH y HCl	1 mL de NaOH al 10% + 5 gotas de solución patrón	Si hay coloración amarilla agregar 3 gotas de HCl al 10%. Si la mezcla se vuelve transparente la prueba es positiva

MS: Metabolitos secundarios

Técnicas cromatográficas

Cromatografía en capa fina (CCF). Muestras totalmente solubilizadas en metanol de los extractos polares fueron colocadas con ayuda de un capilar de vidrio de 0.5 mm en cromatofolios (Merck) con soporte de aluminio con un espesor uniforme de adsorbente de sílica de 0.1 mm. Se realizaron 4 descargas de cada muestra sobre el punto de aplicación. Se utilizaron mezclas de solventes de hexano, acetona y metanol como fases móviles. La

visualización de las fracciones en el cromatofolio se llevó a cabo mediante luz UV 366 nm y 254 nm y revelador de sulfato cérico (Marcano y Hasegawa, 2002; Sherma y Fried, 2003).

Cromatografía en columna abierta (Sílica gel y Diaion® HP-20). Para el fraccionamiento de los extractos activos se realizaron columnas de adsorción y de exclusión molecular en columnas de cristal de 4 cm de diámetro. En el primer caso, la columna empacada con sílica gel como fase estacionaria, tuvo

una relación de 20:1 con la muestra cuyo peso fue de 13.88 g de extracto metanólico de semillas de *L. leucocephala* (empacada en húmedo); la fase móvil consistió en mezclas de hexano, acetona y metanol de forma ascendente en polaridad; finalmente, se tomaron alicuotas de 200 mL cada una hasta el avance total de la muestra. Por su parte, las columnas de exclusión molecular, cuya fase estacionaria fue Diaion® HP-20 en relación 20:1 con la muestra, partieron de 4 a 8 g de extractos metanólicos y acuosos de semillas de ambas especies de *Leucaena* (los cuales demostraron altos rendimientos y actividad biológica); las fases móviles consistieron en mezclas de metanol: agua de forma ascendente en polaridad; para concluir se tomaron alicuotas de 50 mL hasta el avance total de la muestra por cada columna. Todas las fracciones obtenidas se filtraron y concentraron a presión reducida con ayuda de un rotavapor Heidolph Laborota 4001 acoplado a un equipo de destilación simple. Las alicuotas obtenidas se analizaron mediante cromatografía en capa fina (Marcano y Hasegawa, 2002; Corzo, 2019).

Cromatografía HPLC

Las 6 fracciones finales de las columnas abiertas con actividad biológica (ver Tabla N° 3) fueron analizadas en un HPLC de arreglo de diodos UV-VIS (HPLC-DAD-FD) Agilent 1100 Series. Se pesaron 10 mg de cada fracción, los cuales se disolvieron en 1 mL de metanol (grado HPLC), se filtraron a través de una membrana PVDF con un tamaño de poro de 0.2 µm, se sonicaron y finalmente fueron inyectados 30 µL de cada muestra. Se utilizó una columna Hibar® 250-4 LiChrosorb® RP-8 (10 µm) de fase reversa. La fase móvil fue un solvente de sistema binario que consistió en: agua (A) y metanol (B) a un flujo de 0.600 mL/min y la detección se realizó a 280 nm bajo condiciones de temperatura controlada de 25°C. Los cromatogramas se obtuvieron con el programa LC Agilent. La identificación de los compuestos se realizó comparando los tiempos de retención (tr) obtenidos con los estándares puros de ácido caféico, ácido gálico, ácido p-cumárico, catequina, quercetina y apigenina marca Sigma-Aldrich®, preparando 1 mg del estándar en 1 mL de metanol grado HPLC (Marcano y Hasegawa, 2002; Corzo, 2019).

Pruebas físicas y químicas

Se registraron características físicas como el aroma, color, tamaño y forma de los cristales. Se llevaron a

cabo pruebas de solubilidad tomando un cristal para disolverlo en 10 µL de solventes: hexano, acetona, metanol, agua y DMSO. Por otro lado, se determinó el punto de fusión por el método de Fisher Johns con el aparato del mismo nombre. Dicha técnica consiste en colocar unos cristales de la muestra entre dos cubreobjetos redondos, los cuales se ponen sobre una plancha de metal que se va calentando grado a grado, el aparato acopla un termómetro y una lupa para observar la temperatura exacta a la cual la muestra comienza a fundir (Pasto y Johnson, 1981).

Elucidación del compuesto por técnicas espectroscópicas y espectrométricas

Se analizaron por métodos espectroscópicos y espectrométricos el compuesto aislado en los Laboratorios de Espectroscopía y Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN) del Instituto de Química de la UNAM. Los análisis realizados fueron: espectrometría de masas para conocer el peso molecular del compuesto por el método de "Ion mode: EI+", espectroscopía infrarroja, para conocer las señales de los grupos funcionales característicos del compuesto mediante el método "Película EGR", resonancia magnética nuclear de protones (RMN H1) y resonancia magnética de carbono (RMN C13) en un aparato de 500 MHz y cuya muestra se disolvió en DMSO. Esta técnica se usa para conocer el número, posición espacial y desplazamiento de los carbonos e hidrógenos contenidos en la muestra. Para todas las pruebas mencionadas se utilizaron 5 mg de compuesto, donde en algunas de ellas la muestra pudo ser recuperada.

Técnica de difusión en agar

Para identificar la actividad antibacteriana, se utilizó el método de difusión en agar (CLSI, 2012; Balouiri et al., 2016). Se prepararon inóculos bacterianos en 10 mL de caldo Müller-Hinton (Bioxon) y se incubaron a 37°C durante 24 h. Los inóculos se ajustaron con solución salina estéril para obtener la turbidez del estándar de McFarland No. 0.5 (108 UFC/mL). Las bacterias fueron inoculadas en placas de agar Muller-Hinton (MH), en las cuales se colocaron discos de papel filtro (Whatman N°5) de 5 mm de diámetro impregnados con 2 mg de extracto, (por disco). Como control positivo se utilizaron discos impregnados con 25 µg de cloranfenicol y como control negativo discos con 10 µL de solvente.

Las placas se incubaron a 37°C durante 18 h. Los halos de inhibición se reportan en mm. El experimento se realizó por triplicado. Se utilizó una cepa Gram positiva: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y una cepa Gram negativa: *Escherichia coli* CUSI, donadas por el laboratorio de análisis clínicos de la Clínica Universitaria de Salud Integral (CUSI) de la FES Iztacala (UNAM), cuya susceptibilidad fue probada por Mora et al. (2021).

Bioautografía

Para conocer la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas, se empleó la bioautografía. La placa cromatográfica (previamente revelada con los compuestos de interés) se colocó en cajas Petri con medio MH y con los inóculos bacterianos sembrados mediante la técnica de difusión en agar. Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 h. Para la visualización del crecimiento microbiano, se asperjó una solución de Cloruro de Tetrazolio sobre el bioautograma, el

cual se vuelve a incubar a 37°C durante 30 min. Pasado ese tiempo se revisa la placa para marcar las franjas de él o los compuestos que inhibieron el crecimiento bacteriano. Se utilizaron las cepas susceptibles a las pruebas antimicrobianas: *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* CUSI, donadas por el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Clínica Universitaria de Salud Integral (CUSI) de la FES Iztacala (UNAM) (Choma y Grzelak, 2011; Dewanjee et al., 2015; Balouiri et al., 2016).

Análisis estadísticos

Con los datos antimicrobianos obtenidos se determinó, la desviación estándar y la media de los experimentos; el análisis estadístico de las diferencias entre los valores medios obtenidos para los grupos experimentales se realizó mediante análisis de varianza (modelo ANOVA), los valores se calcularon con el programa PAST (2020) versión 4.03 (Hammer et al., 2020).

Tabla N° 2
Rendimiento, actividad biológica e identificación colorida de metabolitos secundarios de los extractos metanólicos y particiones de semillas de *L. leucocephala* y *L. esculenta*

Extracto o partición	Rendimiento (%)	Actividad biológica (mm)		Metabolitos secundarios
		<i>L. leucocephala</i>		
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. coli</i> CUSI	
E. metanólico	5.29	7.33 ± 0.6	6.33 ± 0.6	Fenoles, glucósidos y saponinas
P. hexánica	9.35	NA	NA	Alcaloides y saponinas
P. metanólica	67.70	14.00 ± 0.66	NA	Fenoles, glucósidos y saponinas
P. acuosa	23.50	15.00 ± 1.44	14.00 ± 0.66	Fenoles, glucósidos y saponinas
<i>L. esculenta</i>				
E. metanólico	4.32	6.0 ± 0.0	6.67 ± 0.58	Fenoles, glucósidos y saponinas
P. hexánica	4.13	NA	11.00 ± 0.88	Alcaloides
P. metanólica	11.04	NA	10.00 ± 1.44	Fenoles, glucósidos y saponinas
P. acuosa	82.94	9.00 ± 1.44	NA	Glucósidos y saponinas

E: extracto, P: partición, NA: No actividad antimicrobiana. Control positivo: Cloranfenicol en *S. aureus* ATCC 29213: 22.33 ± 0.47; Cloranfenicol en *E. coli* CUSI: 23.00 ± 0.00

RESULTADOS

Se obtuvieron los extractos a partir de 434.34 g y 458.63 g de peso seco de semillas de *L. leucocephala* y *L. esculenta* respectivamente. Se calcularon los

rendimientos del extracto metanólico de cada especie vegetal: *L. leucocephala*: 5.29% (23.02 g); *L. esculenta*: 4.32% (19.82 g), así como de las particiones realizadas para el proceso biodirigido: *L.*

leucocephala: hexano: 9.35% (1.87 g), metanol: 67.70% (13.54 g) y agua: 23.50% (4.70 g); *L. esculenta*: hexano: 4.13% (0.82 g), metanol: 11.04% (2.19 g) y agua: 82.94% (16.44 g). Se determinó la actividad antimicrobiana con una cepa Gram positiva y otra cepa Gram negativa cuya susceptibilidad fue probada por Mora et al. (2021), y por último se identificaron grupos de metabolitos secundarios presentes en las semillas de ambas especies mediante pruebas coloridas (Tabla N° 2).

Se llevaron a cabo cromatografías en columna abierta por adsorción y por exclusión molecular de las particiones polares que probaron tener actividad antimicrobiana de semillas de *L. leucocephala* y *L. esculenta* para identificar la actividad biológica mediante bioautografías directas además del rendimiento de las fracciones en porcentaje, tomando como valor total el peso de los extractos y particiones (Tabla N° 3).

Tabla N° 3
Rendimiento y actividad biológica de las fracciones obtenidas de las cromatografías en columna de los extractos polares de semillas de *L. leucocephala* y *L. esculenta*

<i>L. leucocephala</i>					
Columna	Extracto o partición	Fracciones con actividad biológica	Rendimiento (%)	Actividad biológica (mm)	
				<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. coli</i> CUSI
Sílica gel	E. metanólico	10	1.60	10.00 ± 0.0	9.60 ± 0.47
Diaion	P. metanólica	8	1.62	12.00 ± 0.0	NA
Diaion	P. acuosa	5	5.10	13.66 ± 0.45	11.66 ± 0.45
<i>L. esculenta</i>					
Diaion	P. metanólica	5	13.69	NA	15.66 ± 0.93
Diaion	P. acuosa	3	2.34	17.00 ± 0.0	NA
Diaion	P. acuosa	4	33.19	13.00 ± 0.82	NA

E: extracto, P: partición, NA: No actividad antimicrobiana. Control positivo: Cloranfenicol en *S. aureus* ATCC 29213: 22.33 ± 0.47; Cloranfenicol en *E. coli* CUSI: 23.00 ± 0.00

Se caracterizaron las fracciones con actividad antimicrobiana positiva de los bioautogramas mediante un análisis de HPLC de arreglo de diodos (HPLC-DAD-FD). Fueron comparadas las señales obtenidas con el tiempo de retención de los estándares comerciales correspondientes (Tabla N° 4).

Por otro lado, y como resultado del

fraccionamiento de los extractos de semillas de *L. leucocephala*, fue posible aislar D-pinitol, (Figura N° 1), también llamado 3-O-metil D-Chiro-inositol, cuya fórmula molecular es C₇H₁₄O₆ y nombre asignado por la IUPAC: (1S,2S,4S,5R)-6-metoxiciclohexano-1,2,3,4,5-pentol. El compuesto fue caracterizado, física, biológica, espectroscópica y espectrométricamente.

Tabla N° 4
Tiempo de retención de los metabolitos identificados mediante HPLC con actividad antimicrobiana de los extractos polares de semillas de *L. leucocephala* y *L. esculenta*

<i>L. leucocephala</i>		
Fracción con actividad biológica	Metabolitos identificados	Tiempo de retención (tr) (min)
10	Ácido cafèico	4.98
	Ácido gálico	5.97
	Quercetina	6.57
	Ácido p-cumárico	7.37
	Catequina	9.31
	Apigenina	17.84
8	Ácido cafèico	4.73
	Quercetina	6.93
	Catequina	9.55
	Apigenina	17.03
5	Ácido cafèico	4.72
	Ácido gálico	5.10
	Quercetina	6.74
	Ácido p-cumárico	7.83
	Apigenina	17.45
<i>L. esculenta</i>		
5	Ácido cafèico	4.14
	Ácido gálico	5.72
	Quercetina	6.31
	Ácido p-cumárico	7.10
	Apigenina	17.46
3	Ácido cafèico	4.79
	Ácido gálico	5.53
	Quercetina	6.22
	Apigenina	17.49
4	Ácido cafèico	4.81
	Ácido gálico	5.38
	Apigenina	17.67

Tiempo de retención en minutos de los estándares de HPLC a 280 nm: ácido cafèico: 4.60, ácido gálico: 5.81, quercetina 6.89, ácido p-cumárico: 7.50, catequina: 9.67, apigenina: 17.92

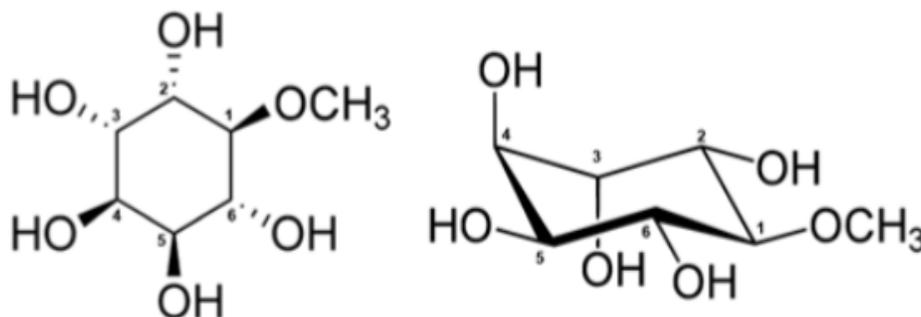


Figura N° 1

Estructura del D-Pinitol. Izquierda. Proyección de Fisher. Derecha. Proyección en silla de montar

En las pruebas físicas se observó que se trata de cristales diminutos de 2 mm aproximadamente color blanco de aroma dulce. El compuesto es totalmente soluble en agua y metanol, parcialmente en acetona y DMSO y no es soluble en hexano (agua > metanol > DMSO > acetona > hexano). El punto de fusión del compuesto determinado mediante el método de Fisher Johns es de 180 a 182°C. No presentó actividad antimicrobiana contra las cepas de interés médico: *S. aureus* y *E. coli*.

Por Espectrometría de Masas se determinó el peso molecular de 194 g/mol contra valor referido 194.18 g/mol en biblioteca (NCBI, 2022). Mediante Espectroscopía Infrarroja las señales características de los grupos funcionales fueron: OH-: 3406.16 cm-

1; CH: 2942.49 cm-1; O-CH3: 2849.85 cm-1. Para el estudio estructural del compuesto se realizaron las pruebas de Resonancia Magnética Nuclear de C13 y H1; para el análisis de RMN C13 se determinaron 7 señales (Figura N° 2) y para RMN H1 10 señales (Figura N° 3) cuyos valores de desplazamiento químico (δ), multiplicidad (picos e hidrógenos vecinos) y constante de acoplamiento (J) fueron interpretados en la Tabla N° 5. Los valores fueron contrastados con tablas de Pretsch *et al.*, (1980) y Rubinson y Rubinson, (2000), así como en los valores obtenidos sobre el aislamiento del D-pinitol por Abdoulaye *et al.*, (2004); Blanco *et al.*, (2008); Osti-Castillo *et al.*, (2010); Vidhate *et al.*, (2015) y Sharma *et al.*, (2016), para validar los datos.

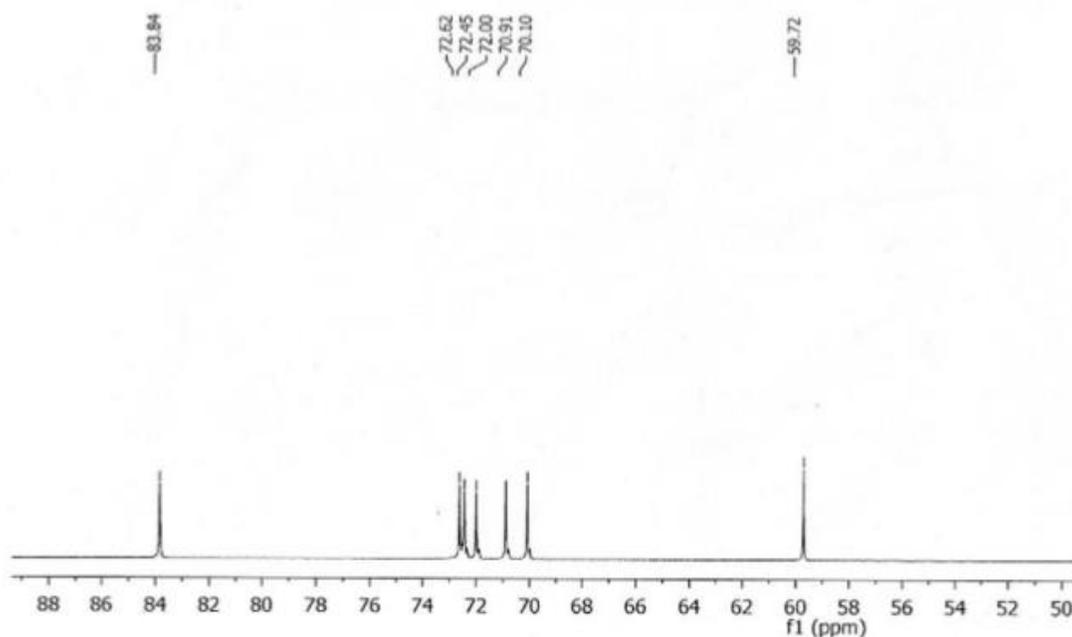


Figura N° 2
Espectro de RMN C13 del D-Pinitol

DISCUSIÓN

Para el inicio de las pruebas fitoquímicas y de actividad biológica, se procedió a utilizar el extracto metanólico para los estudios biodirigidos fitoquímicos ya que de acuerdo con un trabajo llevado a cabo por Mora *et al.* (2021), los extractos metanólicos de semillas de ambas especies vegetales, presentaron mayores rendimientos comparados con los demás solventes de extracción: *L. leucocephala*: metanol: 5.29% > hexano: 1.95% > acetona: 0.67%; *L. esculenta*: metanol: 4.32% > hexano: 4.28% > acetona: 0.64%. El presente trabajo corrobora que los

valores más elevados, corresponden a los extractos, particiones y fracciones metanólicas y acuosas de ambas especies de *Leucaena* (Tabla N° 2 y Tabla N° 3), lo que sugiere que la mayoría de los metabolitos contenidos en estas plantas y sobre todo en las semillas son de naturaleza polar, como fenoles, taninos o saponinas, entre otros; seguido de metabolitos primarios como lípidos asociados a tejidos de reserva y afines a solventes no polares como el hexano (Román-Cortés, 2014). Trabajos realizados por Savita y Preeti, (2015) con tres extractos diferentes de hojas de *L. leucocephala*

reportaron que el extracto metanólico tuvo el rendimiento más elevado de 2.43% en comparación con los extractos obtenidos con acetona y cloroformo (1.05 y 0.96% respectivamente), por su parte Mora-Villa, (2017) reportó rendimientos de los extractos crudos de semillas con valores similares a los

obtenidos: *L. leucocephala*: metanol: 4.34% > hexano: 2.04% > acetona: 0.53%; *L. esculenta*: hexano: 5.09% > metanol: 4.23% > acetona: 0.63%. Lo que además de servir como antecedente, valida la reproducibilidad de los experimentos.

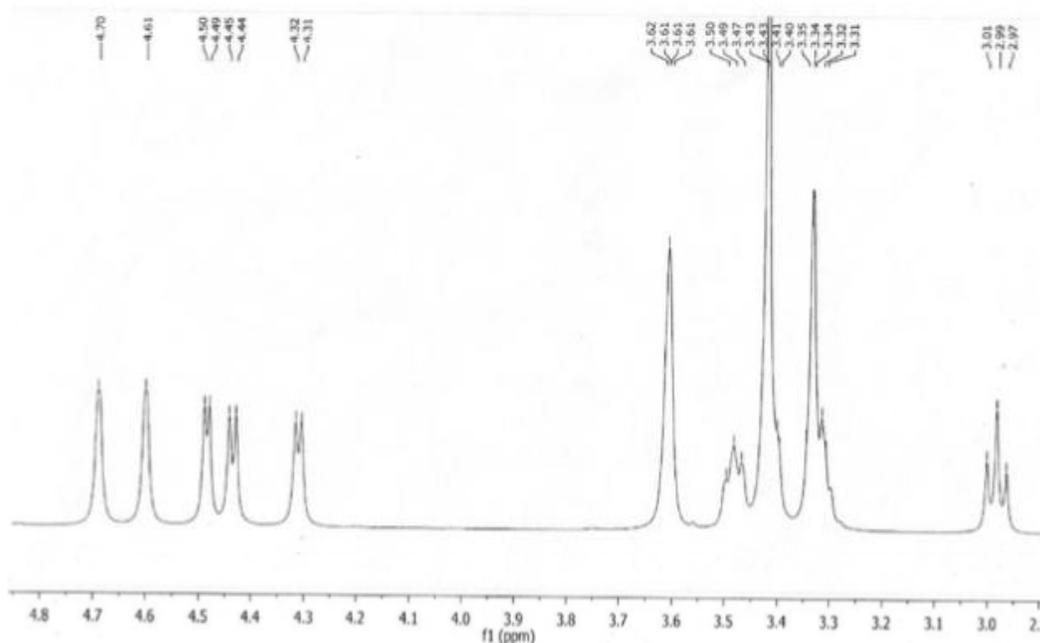


Figura N° 3
Espectro de RMN H¹ del D-pinitol

Tabla N° 5
Interpretación de las señales de RMN C¹³ y de RMN H¹ del D-pinitol

RMN C ¹³		RMN H ¹			
Posición	δ (ppm)	Posición	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
C ₁	83.84	C ₅ - OH	4.70	s	-
C ₂	72.62	C ₃ - OH	4.61	s	-
C ₃	70.91	C ₆ - OH	4.49	d	5
C ₄	72.00	C ₂ - OH	4.44	d	5
C ₅	72.45	C ₄ - OH	4.31	d	5
C ₆	70.10	OCH ₃	3.41	sg	-
OCH ₃	59.72	C ₁ - H	3.00	t	10
		C ₃ - H	3.49	sg	-
		C ₅ - H	3.61	sg	-
		C ₆ - H	3.33	m	-

s: singulete; d: doble; sg: singulete grueso; t: triple; m: múltiple

Posterior a la determinación de los rendimientos, se realizó la identificación de grupos de metabolitos secundarios de naturaleza polar (o mediana polaridad), mediante pruebas coloridas, obteniendo presencia de alcaloides, saponinas y compuestos fenólicos en los extractos de ambas especies de *Leucaena* (Tabla N° 2). Compuestos pertenecientes a estos grupos de metabolitos secundarios han sido reportados por poseer actividad antimicrobiana sobre cepas de interés médico, tales como, alcaloides, saponinas, taninos, antocianinas, glucósidos y cumarinas, encontrados en hojas, flores, tallos, semillas y raíces de ambas especies vegetales (D' Mello, 1982; Aderibigbe et al., 2011; Reda et al., 2015; Savita y Preeti, 2015).

Conociendo los rendimientos y la composición química en grandes grupos de metabolitos, se llevó a cabo la evaluación de la actividad antimicrobiana sobre dos cepas de interés médico (*S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* CUSI) cuya susceptibilidad fue probada por Mora et al. (2021), de los extractos, particiones y fracciones de semillas de ambas especies de *Leucaena* (Tabla N° 2 y Tabla N° 3), con el fin de "rastrear" y dirigir la búsqueda de él o los metabolitos responsables de dicha actividad mediante técnicas cromatográficas. En la investigación se observa que los halos de inhibición promedio para los extractos metanólicos son menores que para las particiones y fracciones polares de cada especie de leguminosa, lo que indica que la concentración de metabolitos activos aumenta y la diversidad de estos disminuye conforme se fraccionan los extractos, ya que al tratarse éstos de una mezcla, la actividad puede verse mermada por otros componentes del mismo (Marcano y Hasegawa, 2002; Ringuelet, 2013). Cabe mencionar, que, pese a las diferencias entre los halos de inhibición de extractos, particiones y fracciones, no hubo diferencia significativa de estos sobre las cepas Gram positivas y negativas probadas. En un estudio realizado con extractos de semillas de *Leucaena leucocephala*, se observaron halos de inhibición dependientes de la concentración para bacterias Gram positivas y negativas, como *S. aureus* con halos de inhibición de hasta 12 mm promedio y para *E. coli* de hasta 18 mm promedio (Aderibigbe et al., 2011). Otros autores reportan actividad antibacteriana sobre cepas de *S. aureus* y *E. coli* con halos de inhibición de 26 mm a 10 mm promedio para extractos polares de hojas de *L. leucocephala* (Nwe et al., 2001; Mathur et al.,

2013).

Es fundamental mencionar que factores como el tipo de organismo que se analiza, la concentración del inóculo, el tipo de medio y naturaleza del extracto vegetal que se está probando afectan la idoneidad de los datos y por tanto promueven la variación de estos (Murray et al., 2017). Por otro lado, es importante considerar las problemáticas y ventajas de los métodos antimicrobianos empleados, ya que contribuyen a dar un panorama más amplio sobre la elección de los mismos en dicha investigación. El método de difusión en agar tiene como principales desventajas: la difusión diferencial de los componentes del extracto debido a la partición en el medio acuoso (agar), afectación de la zona de inhibición debido al tamaño del inóculo, la temperatura de incubación y la presencia de compuestos volátiles que pueden afectar el crecimiento de bacterias y hongos en espacios cerrados. Por otro lado, al no ser un método cuantitativo, la inhibición del crecimiento bacteriano no significa la muerte bacteriana, este método no puede distinguir los efectos bactericidas y bacteriostáticos. Las ventajas son muchas: se obtienen resultados en 1 o 2 días, no se requiere de instalaciones de laboratorio especializadas y puede ser realizado por la mayoría del personal de laboratorio, se pueden examinar grandes cantidades de muestras a bajo costo, los resultados son fácilmente interpretados y analizados estadísticamente. Además, en el caso de la bioautografía, se ofrece un rápido cribado de un gran número de muestras para fraccionamiento guiado por bioactividad (Wilkinson, 2006; Balouiri et al., 2016; Bubonja-Šonje et al., 2020). El método de microdilución en caldo permite calcular cuantitativamente la actividad antimicrobiana; son pocas las desventajas sobre los beneficios de dicha técnica y estas consideran: que es posible que los aceites esenciales no permanezcan en solución durante la duración del ensayo, los emulsionantes y el solvente pueden interferir con la precisión de los resultados. La ventaja central es la representación cuantitativa más precisa de la actividad antibacteriana, la cual es avalada por organismos internacionales como el CLSI y el EUCAST, por otro lado, el método tiene el potencial de analizar un gran número de muestras de manera rentable y con muy poca cantidad de muestra y solventes (Wilkinson, 2006; Balouiri et al., 2016).

Reda *et al.* (2015), indica que gran parte de la actividad antimicrobiana en semillas del género *Leucaena* puede deberse a compuestos fenólicos, específicamente flavonoides o flavonas, los cuales se disuelven con solventes de alta polaridad, como etanol, metanol o agua. Aunado a lo anterior, los resultados obtenidos mediante cromatografías de adsorción y por exclusión molecular sugieren que la actividad antimicrobiana involucra además de metabolitos de naturaleza polar, moléculas de pequeño (o mediano) tamaño, tales como compuestos fenólicos o algunos glucósidos, por mencionar algunos. Cabe resaltar, que el término de "molécula pequeña", especialmente en el ámbito de la farmacología, bioquímica y en el área de productos naturales, usualmente está asociado a una molécula que se une con una gran afinidad a un biopolímero (como una proteína, ácido nucleico o polisacárido) y que altera su actividad o función. Otro de los requisitos de importancia, es que la masa máxima es de aproximadamente 800 dalton, lo que le posibilita la rápida difusión a través de la membrana celular y así llegar a los sitios de acción intracelulares (Koh y Zheng, 2007).

Fueron identificados compuestos fenólicos mediante el análisis cualitativo de HPLC de las 6 fracciones con actividad antimicrobiana (Tabla N° 4). Se utilizaron estándares comerciales que permitieron definir la identidad de los compuestos con ayuda de los tiempos de retención propios de cada uno, los resultados arrojaron que los compuestos como ácido caféico, ácido gálico, quercetina, ácido p-cumárico, catequina y apigenina se encuentran en las fracciones que poseen actividad biológica antimicrobiana. Trabajos realizados por Salem *et al.* (2011), y Aderogba *et al.* (2010), encontraron para los extractos de *L. leucocephala* compuestos como: ácido cinámico, mimosina, epicatequina-3-O-galato, quercetina-3-O-arabinofuranosido, quercetina-3-O-ramnosido, apigenina y ácido tánico. Algunos de estos compuestos son precursores o comparten estructuras características con los compuestos analizados en el presente trabajo. Cabe resaltar que la actividad antimicrobiana de estos compuestos fenólicos no había sido probada para estas especies, sin embargo, investigaciones antimicrobianas sobre el ácido caféico reportan actividad sobre cepas de *E. coli* CM871, *Enterococcus faecalis* y *Salmonella enterica* (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2001) y *E. coli* y *S. aureus* (Martínez-Alemán *et al.*, 2019); para el ácido gálico

se evidencia actividad sobre distintas especies de *Pseudomonas* spp. y otras cepas Gram negativas (Sorrentino *et al.*, 2018); en cuanto a la quercetina y derivados, Puupponen-Pimiä *et al.*, (2001) y Martínez, (2006) demostraron actividad antimicrobiana significativa contra patógenos como *E. coli*, *S. enteritidis*, *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri*; el ácido p-cumárico y los derivados de catequina mostraron actividad sobre *E. coli* CM871, *E. faecalis* y *S. enterica* (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2001), la catequina y derivados, inhiben la actividad de *E. coli* y *S. aureus* (Ma *et al.*, 2019), así como de otras cepas bacterianas y fúngicas (Martínez, 2009). Finalmente, la apigenina, otro compuesto fenólico fue probado como agente antimicrobiano, mostrando inhibición en cinco cepas patógenas: *Pseudomonas aeruginosa*, *S. typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter aerogenes* (Nayaka *et al.*, 2014).

Los fitoquímicos muestran resultados prometedores para superar el desarrollo de resistencia en patógenos bacterianos y combatir infecciones bacterianas. Las propiedades antibacterianas de los fitoquímicos están relacionadas con la interferencia química, con la función o síntesis de los componentes vitales, para eludir el mecanismo de resistencia antibacteriana (Khameneh *et al.*, 2021). Los principales mecanismos de acción antibacteriana actúan inhibiendo la biosíntesis de la pared celular o membrana bacteriana, la biosíntesis de proteínas bacterianas, la replicación y reparación del ADN y las vías metabólicas (Errecalde, 2004). Uno de los grupos de metabolitos que muestran actividad antibacteriana contra un amplio espectro de bacterias son los compuestos fenólicos. Los flavanoles, flavonoles y ácidos fenólicos exhiben las actividades más altas debido a (I) la inhibición de los factores de virulencia bacteriana, incluidas las enzimas y las toxinas, (II) la interacción con la membrana citoplasmática o la reducción de los valores de pH, (III) la supresión de la formación de biopelículas, (IV) ejercer efectos sinérgicos con los antibióticos convencionales, y (V) reducir la actividad del polisacárido extracelular (EP) y actuar como inhibidores de EP (EPI) (Ohene *et al.*, 2014; Fazly *et al.*, 2018; Miklasińska *et al.*, 2018). Los compuestos fenólicos que se producen en concentraciones relativamente altas muestran una actividad EPI prometedora contra bacterias patógenas. Podrían inhibir la biosíntesis de la pared celular y enzimas

críticas como la ureasa, la sortasa A y la dihidrofolato reductasa. La familia Fabaceae tiene la mayor cantidad de compuestos derivados fenólicos entre las familias botánicas. (Khameneh *et al.*, 2021).

De forma particular y referente a los compuestos identificados en la presente investigación, (Cowan, 1999; Soobrattee *et al.*, 2005; Teffo *et al.*, 2010) mencionan que el ácido caféico, cinámico e hidroxycinámico interfieren con la integridad de la membrana ya que los grupos OH reaccionan con los grupos amino de la membrana, alterando así la permeabilidad celular. El ácido gálico y el ácido *p*-cumárico promueven la disrupción y daño de la membrana celular por formación de iones perjudiciales y la quelación de Mg^{2+} (Wu *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018). La quercetina y sus derivados son otros compuestos fenólicos con actividades antibacterianas prometedoras. Estos compuestos pueden aumentar la permeabilidad de la membrana citoplasmática, alterar el ácido nucleico y modificar las proteínas en las células bacterianas. Específicamente pueden inhibir la bomba de expulsión de iones, así como interactuar con enzimas cruciales como la β -lactamasa (Siriwong *et al.*, 2015; Siriwong *et al.*, 2016; Khameneh *et al.*, 2021; Yin *et al.*, 2021). Respecto a lo anterior y como una perspectiva referente a los productos naturales, se ha encontrado que la sinergia entre la quercetina y la amoxicilina demostró ser muy efectiva al inhibir la síntesis de peptidoglicanos en la membrana celular bacteriana, inhibiendo la actividad de la β -lactamasa con mayor intensidad, aumentando la permeabilidad de la membrana celular y aumentando la proteína amida I y II, y disminuyendo los ácidos grasos en las células bacterianas, lo que demuestra que una acción combinada de los metabolitos secundarios con los fármacos comerciales puede ser de gran ayuda en los tratamientos médicos potenciando su efecto (Khameneh *et al.*, 2021). La catequina y sus derivados cuyo monómero es la catequina inhiben principalmente la expresión génica de las bacterias, principalmente actúan en la subunidad B de la ADN girasa, penicilinas y β -lactamasa (Nikaido y Vaara, 1985; Zhao *et al.*, 2002; Hisano *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2003; Bazzaz *et al.*, 2016; Knidel *et al.*, 2019; Sinsinwar y Vadivel, 2020). Finalmente, la apigenina, es una molécula que actúa interactuando con enzimas cruciales de formación de membrana celular bacteriana (Wu *et al.*, 2008)

Por otra parte, durante el fraccionamiento del

extracto metanólico de semillas de *L. leucocephala* fue posible aislar un compuesto proveniente de la fracción número 10 de la columna de sílica gel. Dicho compuesto fue caracterizado con ayuda de análisis espectroscópicos y espectrométricos y descrito física y químicamente, además de evaluar su actividad antimicrobiana con las cepas de interés médico mencionadas. Como resultado de lo anterior, se determinó la estructura del compuesto aislado el cual corresponde al D-pinitol (Figura N° 1). Este glicósido deriva del 1D-chiro-inositol y es una sustancia casi omnipresente en las familias Fabaceae y Pinaceae. En las plantas, desempeña un rol importante como modulador celular fisiológico frente a condiciones ambientales desfavorables, como déficit hídrico y alto nivel de salinidad (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2021), así como funge como defensa química inhibiendo el crecimiento de algunas plagas nocivas en estado larvario principalmente, Chaubal *et al.* (2005), demostraron que el compuesto puro evita la oviposición de especies como *Battus philenor* e inhibe el crecimiento larval de *Helicoverpa armigera*, ambas especies de insecto afectan el crecimiento de sus anfitrionas vegetales. Por otro lado, los vegetales ricos en D-pinitol se están utilizando principalmente contra la demencia y la enfermedad de Alzheimer, así como tratamientos para nefropatías diabéticas y mejora nutricional en las dietas de pacientes con Diabetes Mellitus (Singh *et al.*, 2001; Aguilar, 2016; NCBI, 2022). Adicional a lo anterior, se reportan una serie de efectos de este compuesto para coadyuvar padecimientos crónicos asociados al metabolismo como es: la obesidad, malnutrición, hiperlipidemia, dislipidemia e hipertensión; enfermedades cardíacas, autoinmunes como el lupus o el SIDA son igualmente estudiadas con la aplicación del D-pinitol en las dietas de pacientes con dichos malestares; también se considera su actividad antioxidante, quimiopreventiva y quimioprotectora, antitumoral, inmunomoduladora, antihelmíntica, antiinflamatoria y analgésica (inhibiendo el dolor en un 67.58% respecto al fármaco de referencia naproxeno con un 58.87% en un estudio *in vivo*) (Chaubal *et al.*, 2005; Pérez y Alonso, 2018; Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2021). Reportes de Gorham *et al.* (1988) y Ching *et al.* (1996), demuestran presencia de este inositol en raíces, hojas y semillas de *L. leucocephala*. Por su parte, respecto a la actividad antimicrobiana, Sansores *et al.* (2000), demostraron mediante el

ensayo de difusión en agar que el D-pinitol no posee actividad antimicrobiana sobre cepas de *S. aureus* y *E. coli* entre otras. Por lo que el reporte coincide con lo encontrado en la presente investigación ya que dicha sustancia no presentó actividad biológica antimicrobiana sobre las mismas cepas de interés médico, además, fue identificada mediante HPLC pues dicho azúcar no cumple con las características de visualización y absorción en el espectro de UV que los compuestos fenólicos si tienen.

CONCLUSIONES

Los resultados del estudio muestran que los rendimientos más elevados y la actividad biológica antimicrobiana sobre cepas de *S. aureus* y *E. coli* fueron para los extractos, particiones y fracciones metanólicos y acuosos de ambos guajes, demostrando que los productos naturales involucrados en la actividad biológica corresponden a compuestos fenólicos como ácido caféico, ácido gálico, quercetina, ácido p-coumárico, catequina y apigenina. Por último y no menos importante, fue aislado D-pinitol del extracto metanólico de semillas de *L.*

leucocephala durante el fraccionamiento del material. Dicha sustancia fue caracterizada por ser un reporte novedoso en semillas de estas especies de guaje; no tuvo actividad antimicrobiana, pero es reportado con muchas otras actividades biológicas de importancia médica. La presente investigación contribuye a validar el uso en la medicina popular de *L. leucocephala* y *L. esculenta* para tratar algunas enfermedades infecciosas, así como identificar los compuestos involucrados en dicha actividad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Conacyt, a la UNAM y al Posgrado en Ciencias Biológicas por permitir y promover el trabajo científico otorgando una beca de posgrado con número de CVU de 777911. El proyecto fue financiado por PAPIT- DGAPA No. IG200821. Agradecemos la cooperación de la Dra. Rocío Serrano, el Dr. Erick Nolasco y la Dra. Julieta Orozco por sus comentarios en la realización del trabajo. Por último y no menos importante agradecemos al editor en jefe y a los revisores de la presente revista.

REFERENCIAS

- Abdoulaye A, Moussa I, Djibo A, Keita, Khalid I. 2004. Le D-pinitol isolé de *Limeum pterocarpum*. **Comptes Rendu Chimie** 7: 989 - 991. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2003.12.023>
- Abreu G, Orlando A, Cuéllar CA. 2008. Estrategias en la selección de las plantas medicinales a investigar. **Rev Cub Plant Med** 13(3).
- Abu ZM, Wan HY, Isha A, Armania N. 2016. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic potential of condensed tannins from *Leucaena leucocephala* hybrid-Rendang. **Food Sci Human Wellness** 5: 65 - 75. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2016.02.001>
- Aderibigbe SA, Adentunji OA, Odeniyi MA. 2011. Antimicrobial and pharmaceutical properties of the seed oil of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. (Leguminosae). **Afr J Biomed Res** 14: 63 - 68.
- Aderogba MA, Mc Gaw LJ, Bezabih BT, Abegaz BM. 2010. Antioxidant activity and cytotoxicity study of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit leaf extract constituents. **Nigerian J Nat Prod Med** 13: 65 - 68. <https://doi.org/10.4314/njnp.v13i1.61612>
- Aguilar AA. 2016. Actividad tipo-ansiolítico del extracto metanólico de hoja de *Rivina humilis* (Phytolaccaceae). Tesis, Universidad de Xalapa, Veracruz, Mexico.
- Akerele O. 1993. Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. **Medicina tradicional. Foro Mundial de la Salud** 14: 390 - 395.
- Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, Temml V, Wang L, Schwaiger S, Heiss EH, Rollinger JM, Schuster D, Breuss JM, Bochkov V, Mihovilovic MD, Kopp B, Bauer R, Dirsch VM, Stuppner H. 2015. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnol Adv** 33: 1582 - 1614. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001>
- Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **J Pharmaceut Anal** 6: 71 - 79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Barahona R, Lascano CE, Narvaez N, Owen E, Morris P, Theodorou MK. 2003. *In vitro* degradability of mature and immature leaves of tropical forage legumes differing in condensed tannin and non-starch

- polysaccharide content and composition. **J Sci Food Agric** 83: 1256 - 1266.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.1534> <https://doi-org/doi:10.1002/jsfa.1534>
- Bazzaz BSF, Sarabandi S, Khameneh B, Hosseinzadeh H. 2016. Effect of catechins, green tea extract and methylxanthines in combination with gentamicin against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Combination therapy against resistant bacteria. **J Pharmacopuncture** 19: 312 - 318.
<https://doi.org/10.3831/KPL.2016.19.032>
- Bhalla R, Narasimhan K, Swarup S. 2005. Metabolomics and its role in understanding cellular responses in plants. **Plant Cell Rep** 24: 562 - 557. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0054-9>
- Blanco N, Flores Y, Almanza GR. 2008. Secondary metabolites from *Senna versicolor*. **Rev Bol Quim** 25: 36 - 42.
- Bubonja-Sonje M, Knežević S, Abram M. 2020. Challenges to antimicrobial susceptibility testing of plant-derived polyphenolic compounds. **Arh Hig Rada Toksikol** 71: 300 - 311.
<https://doi.org/10.2478/aiht-2020-71-3396>
- Bulugahapitiya VP. 2018. **Plants based natural products. Extraction, isolation and phytochemical screening.** Indika Graphics, Matara, Sri Lanka.
- Chaubal R, Pawar PV, Hebbalkar GD, Tungikar VB, Puranik VG, Deshpande VH, Deshpande NR. 2005. Larvicidal activity of *Acacia nilotica* extracts and isolation of D-pinitol: a bioactive carbohydrate. **Chem Biodiv** 2: 684 - 688. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200590044>
- Chen CY, Wang YD. 2011. Secondary metabolites from *Leucaena leucocephala*. **Chem Nat Comp** 47: 145 - 146.
- Ching C, Tsan L, Chiun J, Guor H. 1996. Occurrence of a novel galactopinitol and its changes with other non-reducing sugars during development of *Leucaena leucocephala* seeds. **Plant Cell Physiol** 37: 539 - 544.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a028977>
- Choma IM, Grzelak EM. 2011. Bioautography detection in thin-layer chromatography. **J Chromatography A** 1218: 2684 - 2691. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.069>
- Chung-Yi C, Yau-Der W. 2010a. Polyprenol from the whole plants of *Leucaena leucocephala*. **J Environment Protect** 1: 70 - 72. <https://doi.org/10.4236/jep.2010.11009>
- Chung-Yi C, Yau-Der W. 2010b. Steroids from the whole plants of *Leucaena leucocephala*. **J Environment Protect** 1: 31 - 33. <https://doi.org/10.4236/ajac.2010.11004>
- CLSI [Clinical & Laboratory Standards Institute]. 2012. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, approved standard. CLSI document M02-A11. https://clsi.org/media/1631/m02a12_sample.pdf
- Corzo A. 2019. **Técnicas de análisis en química orgánica: Cromatografía.** Serie Didáctica 44. Santiago del Estero, Argentina.
- Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. **Clin Microbiol Rev** 12: 564 - 582.
<https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>
- Dago Y, Milian J, Calzadilla K, Redonet M, López Y, Hernández L. 2020. Uso potencial de *Leucaena leucocephala* Lam. (*Leucaena*) presente en sistemas agroforestales de Pinar del Río. **Rev Cub Cienc Forest** 8: 154 - 162.
- Dalzell S, Shelton H. 2002. Genotypic variation in proanthocyanidin status in the *Leucaena* genus. **J Agric Sci** 138: 209 - 220. <https://doi.org/10.1017/S0021859601001848>
- Dewanjee S, Gangopadhyay M, Bhattacharya N, Khanra R, Tarun KD. 2015. Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. **J Pharmaceut Anal** 5: 75 - 84.
<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2014.06.002>
- D'Mello JP. 1982. Toxic factors in tropical legumes. **World Rev Anim Prod** 18: 41 - 46.
- Domínguez X. 1978. **Experimentos de química.** Limusa. México.
- Domínguez X. 1985. **Métodos de investigación fitoquímica.** Limusa SA, México.
- Errecalde JO. 2004. Mecanismo de acción de antibióticos. Uso de Antimicrobianos en animales de consumo humano. FAO. <https://doi.org/92-5-305150-7>
- Espinoza F, Díaz Y, Requena F, Araque CA, Perdomo E, León L. 2003. Selectivity, nutritive value and resistance to the psyllid insect of *Leucaena leucocephala* accessions. **Arch Latinoam Prod Anim** 11.
- Fabry W, Okemo PO, Ansorg R. 1998. Antibacterial activity of East African medicinal plants. **J Ethnopharmacol** 60: 79 - 84. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(97\)00128-1](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(97)00128-1)

- Fazly BS, Khameneh B, Ostad MRZ, Hosseinzadeh H. 2018. *In vitro* evaluation of antibacterial activity of verbascoside, lemon verbena extract and caffeine in combination with gentamicin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* clinical isolates. **Avicenna J Phytomed** 8: 246 - 253.
- Flatley PB. 2019. **Infectious diseases**. US. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health. MedlinePlus, USA.
- Gibbons S. 2004. Anti-staphylococcal plant natural products. **Nat Prod Rep ChemInform** 21: 263 - 277.
<https://doi.org/10.1002/chin.200426286>
- Gorham J, Tomar OS, Wyn RG. 1988. Salinity-induced changes in the chemical composition of *Leucaena leucocephala* and *Sesbania bispinosa*. **J Plant Physiol** 132: 678 - 682.
[https://doi.org/10.1016/s0176-1617\(88\)80228-1](https://doi.org/10.1016/s0176-1617(88)80228-1)
- Hammer Ø, Harper D, Ryan P. 2020. (Versión 4.03). PAST: Paquete de Programas de estadística paleontológica para enseñanza y análisis de datos [Software]. España.
http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/spain.htm
- Hisano M, Yamaguchi K, Inoue Y, Ikeda Y, Iijima M, Adachi M, Shimamura T. 2003. Inhibitory effect of catechin against the superantigen staphylococcal enterotoxin B (SEB). **Arch Dermatol Res** 295: 183 - 189.
<https://doi.org/10.1007/s00403-003-0411-x>
- Khameneh B, Eskin NAM, Iranshahy M, Fazly Bazzaz BS. 2021. Phytochemicals: a promising weapon in the arsenal against antibiotic-resistant bacteria. **Antibiotics** 10: 1044.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics10091044>
- Knidel C, Pereira MF, Barcelos DHF, Gomes DC, Guimarães MC, Schuenck RP. 2019. Epigallocatechin gallate has antibacterial and antibiofilm activity in methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* of different lineages in non-cytotoxic concentrations. **Nat Prod Res** 2019: 1 - 5.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1698575>
- Koh JT, Zheng J. 2007. La nueva química biomimética: factores de transcripción artificial. **Chem Biol** 2: 599 - 601.
<https://doi.org/10.1021/cb700183s>
- Lautié E, Russo O, Ducrot P, Boutin JA. 2020. Unraveling plant natural chemical diversity for drug discovery purposes. **Frontiers Pharmacol** 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00397>
- Li K, Guan G, Zhu J, Wu H, Sun Q. 2018. Antibacterial activity and mechanism of a laccase-catalyzed chitosan-gallic acid derivative against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control** 96: 234 - 243.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.021>
- Lim TK. 2012. *Leucaena leucocephala*. In Edible medicinal and non-medicinal plants. Springer, Dordrecht, Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1764-0_86
- Llorente J, Ocegueda S. 2008. Estado del conocimiento de la biota, en Capital natural de México. Conocimiento actual de la biodiversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento de la Biodiversidad, México DF, México.
- Ma Y, Ding S, Fei Y, Liu G, Jang H, Fang J. 2019. Antimicrobial activity of anthocyanins and catechins against foodborne pathogens *Escherichia coli* and *Salmonella*. **Food Control** 106: 106712.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106712>
- Marcano D, Hasegawa M. 2002. **Fitoquímica orgánica**. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Martínez MD. 2009. **Actividad antimicrobiana y antifúngica de las catequinas del té: inhibición del ciclo del ácido fólico y su conexión con otras rutas metabólicas**. Tesis, Universidad de Murcia. España.
- Martínez NS. 2006. **Identificación de compuestos fenólicos con posible actividad biológica obtenidos de ciruela (*Prunus cerasifera* Ehrh)**. Tesis, Instituto de Ciencias Básicas, Xalapa, Veracruz, Mexico.
- Martínez-Alemán SR, Hernández-Castillo FD, Aguilar-González CN, Rodríguez-Herrera R. 2019. Extractos de pulpa de café: Una revisión sobre antioxidantes polifenólicos y su actividad antimicrobiana. **Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes** 27: 73 - 79.
- Mathur P, Singh A, Ranjan S, Dharmendra S, Mishra Y. 2013. Antimicrobial activity of indigenous wildy growing plants: potential source of green antibiotics. **Afric J Biomed Res** 7: 3807 - 3815.
<https://doi.org/10.5897/AJMR2012.2368>
- Miethke M, Pieroni M, Weber T, Brönstrup M, Hammann P, Halby L, Arimondo PB, Glaser P, Aigle B, Bode HB,

- Moreira R, Li Y, Luzhetskyy A, Medema MH, Pernodet JL, Stadler M, Tormo JR, Genilloud O, Truman AW, Weissman KJ, Takano E, Sabatini S, Stegmann E, Brötz-Oesterheld H, Wohlleben W, Seemann M, Empting M, Hirsch AKH, Loretz B, Lehr CM, Titz A, Herrmann J, Jaeger T, Alt S, Hesterkamp T, Winterhalter M, Schiefer A, Pfarr K, Hoerauf A, Graz H, Graz M, Lindvall M, Ramurthy S, Karlén A, van Dongen M, Petkovic H, Keller A, Peyrane F, Donadio S, Fraisse L, Piddock LJV, Gilbert IH, Moser HE, Müller R. 2021. Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. *Nat Rev Chem* 5: 726 - 749. <https://doi.org/10.1038/s41570-021-00313-1>
- Miklasínska MM, Kepa M, Wojtyczka RD, Idzik D, Waşik TJ. 2018. Phenolic compounds diminish antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* clinical strains. *Int J Environ Res Public Health* 15: 2321. <https://doi.org/10.3390/ijerph15102321>
- Mora MA, Serrano R, Lira R, Jiménez M, Hernández T. 2021. Evaluación de la actividad antimicrobiana de semillas de *Leucaena esculenta* y *Leucaena leucocephala* recolectadas en Tlayacapan, Morelos, México. *Polibotánica* 52: 175 - 191. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.52.12>
- Mora-Villa MA. 2017. **Evaluación de la actividad antimicrobiana de vainas y semillas de dos especies del género *Leucaena*: *Leucaena esculenta* y *Leucaena leucocephala* de la localidad de Tlayacapan, Morelos.** Tesis, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México.
- Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. 2017. **Microbiología médica.** Elsevier Health Sciences, The Netherland.
- Nayaka HB, Londonkar RL, Umesh MK, Tukappa A. 2014. Antibacterial attributes of apigenin, isolated from *Portulaca oleracea* L. *Int J Bacteriol* 2014: 1 - 8. <https://doi.org/10.1155/2014/175851>
- NCBI [National Center for Biotechnology Information]. 2022. PubChem compound summary for CID 164619, D-pinitol. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-Pinitol>
- Nikaido H, Vaara M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 49: 1 - 32. <https://doi.org/10.1128/mr.49.1.1-32.1985>
- Nwe YW, Mar MN, Nyunt W, Win M, Saw HM, Myint K. 2001. Antibacterial activity of selected Myanmar medicinal plants. *J Myanmar Acad Technol* 1: 75 - 88.
- Ohene AT, Mowla R, Rahman T, Venter H. 2014. Phytochemicals increase the antibacterial activity of antibiotics by acting on a drug efflux pump. *Microbiologyopen* 3: 885 - 896. <https://doi.org/10.1002/mbo3.212>
- Oliveira AC, Fonseca E, Saraiva AM, Neves F, Acre RH, Caetano MN, Cavalcanti EL, Albuquerque UP. 2013. Which approach is more effective in the selection of plants with antimicrobial activity. *Evid-Based Compl Alt Med* 2013: 9 <https://doi.org/10.1155/2013/308980>
- OMS [Organización Mundial de la Salud]. 2013. **Estrategia sobre la medicina tradicional (2014-2023).** Hong Kong SAR, China.
- OMS [Organización Mundial de la Salud]. 2017. **Resistencia a los antimicrobianos. Nota descriptiva.** México DF, Mexico.
- Osborne NJ, McNeill DM. 2001. Caracterización de taninos condensados de *Leucaena* por tamaño y capacidad de precipitación proteica. *Rev Cienc Aliment Agric* 81: 1113 - 1119. <https://doi.org/10.1002/jsfa.920>
- Osti-Castillo MR, Torres-Valencia JJ, Villagómez-Ibarra JR, Castelán-Pelcastre I. 2010. Estudio químico de cinco plantas mexicanas de uso común en la medicina tradicional. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 9: 359 - 367.
- Pasto DJ, Johnson CR. 1981. **Determinación de estructuras orgánicas.** Reverté. Sevilla, España.
- Peralta I, Gómez A, Romero PA, Reyes A. 2017. Uso antropocéntrico del guaje *Leucaena esculenta* (Moc. & Sessé Ex. DC.) Benth, en dos comunidades de la mixteca baja oaxaqueña, México. *Polibotánica* 43: 1 - 16.
- Pérez SE, Alonso AJ. 2018. Determinación del efecto analgésico de D-pinitol, un compuesto obtenido de *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg. (Fabaceae). *Jovenes en la Ciencia* 4: 1197 - 1201.
- Pretsch E, Clerc T, Seibl J, Simon W. 1980. **Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos.** Alhambra, Madrid, España.
- Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Meier C, Kähkönen M, Heinonen M, Hopia A, Oksman-Caldentey KM. 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J Appl Microbiol* 90: 494 - 507. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01271.x>
- Reda SM, El-Souda SS, Hanan AA, Moharam ME, Shaker KH. 2015. Antioxidant, antimicrobial activities of

- flavonoids glycoside from *Leucaena leucocephala* leaves. **J Appl Pharmaceut Sci** 5: 138 - 147. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50623>
- Revathi D, Deivasigamani R. 2018. Phytochemical analysis of *Leucaena leucocephala* on various extracts. **J Phytopharmacol** 7: 480 - 482.
- Ringuelet JA, Viña SZ. 2013. **Productos naturales vegetales**. Universidad Nacional de La Plata, Argentina. <https://doi.org/10.35537/10915/27885>
- Ríos JL, Recio MC. 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. **J Ethnopharmacol** 100: 80 - 84. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.025>
- Rojas G, Lévaro J, Tortoriello J, Navarro V. 2001. Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. **J Ethnopharmacol** 74: 97 - 101. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(00\)00349-4](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(00)00349-4)
- Román D. 2015. **Uso potencial de recursos vegetales en el municipio de Tlayacapan, Morelos**. Tesis, Instituto Politécnico Nacional, Mexico.
- Román-Cortés N. 2014. Componentes nutricionales y antioxidantes de dos especies de guaje (*Leucaena* spp.): un recurso ancestral subutilizado. **Rev Chapingo Horticulture** 20: 157 - 170. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2013.07.023>
- Royaka MB, Uprety Y, Poudel RC, Timsina B, Munzbergova Z, Asselin H, Tiwari A, Shrestha SS, Sigdel SR. 2014. Traditional uses of medicinal plants in gastrointestinal disorders in Nepal. **J Ethnopharmacol** 158: 221 - 229. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.10.014>
- Rubinson KA, Rubinson JF. 2000. **Análisis Instrumental**. Pearson Educación. España.
- Salem AZM, Salem MZM, Gonzalez M, Camacho LM, Cipriano M. 2011. Major chemical constituents of *Leucaena leucocephala* and *Salix babylonica* leaf extracts. **J Trop Agric** 49: 95 - 98.
- Sánchez-Hidalgo M, León-González AJ, Gálvez-Peralta M, González-Mauraza NH, Martín-Cordero C. 2021. D-Pinitol: a cyclitol with versatile biological and pharmacological activities. **Phytochem Rev** 20: 211 - 224. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09677-6>
- Sansores P, Rosado M, Brito W, Mena GJ, Quijano L. 2000. Cassine, an antimicrobial alkaloid from *Senna racemosa*. **Fitoterapia** 71: 690 - 692. [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(00\)00152-0](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(00)00152-0)
- Savita S, Preeti S. 2015. Evaluation of antibacterial and antimutagenic potential of *Acokanthera oppositifolia* and *Leucaena leucocephala*. **Am J Pharm Health Res** 3.
- Sepúlveda J, Torres J, Sandoval C, Martínez J, Chan J. 2018. La importancia de los metabolitos secundarios en el control de nematodos gastrointestinales en ovinos con énfasis en Yucatán, México. **J Selva Andina Anim Sci** 5: 79 - 95.
- Sharma N, Verma MK, Gupta DK, Satti NK, Khajuria RK. 2016. Isolation and quantification of pinitol in *Argyrolobium roseum* plant, by 1H-NMR. **J Saudi Chem Soc** 20: 81 - 87. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2014.07.002>
- Sherma J, Fried B. 2003. **Handbook of thin-layer chromatography**. CRC Press, Miami, USA.
- Sierra MA, Barros R, Gómez Paternina D, Mejía A, Suarez D. 2018. **Productos naturales: Metabolitos secundarios y aceites esenciales**. UNIAGRARIA, Fundación Universitaria Agraria de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Singh RK, Pandey BL, Tripathi M, Pandey VB. 2001. Anti-inflammatory effect of (+) D-pinitol. **Fitoterapia** 72: 168 - 170. [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(00\)00267-7](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(00)00267-7)
- Sinsinwar S, Vadivel V. 2020. Catechin isolated from cashew nut shell exhibits antibacterial activity against clinical isolates of MRSA through ROS-mediated oxidative stress. **Appl Microbiol Biotechnol** 104: 1 - 19. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10853-z>
- Siriwong S, Thumanu K, Hengpratom T, Eumkeb G. 2015. Synergy and mode of action of ceftazidime plus quercetin or luteolin on *Streptococcus pyogenes*. **Evid-Based Complement Altern Med** 2015: 759459. <https://doi.org/10.1155/2015/759459>
- Siriwong S, Teethaisong Y, Thumanu K, Dunkhunthod B, Eumkeb G. 2016. The synergy and mode of action of quercetin plus amoxicillin against amoxicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. **BMC Pharmacol Toxicol** 17: 1 - 14. <https://doi.org/10.1186/s40360-016-0083-8>

- Soobrattee M, Neergheen V, Luximon RA, Aruoma O, Bahorun T. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutat Res Mol Mech Mutagen** 579: 200 - 213. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.023>
- Sorrentino E, Succi M, Tipaldi L, Pannella G, Maiuro L, Sturchio M, Tremonte P. 2018. Antimicrobial activity of gallic acid against food-related *Pseudomonas* strains and its use as biocontrol tool to improve the shelf life of fresh black truffles. **Int J Food Microbiol** 266: 183 - 189. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.026>
- Stewart JL, Dunsdon AJ. 1998. Preliminary evaluation of potential fodder quality in a range of *Leucaena* species. **Agroforest Syst** 40: 177 - 198. <https://doi.org/10.1023/A:1006028931809>
- Teffo LS, Aderogba MA, Eloff JN. 2010. Antibacterial and antioxidant activities of four kaempferol methyl ethers isolated from *Dodonaea viscosa* Jacq. var. *angustifolia* leaf extracts. **South Afric J Bot** 76: 25 - 29. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.06.010>
- Umaru IJ, Samling B, Umaru HA. 2018. Phytochemical screening of *Leucaena leucocephala* leaf essential oil and its antibacterial potentials. **MOJ Drug Des Develop Ther** 2: 224 - 228. <https://doi.org/10.15406/mojddt.2018.02.00066>
- Vidhate M, Ranade A, Vidhate B, Birajdar P. 2015. Isolation, characterization and quantification of extracted D-Pinitol from *Bougainvillea spectabilis* stem bark. **World J Pharm Res** 4: 1669 - 1683.
- Villaseñor JL. 2004. Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. **Bol Soc Bot Mex** 75: 105 - 135.
- Waizel J. 2006. **Las plantas en la historia de la medicina. Las plantas medicinales y las ciencias. Una visión multidisciplinaria**. Bucay J. (Coord.) Instituto Politécnico Nacional, Mexico.
- Wilkinson JM. 2006. Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. **Modern Phytomed** 157 - 171. <https://doi.org/10.1002/9783527609987.ch8>
- Wu C, Kim HK, van Wezel GP, Choi YH. 2015. Metabolomics in the natural products field - a gateway to novel antibiotics. **Drug Discov Today Technol** 13: 11 - 17. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2015.01.004>
- Wu D, Kong Y, Han C, Chen J, Hu L, Jiang H, Shen X. 2008. D-Alanine: D-alanine ligase as a new target for the flavonoids quercetin and apigenin. **Int J Antimicrob Agents** 32: 421 - 426. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.06.010>
- Wu Y, Bai J, Zhong K, Huang Y, Qi H, Jiang Y, Gao H. 2016. Antibacterial activity and membrane-disruptive mechanism of 3-p-trans-Coumaroyl-2-hydroxyquinic acid, a novel phenolic compound from pine needles of *Cedrus deodara*, against *Staphylococcus aureus*. **Molecules** 21: 1084. <https://doi.org/10.3390/molecules21081084>
- Yin J, Peng X, Lin J, Zhang Y, Zhang J, Gao H, Tian X, Zhang R, Zhao G. 2021. Quercetin ameliorates *Aspergillus fumigatus* keratitis by inhibiting fungal growth, toll-like receptors and inflammatory cytokines. **Int Immunopharmacol** 93: 107 - 435. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107435>
- Zárate S. 1997. Domesticación de *Leucaena* cultivada (leguminosae) en México: Los documentos del siglo XVI. **Econ Bot** 51: 238 - 250. <https://doi.org/10.1007/bf02862093>
- Zárate S. 1987. Guaje blanco. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. **Pytologia** 63: 304 - 306.
- Zárate S. 1994. Revisión del género *Leucaena* en México. **Anal Instit Biol Bot** 65: 83 - 162.
- Zárate S. 1999. Ethnobotany and domestication process of *Leucaena* in Mexico. **J Ethnobiol** 19: 1 - 23.
- Zhao WH, Hu ZQ, Hara Y, Shimamura T. 2002. Inhibition of penicillinase by epigallocatechin gallate resulting in restoration of antibacterial activity of penicillin against penicillinase-producing *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother** 46: 2266 - 2268. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.7.2266-2268.2002>
- Zhao WH, Asano N, Hu ZQ, Shimamura T. 2003. Restoration of antibacterial activity of beta-lactams by epigallocatechin gallate against beta-lactamase-producing species depending on location of beta-lactamase. **J Pharm Pharmacol** 55: 735 - 740. <https://doi.org/10.1211/002235703765951320>
- Zolla C. 1980. Traditional medicine in latin America, with particular reference to Mexico. **J Ethnopharmacol** 2: 37 - 41. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(80\)90028-8](https://doi.org/10.1016/0378-8741(80)90028-8)

8. DISCUSIÓN GENERAL

Al ser un trabajo fitoquímico biodirigido y de actividad antimicrobiana, se discutirá de lo general (de los extractos) a lo particular (los metabolitos) y su actividad biológica antimicrobiana en cada etapa del experimento.

8.1 Rendimientos generales

El mayor rendimiento, corresponde a los extractos, particiones y fracciones metanólicas y acuosas de ambas especies de guaje, lo que sugiere que la mayoría de los metabolitos contenidos en estas plantas son de naturaleza polar, como fenoles, taninos o saponinas, entre otros. Trabajos realizados por Savita & Preeti (2015) con tres extractos diferentes de hojas de *L. leucocephala* reportaron que el extracto metanólico tuvo un rendimiento de 2.43% en comparación con los extractos obtenidos con acetona y cloroformo (1.05 y 0.96% respectivamente). Un estudio de Román *et al.*, (2014) reporta un mayor contenido de lípidos en las semillas del guaje rojo (3.65%) con respecto al guaje blanco (2.11%), lo que podría explicar un alto rendimiento con el extracto hexánico, ya que los compuestos lipídicos son solubles en disolventes apolares.

Mora-Villa (2017) reportó en una investigación rendimientos de los extractos crudos con valores similares: guaje blanco: hexano (1.67g) 2.04%, acetona 0.44 g (0.53%) y metanol 3.55 g (4.34%); guaje rojo: hexano 5.23 g (5.09%), acetona 0.65 g (0.63%) y metanol 4.35 g (4.23%). Lo que además de servir como antecedente, valida la reproducibilidad de los experimentos.

8.2. Actividad antimicrobiana

El efecto de los extractos, particiones y fracciones metanólicas del guaje blanco y rojo sobre las cepas bacterianas, muestra diámetros de inhibición mayores respecto a las demás muestras. Reda *et al.*, (2015) indica que gran parte de la actividad antimicrobiana se debe a flavonoides, compuestos fenólicos y saponinas los cuales están relacionados con solventes de alta polaridad, como etanol, metanol o agua. Asimismo, se observó que el efecto inhibitorio fue mayor en los extractos de guaje

blanco (*L. leucocephala*) en comparación con los extractos de semillas de guaje rojo (*L. esculenta*) para estudios bacterianos. Por su parte, los extractos de hexano pueden contener metabolitos de naturaleza no polar como triterpenos o esteroides, los cuales han sido reportados por Aderibigbe *et al.*, (2011) por poseer actividad antimicrobiana. Este mismo autor indica en un estudio realizado con las semillas del guaje blanco, halos de inhibición dependientes de la concentración para bacterias Gram positivas y negativas, como *S. aureus* con halos de inhibición de hasta 12 mm promedio y para *E. coli* de hasta 18 mm promedio. Nwe *et al.*, (2001) reporta actividad antibacteriana en cepas de *S. aureus* con halos de inhibición de 26 mm promedio para extractos alcohólicos de hojas de *L. glauca*, sin embargo otros autores como Reda *et al.*, (2015) y Mathur *et al.*, (2013) reportan que los extractos polares de hojas de *L. leucocephala* fueron activos para cepas de *S. aureus* y *E. coli* con diámetros de inhibición de 10 mm a 15 mm, rangos muy similares obtenidos por la presente investigación para esas cepas en el caso de extractos, particiones y fracciones polares de semillas de ambos guajes.

Por su parte, de las columnas de exclusión molecular realizadas se puede apreciar que las fracciones que presentaron actividad sobre las cepas bacterianas involucra además de metabolitos polares, moléculas de pequeño o mediano tamaño (800 dalton) lo que le posibilita la rápida difusión a través de la membrana celular y así llegar a los sitios de acción intracelulares (Koh & Zheng, 2007).

La actividad biológica sobre las cepas microbianas de los diferentes extractos de las dos especies de guaje fue más sobresaliente sobre cepas de *Staphylococcus*, siendo *S. aureus* CUSI la más susceptible para cada grupo de extractos y en el caso de *E. coli*, la cepa más inhibida fue *E. coli* CUSI. Un estudio realizado por Abu *et al.*, (2016) donde se analizaron las propiedades antimicrobianas cuantitativas del extracto acuoso de hojas de *L. leucocephala* para dos cepas del género *Staphylococcus*, reportó valores de CMI superiores a los reportados para este trabajo: CMI para *S. aureus*: 1250 µg/mL, mientras que para *S. epidermidis*: 6250 µg/mL. En el presente trabajo, las diferentes cepas de *S. aureus* reportaron valores de CMI de 2000 a 4000 µg/mL. Un informe de Savita & Preeti (2015) obtuvo los

siguientes datos de CMI para *E. coli* para 3 disolventes diferentes a partir del extracto de hojas de *L. leucocephala*, extracto metanólico: 620 µg/mL, acetona: 5000 µg / mL y finalmente para el clorofórmico 1250 µg/mL. Los valores reportados por este autor para los solventes de interés son inferiores a los de la presente investigación, donde se obtuvieron valores de CMI de 2000 a 3000 µg/mL.

La variabilidad de los datos puede deberse a varios factores, tanto intrínsecos como extrínsecos y a distintos niveles. El primero de ellos reside en las condiciones del medio a la que son sometidos los organismos de las especies vegetales, ya que Ávalos & Pérez (2009) indica que la concentración, presencia o efecto de los metabolitos secundarios varía respecto a condiciones de tipo biótico como depredación, polinización o relaciones de simbiosis, entre otros factores. Además, las condiciones propiamente ambientales como la incidencia de luz, temperatura, presión, altitud, humedad y tipo de suelo, entre otros, son elementos importantes en el efecto de los extractos vegetales en actividades biológicas, pues son los metabolitos especializados los que brindan principalmente los resultados esperados (Waizel, 2006; Abreu *et al.*, 2008). Otro punto por considerar es el manejo experimental, transporte y conservación de las muestras, la obtención de los extractos vegetales (muestras frescas o secas), el tipo de solvente y el proceso mismo de extracción para conocer sobre la variabilidad de los datos (Ringuelet, 2013).

En este estudio se probaron los efectos antimicrobianos, utilizando pruebas que requieren el uso de bacterias y los medios de cultivo pertinentes. Por ello el manejo de estos últimos también añade otro factor de variación que afecte el diámetro de los halos inhibitorios en las pruebas cualitativas, dichos factores son: la carga de extracto, la difusión de este en el medio de cultivo, el tamaño del inóculo, la composición y grosor del medio de cultivo, la velocidad del crecimiento bacteriano y el tiempo de incubación (Hernández-Delgado, 2004).

El efecto mismo de los extractos también debe considerar, en este caso, los mecanismos de acción de los antibacterianos y las diferencias estructurales y fisiológicas entre las bacterias utilizadas. Los agentes antimicrobianos actúan por

una serie de mecanismos muy diferentes entre ellos y cuyos blancos se encuentran en diferentes regiones de la célula y aunque más adelante serán detallados respecto a los mecanismos de acción de los metabolitos secundarios, en general estos blancos son: la pared bacteriana, la membrana bacteriana, la síntesis de proteínas inhibiendo funciones ribosomales, síntesis de ácidos nucleicos o atacando otras rutas metabólicas (FAO, 2017). Finalmente, otra pauta a nivel bioquímico es la diferente composición de las estructuras bacterianas, ya que difieren en el grosor y presencia de membrana, pared y componentes como ácidos teicoicos y lipoteicoicos y polisacáridos complejos (Raisman, 2005).

8.3. Metabolitos secundarios antimicrobianos

Un estudio llevado a cabo por Salem *et al.*, (2011) realizó un screening para los extractos de *L. leucocephala* obteniendo un total de 44 componentes, sin embargo, los compuestos más característicos del género son: ácido cinámico, mimosina, epicatequina-3-O-galato, quercetina-3-O-arabinofuranosida, quercetina-3-O-ramnosida, apigenina y ácido tánico (Aderogba *et al.*, 2010). Varios de ellos de naturaleza polar y compuestos fenólicos registrados por poseer actividad antimicrobiana para cepas Gram positivas y negativas.

Se observó mediante pruebas coloridas la composición de algunos metabolitos secundarios, obteniendo presencia de alcaloides, monoterpenos, fenoles, saponinas, triterpenos y esteroides.

Tanto el guaje rojo como el guaje blanco pertenecen a la familia de las leguminosas, se ha investigado que cantidades apreciables de aminoácidos tóxicos y sustancias como taninos y saponinas existen frecuentemente en las hojas y semillas de esta familia. La mimosina, un alcaloide reportado para las plantas del género *Leucaena*, contiene en las hojas, los tallos y las semillas de *L. leucocephala* cantidades de 30 mg/g, aproximadamente (D' Mello, 1982). De igual manera Yik *et al.*, (2011) indica presencia de alcaloides en las semillas de *L. leucocephala* de 23 mg/g de peso seco. Otros metabolitos fueron encontrados en hojas, flores, tallos, semillas y raíces, tales

como taninos, antocianinas, glucósidos, terpenos, cumarinas, esteroides y compuestos fenólicos en toda la planta (Reda *et al*, 2015; Savita & Preeti, 2015).

Fueron identificados compuestos fenólicos como flavonoides, catequinas (galocatequina), apigenina, quercetinas conjugadas y ácido caféico mediante el análisis cualitativo HPLC por arreglo de diodos los cuales presentaron actividad antimicrobiana sobre las cepas de interés médico susceptibles (*S. aureus* y *E. coli*).

Los compuestos fenólicos son moléculas que tienen uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático. Estos compuestos juegan una serie de funciones metabólicas en las plantas, en el crecimiento y reproducción, y en la protección contra patógenos externos y el estrés, como la radiación UV y los depredadores. Ellos son responsables en parte del color y las características sensoriales de las plantas, además de su actividad antioxidante, se les atribuye actividad antibiótica, antiparasitaria y citotóxica (Peñarrieta *et al.*, 2014).

Los compuestos fenólicos tienen la capacidad de absorber en el espectro de UV gracias a su anillo aromático y al fenómeno de resonancia, esta capacidad, se observa gráficamente por picos máximos en los espectros de UV. Cabe resaltar, que el máximo de absorción de estos compuestos no sólo varía de acuerdo con el estado de oxidación del anillo central, sino además del número y posición de los grupos periféricos como resultado de los diferentes sistemas conjugados (Rivera, 2008; Marcano & Hasegawa, 2018; Durst, 2021). A este respecto estos metabolitos, tienen picos máximos de absorción en UV entre los 230 y los 380 nm (Marcano & Hasegawa, 2018). Compuestos como la quercetina tienen valores máximos de absorción de 250 y 350 nm (Buchweitz *et al.*, 2016; Marcano & Hasegawa, 2018), la catequina 295 y 320 nm; la galocatequina picos de 235 y 285 nm y los flavonoides en general poseen dos máximos en 265 y 295 nm (Pretsch, 1980; Rubinson, 2000; Marcano & Hasegawa, 2018).

Reportes de Martínez (2006) indican que la quercetina y los ácidos hidroxicinámicos (3-o-, 4-o- y 5-o-cafeoilquínicos) contenidos en los extractos metanólicos de *Prunus* mostraron actividad antimicrobiana contra patógenos como *E. coli*, *Salmonella*

entendáis, *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri*. Por su parte, Martínez (2009) demostró que las catequinas del té son inhibidores eficientes de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), enzima diana de un tipo de fármacos, los antifolatos contra infecciones bacterianas y fúngicas. La apigenina, otro compuesto fenólico fue probado como agente antimicrobiano, mostrando inhibición en cinco cepas patógenas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter aerogenes* (Nayka et al, 2014).

Por lo que los compuestos fenólicos tienen gran capacidad antimicrobiana sobre cepas de interés médico como las de interés en el presente trabajo.

8.5. Análisis espectroscópicos y espectrométricos del compuesto aislado

Como resultado de los análisis espectroscópicos y espectrométricos se determinó la estructura del compuesto aislado el cual corresponde al D-pinitol. Este glicósido deriva del 1D-chiro-inositol y es una sustancia casi omnipresente en las familias Fabaceae y Pinaceae. En las plantas, desempeña un rol importante como modulador celular fisiológico (osmolito) y defensa química frente a condiciones ambientales desfavorables, como déficit hídrico y alto nivel de salinidad (Sánchez et al, 2021).

Los vegetales ricos en D-pinitol como las leguminosas: *Prosopis laevigata* (mezquite blando) (García, 2003), *Senna septemtrionalis* (retama) (Alonso et al., 2022), *Ceratonia siliqua* (Algarrobo) (Medina et al., 2022), varias especies de mimosa como *Mimosa xanti* (Osti et al., 2010) y acacias como *Acacia nilotica* (Chaubal et al., 2005), *Eysenhardtia platycarpa* (Bernabé et al., 2021) entre otras, se están utilizando principalmente en la medicina tradicional como tratamiento empírico de la diabetes, inflamaciones o cáncer (Singh et al, 2001; Pandi et al., 2022). Diversos estudios le atribuyen a dicha sustancia propiedades contra la demencia y la enfermedad de Alzheimer (Alonso et al., 2022), así como tratamientos para nefropatías diabéticas y mejora nutricional en las dietas con pacientes de Diabetes Mellitus (National Center for Biotechnology Information, 2022). Además, también tiene un papel como geroprotector, antiinflamatorio (Singh et al, 2001;

National Center for Biotechnology Information, 2022), ansiolítico (Aguilar, 2016) y anticonvulsivo (Alonso *et al.*, 2022; Pandi *et al.*, 2022), entre otros.

Reportes de Gorham *et al.*, (1988) y Ching *et al.*, (1996), demuestran presencia de este inositol en raíces, hojas y semillas de *L. leucocephala*. Por su parte, respecto a la actividad antimicrobiana, Sansores *et al.*, (2000) demostraron mediante el ensayo de difusión en agar que el D-pinitol no posee actividad antimicrobiana sobre cepas de *S. aureus* y *E. coli* entre otras. Por lo que el reporte coincide con lo encontrado la presente investigación ya que dicha sustancia no presentó actividad biológica antimicrobiana sobre las mismas cepas de interés médico.

CONCLUSIONES

Los rendimientos más elevados fueron para los extractos y particiones metanólicos y acuosos de ambos guajes.

Los extractos metanólicos, la partición y fraccionamientos de estos, presentaron actividad biológica antimicrobiana importante sobre cepas de *S. aureus* y *E. coli*.

Los metabolitos involucrados en la actividad biológica son de naturaleza polar y moléculas de pequeño tamaño como los alcaloides, compuestos fenólicos entre otros, como las pruebas coloridas indicaron previamente.

No hay selectividad entre cepas Gram positivas y negativas.

Fue aislado D-Pinitol de la partición metanólica de semillas de *L. leucocephala* el cual no tuvo actividad antimicrobiana.

Fueron identificados cualitativamente mediante HPLC diversos compuestos fenólicos tales como flavonoides, catequinas (galocatequina), apigenina, quercetinas conjugadas y ácido caféico los cuales tienen potencial actividad antimicrobiana.

El presente estudio contribuye a validar el uso en la medicina popular de *L. leucocephala* y *L. esculenta* para tratar algunas enfermedades infecciosas, además de ser trascendente por ser un trabajo que no se había llevado a cabo en semillas de ambas especies de guaje.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu G, Orlando A, Cuéllar CA (2008). Estrategias en la selección de las plantas medicinales a investigar. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, **13**(3).
- Abu ZM, Wan HY, Isha A, Armania N (2016). Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic potential of condensed tannins from *Leucaena leucocephala* hybrid-Rendang. *Food Science and Human Wellness*, **5**(2): 65-75.
<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2016.02.001>
- Aderibigbe SA, Adentunji OA, Odeniyi MA (2011). Antimicrobial and pharmaceutical properties of the seed oil of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. (Leguminosae). *African Journal of Biomedical Research*, **14**: 63-68.
- Aderogba MA, Mc Gaw LJ, Bezabih BT, Abegaz BM (2010). Antioxidant activity and cytotoxicity study of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit leaf extract constituents. *Nigerian Journal of Natural Products and Medicine*, **13**(1): 65-68.
<https://doi.org/10.4314/njnpm.v13i1.61612>
- Aguilar AA (2016). Actividad tipo-ansiolítico del extracto metanólico de hoja de *Rivina humilis* (Phytolaccaceae). Tesis de Doctorado. Instituto de Neuroetología. Doctorado en Neuroetología. Xalapa, Veracruz. 109 p.
- Aguilar AP (1999). Plantas medicinales del sur de México. Guías prácticas. México desconocido. México, D.F. Pp.11-20.
- Alonso AJ, Gasca D, Betancourt CA (2022). Plantas medicinales con efectos en modelos de ansiedad y depresión en ratones. *Elementos*, **126** (2022) 99-104.
- Ávalos A & Pérez EC (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). *Serie Fisiología Vegetal*, **2** (3): 119-145.
- BDMTM. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana (2016). Guaje. *Leucaena esculenta* (Moc. & Sessé ex DC.) Benth. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. Consultado en abril, 2021. Disponible en: <https://cutt.ly/tTQWxnL>

- Bernabé A, Sánchez A, Romero A, Meza JC, Silva JA, Fuentes FJ, ... Cruz F (2021). Establishment of a Cell Suspension Culture of *Eysenhardtia platycarpa*: Phytochemical Screening of Extracts and Evaluation of Antifungal Activity. *Plants*, **10**(2), 414. <https://doi:10.3390/plants10020414>
- Biodiversidad Mexicana (2021). México, país megadiverso. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Ciudad de México Consultado en abril, 2021. Disponible en: <https://www.biodiversidad.gob.mx/especies/cuantasesp#dos>
- Buchweitz M, Kroon PA, Rich GT, Wilde PJ (2016). Quercetin solubilisation in bile salts: A comparison with sodium dodecyl sulphate. *Food Chemistry*, **211**, 356–364. <https://doi:10.1016/j.foodchem.2016.05.034>
- Chaubal R, Pawar PV, Hebbalkar GD, Tungikar VB, Puranik VG, Deshpande VH, Deshpande NR (2005). Larvicidal Activity of *Acacia nilotica* Extracts and Isolation of D-Pinitol—A Bioactive Carbohydrate. *Chemistry & biodiversity*, **2**(5), 684-688. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200590044>
- Ching C, Tsan L, Chiun J, Guor H (1996), Occurrence of a Novel Galactopinitol and its Changes with Other Non-Reducing Sugars during Development of *Leucaena leucocephala* Seeds, *Plant and Cell Physiology*, **37** (4): 539-544. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a028977>
- CONABIO Naturalista (2015). Género *Leucaena* (Guajes). Ciudad de México. Consultado en mayo, 2022. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/taxa/47453-Leucaena>
- CONABIO y UAEM (2006). La Diversidad Biológica en Morelos: Estudio del Estado. (T. Contreras, J. Boyás, & F. Jaramillo (eds.)). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. 156 p.
- CONAFOR (2016). *Leucaena esculenta* (Moc. & Sessé ex DC.) Benth. Ciudad de México. Consultado en mayo, 2022. Disponible en: <https://cutt.ly/XTnYE3l>
- D'Mello JP (1992). Chemical constraints to the use of tropical legumes in animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, **38**(3): 237-261. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(92\)90105-F](https://doi.org/10.1016/0377-8401(92)90105-F)
- Durst HP (2021). Química orgánica experimental. Reverte. España. Pp. 452-460.
- Enciclopedia de los Municipios y delegaciones de México (2016). Morelos. Tlayacapan. INAFED. SEGOB. México, DF. 10p. Consultado en agosto, 2020. Disponible en: <https://cutt.ly/4TnO5tD>

- Encyclopedia of Life (EOL). (2021). What is Biodiversity? Consultado en abril, 2021. Disponible en: <https://eol.org/docs/discover/plants>
- FAO (2017). Mecanismo de acción de antibióticos. Uso de Antimicrobianos en Animales de Consumo Humano. Departamento de Agricultura.
- Flatley PB (2019). Infectious Diseases. U.S. Department of Health and Human Services National Institutes of Health. MedlinePlus. Consultado en agosto, 2020. Disponible en: <https://cutt.ly/LnrSjUp>
- Fragoso-Velázquez LC (2012). Mortalidad 2010 del Estado de Morelos. Boletín Estadístico No. 14. Capítulo V. Mortalidad por enfermedades diarreicas por municipio. Secretaria de Salud del Estado de Morelos. Consultado en agosto, 2020. Disponible en: <https://cutt.ly/5TnSIDt>
- Galindo J, Joandra M, Niurka A, Bertha C (1995). Efecto de la *Leucaena leucocephala* en la población microbiana ruminal en vacas que consumen forraje de caña de azúcar y King grass. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, **29**(1):45-51.
- García-Bores AM (2003). Estudio fitoquímico y antibacteriano de *Prosopis leavigata* (H.B. ex Wild), mezquite de Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. FES-Iztacala. UNAM.
- GoogleEarthPro (2021). Copyright (C) 2021. Imagen: Tlayapacan, Morelos.
- Hernández-Delgado CT (2004). Etnobotánica y actividad antimicrobiana de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional del Valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Tesis doctoral. Posgrado en Ciencias Biológicas. FES-Iztacala. UNAM.
- INPI. Instituto Nacional de Pueblos Indígenas (2020) Atlas de pueblos indígenas. Datos nacionales. Ciudad de México. Consultado en octubre, 2020. Disponible en: <http://atlas.inpi.gob.mx/pueblos-indigenas/>
- Koh JT, Zheng J (2007). La nueva química biomimética: factores de transcripción artificial. *Chemical Biology*, **2**(9): 599–601. <https://doi.org/10.1021/cb700183s>
- Llorente J, Ocegueda S (2008). Estado del conocimiento de la biota, en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 283-322.
- Lozoya X (1994). Two decades of Mexican ethnobotany and research in plant drugs. *Ethnobotany and Resarch for New Drugs*, **185**:134-140.
- Marcano D, Hasegawa M (2002). Fitoquímica orgánica. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. 576 p.

- Martínez MD (2009). Actividad antimicrobiana y antifúngica de las catequinas del té: inhibición del ciclo del ácido fólico y su conexión con otras rutas metabólicas (Doctoral dissertation, Universidad de Murcia). Murcia, España. 102 p.
- Martínez NS (2006). Identificación de compuestos fenólicos con posible actividad biológica obtenidos de ciruela (*Prunus cerasifera* Ehrh) Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias Básicas. Xalapa, Veracruz. 109 p.
- Mathur P, Singh A, Ranjan S, Dharmendra S, Mishra Y (2013). Antimicrobial activity of indigenous wildy growing plants: potential source of green antibiotics. *African Journal of Biomedical Research*, **7**(29): 3807-3815. <https://doi.org/10.5897/AJMR2012.2368>
- Medina D, Navarro JA, Rivera P, Rosell C, Gutiérrez A, Sanjuan C, ... Rodríguez de Fonseca F (2022). D-Pinitol promotes tau dephosphorylation through a cyclin-dependent kinase 5 regulation mechanism: A new potential approach for tauopathies?. *British journal of pharmacology*, **179**(19), 4655-4672. <https://doi:10.1111/bph.1590>
- Mora MA, Serrano R, Lira R, Jiménez M, Hernández T (2021). Evaluación de la actividad antimicrobiana de semillas de *Leucaena esculenta* y *Leucaena leucocephala* recolectadas en Tlayacapan, Morelos, México. *Polibotánica*, **52**, 175-191. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.52.12>
- Mora-Villa MA (2017) Evaluación de la actividad antimicrobiana de vainas y semillas de dos especies del género *Leucaena*: *Leucaena esculenta* y *Leucaena leucocephala* de la localidad de Tlayacapan, Morelos. Tesis de maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. FES-Iztacala. UNAM.
- National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 164619, D-Pinitol. Consultado en agosto, 2023. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-Pinitol>.
- Nayaka HB, Londonkar RL, Umesh MK, Tukappa A. (2014). Antibacterial attributes of apigenin, isolated from *Portulaca oleracea* L. *International journal of bacteriology*. 2014: 1-8. <https://doi.org/10.1155/2014/175851>
- Nwe YW, Mar MN, Nyunt W, Win M, Saw HM, Myint K (2001). Antibacterial activity of selected Myanmar medicinal plants. *Journal of Myanmar Academic Technology*, **1**: 75-88.
- Ocegueda S, Moreno E, Koleff P (2005). Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Biodiversitas. México, D.F., México. 62:12-15.

- OMS (2013). Estrategia sobre la medicina tradicional (2014-2023). Hong Kong SAR, China. Pp. 7-16. Consultado en marzo, 2021. Disponible en: <https://cutt.ly/EnrV7xm>
- OMS (2017). Resistencia a los antimicrobianos. Nota descriptiva. México, DF. 10p. Consultado en marzo, 2021. Disponible en: <https://cutt.ly/knrBhJs>
- Orwa C, Muta A, Kindt R, Jamnads R, Anthony S (2009). Agroforestry database 4.0. Tropicos.org, Missouri Botanical Garden. Pp. 1-5. Consultado en marzo, 2021. Disponible en: <https://cutt.ly/ATnC9WX>
- Osti MDR, Torres JJM, Villagómez JR, Castelán I (2010). Estudio químico de cinco plantas mexicanas de uso común en la medicina tradicional. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, **9**(5), 359-367. <https://www.redalyc.org/pdf/856/85615225007.pdf>
- Pandi A, Sattu K, Kalappan VM, Lal V, Varikasuvu SR, Ganguly A, Prasad J (2022). Pharmacological effects of D-Pinitol. A comprehensive review. *Journal of Food Biochemistry*, **46**(10), e14282. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14282>
- Peñarrieta JM, Tejeda L, Mollinedo P, Vila JL, Bravo JA (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*, **31**(2): 68-81. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=426339682006>
- Peralta I, Gómez A, Romero PA, Reyes A (2017). Uso antropocéntrico del guaje *Leucaena esculenta* (Moc. & Sessé Ex. DC.) Benth, en dos comunidades de la mixteca baja oaxaqueña, México. *Polibotánica*, **43**: 1–16.
- Pretsch E, Clerc T, Seibl J, Simon W (1980). Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos. Alhambra. Madrid, España. 307p.
- Raisman JS (2005). Hipertextos del Área de Biología. Célula procarionte. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Ciencias Agrarias. Argentina.
- Reda SM, El-Souda SS, Hanan AA, Moharam ME, Shaker KH (2015). Antioxidant, antimicrobial activities of flavonoids glycoside from *Leucaena leucocephala* leaves. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **5**(06):138-147. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50623>
- Ringuelet JA, Viña S (2013). Productos naturales vegetales. Editorial Universidad de La Plata.
- Rivera W (2008). Síntesis y reactividad de compuestos aromáticos. Química Orgánica. Ciencias Químicas. Universidad Autónoma "Tomás Frías". Bolivia. 28p.

- Rojas G, Lévaro J, Tortoriello J, Navarro V (2001). Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. *Journal of Ethnopharmacology*. 74:97-101. [https://10.1016/s0378-8741\(00\)00349-4](https://10.1016/s0378-8741(00)00349-4)
- Román D (2015). Uso potencial de recursos vegetales en el municipio de Tlayacapan, Morelos. Tesis. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., México. 185 p.
- Román N, García M, Castillo AM, Sahagún J, Jiménez A (2014). Componentes nutricionales y antioxidantes de dos especies de guaje (*Leucaena* spp.): un recurso ancestral subutilizado. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, **20**(2), 157–170.
- Royaka MB, Uprety Y, Poudel RC, Timsina B, Munzbergova Z, Asselin H, Tiwari A, Shrestha SS, Sigdel SR (2014). Traditional uses of medicinal plants in gastrointestinal disorders in Nepal. *Journal of Ethnopharmacology*, **158**: 221-229. <https://10.1016/j.jep.2014.10.014>
- Rubinson KA, Rubinson JF (2000). Análisis Instrumental. Pearson Educación. 872p.
- Salem AZM, Salem MZM, Gonzalez M, Camacho LM, Cipriano M (2011). Major chemical constituents of *Leucaena leucocephala* and *Salix babylonica* leaf extracts. *Journal of Tropical Agriculture*, **49**(1):95-98.
- Sánchez M, León AJ, Gálvez M (2021). D-Pinitol: a cyclitol with versatile biological and pharmacological activities. *Phytochemistry Reviews*, **20**: 211-224. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09677-6>
- Sansores P, Rosado M, Brito W, Mena GJ, Quijano L (2000). Cassine, an antimicrobial alkaloid from *Senna racemosa*. *Fitoterapia*, **71**(6), 690-692. [https://doi:10.1016/s0367-326x\(00\)00152-0](https://doi:10.1016/s0367-326x(00)00152-0)
- Savita S & Preeti S (2015). Evaluation of antibacterial and antimutagenic potential of *Acokanthera oppositifolia* and *Leucaena leucocephala*. *American Journal of Pharmacy and Health Research*, **3**(1).
- Secretaría de Desarrollo Agropecuario (SDA). 2012. Compendio estadístico del municipio de Tlayacapan. Gobierno del Estado de Morelos. Consultado en mayo, 2022. Disponible en: <https://cutt.ly/iTn154U>
- Sepúlveda J, Torres J, Sandoval C, Martínez J, Chan J (2018). 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*, **5**(2), 79–95.

- Singh RK, Pandey BL, Tripathi M, Pandey VB. (2001). Anti-inflammatory effect of (+)-pinitol. *Fitoterapia*, **72**(2), 168-170. [https://doi:10.1016/s0367-326x\(00\)00267-7](https://doi:10.1016/s0367-326x(00)00267-7)
- SIRE-CONABIO (2010.) Sistema de Información para la Reforestación-CONABIO. *Leucaena esculenta* y *Leucaena leucocephala*. Paquetes Tecnológicos. México. D.F. CONAFOR. 7 p. Consultado en agosto, 2020. Disponible en: <https://cutt.ly/STn2qn1>
- Soejarto DD, Fonga HHS, Tana GT, Zhang HJ, Ma CY, Franzblau SG, *et al.* (2005) Ethnobotany/ethnopharmacology and mass bioprospecting: Issues on intellectual property and benefit-sharing. *Journal of Ethnopharmacology*, **100**(1-2):5-22. <https://10.1016/j.jep.2005.05.031>
- Vibrans H (ed.). (2011). Malezas de México. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F., México. Consultado en marzo 2021. Disponible en: <https://cutt.ly/anrDduG>
- Viesca, T.C.1999. Uso de las plantas medicinales mexicanas. *Arqueología Mexicana*. México, D.F., México. 39:30-35.
- Waizel J (2006.) Las plantas en la historia de la medicina. Las plantas medicinales y las ciencias. Una visión multidisciplinaria. Bucay, J. (Coord.) Instituto Politécnico Nacional. Pp. 181-200.
- Yik C, Ling EW, Ling P, Lim YY, Stanslas JK (2011). Assessment of phytochemical content polyphenolic composition antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **11**(12): 1472.
- Zárate S (1987). Guaje blanco. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. *Pytologia*, **63**(4), 304–306.
- Zárate S (1994). Revisión del género *Leucaena* en México. *Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica*, **65**(2): 83-162.
- Zárate S (1997). Domesticación de *Leucaena* cultivada (leguminosae) en México: Los documentos del siglo XVI. *Economic Botany*, **51** (3): 238-250. <https://doi:10.1007/bf02862093>
- Zolla C (1980). Traditional medicine in latin America, with particular reference to Mexico. *Journal or Ethnopharmacology*, **2**:37-41. [https://10.1016/0378-8741\(80\)90028-8](https://10.1016/0378-8741(80)90028-8)
- Zolla C (2020). La medicina tradicional, fundamental para la salud del mexicano. Boletín UNAM-DGCS-431. Ciudad Universitaria. UNAM. México.

ANEXO

Se presentan los cromatogramas de las fracciones con actividad biológica y los tiempos de retención de los extractos polares de semillas de *L. leucocephala* y *L. esculenta* (véase artículo de requisito).

Cromatograma *L. leucocephala*

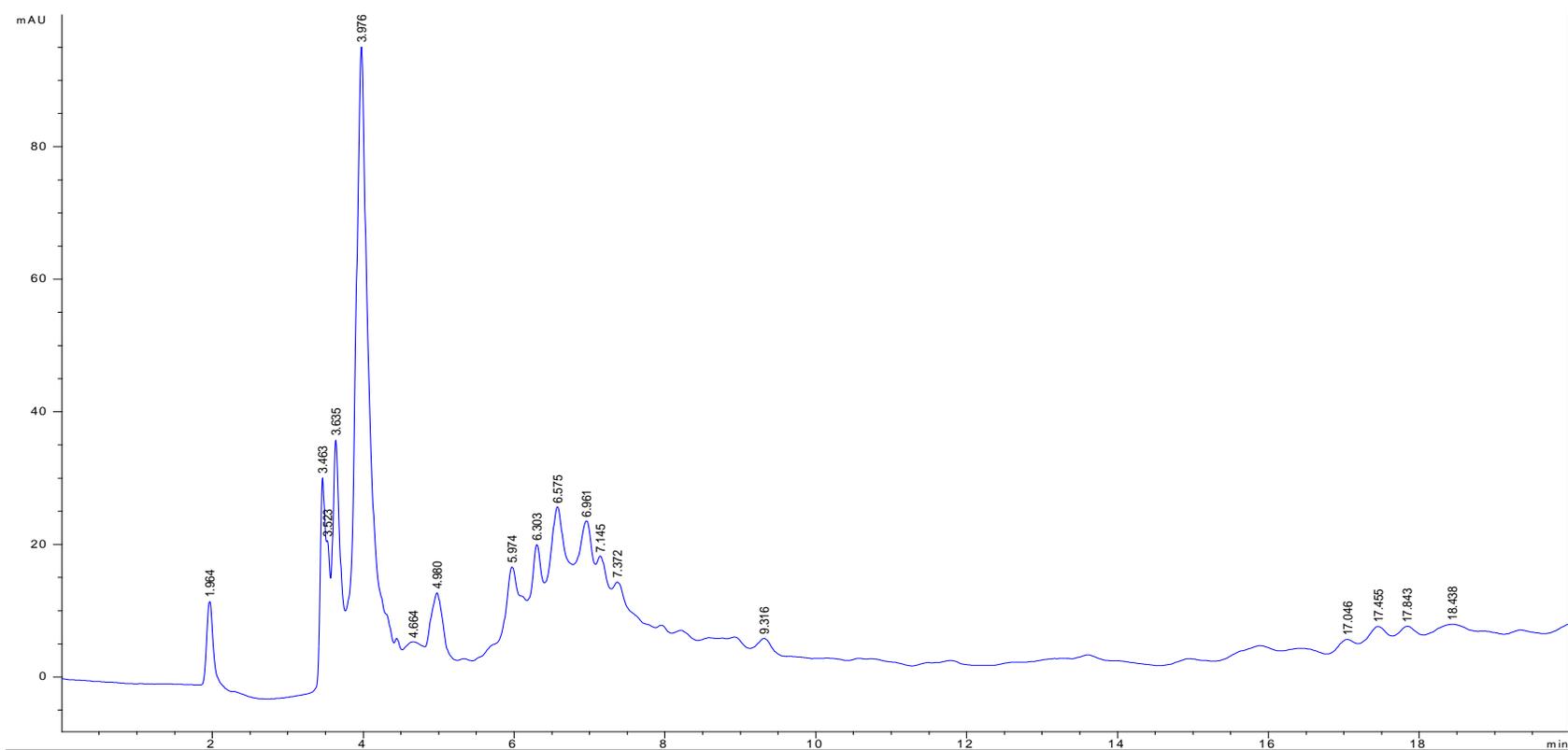


Fig. 7. Cromatograma UV- VIS. Fracción 10. 280 nm, 25° C en un sistema metanol-agua.

Cromatograma *L. leucocephala*

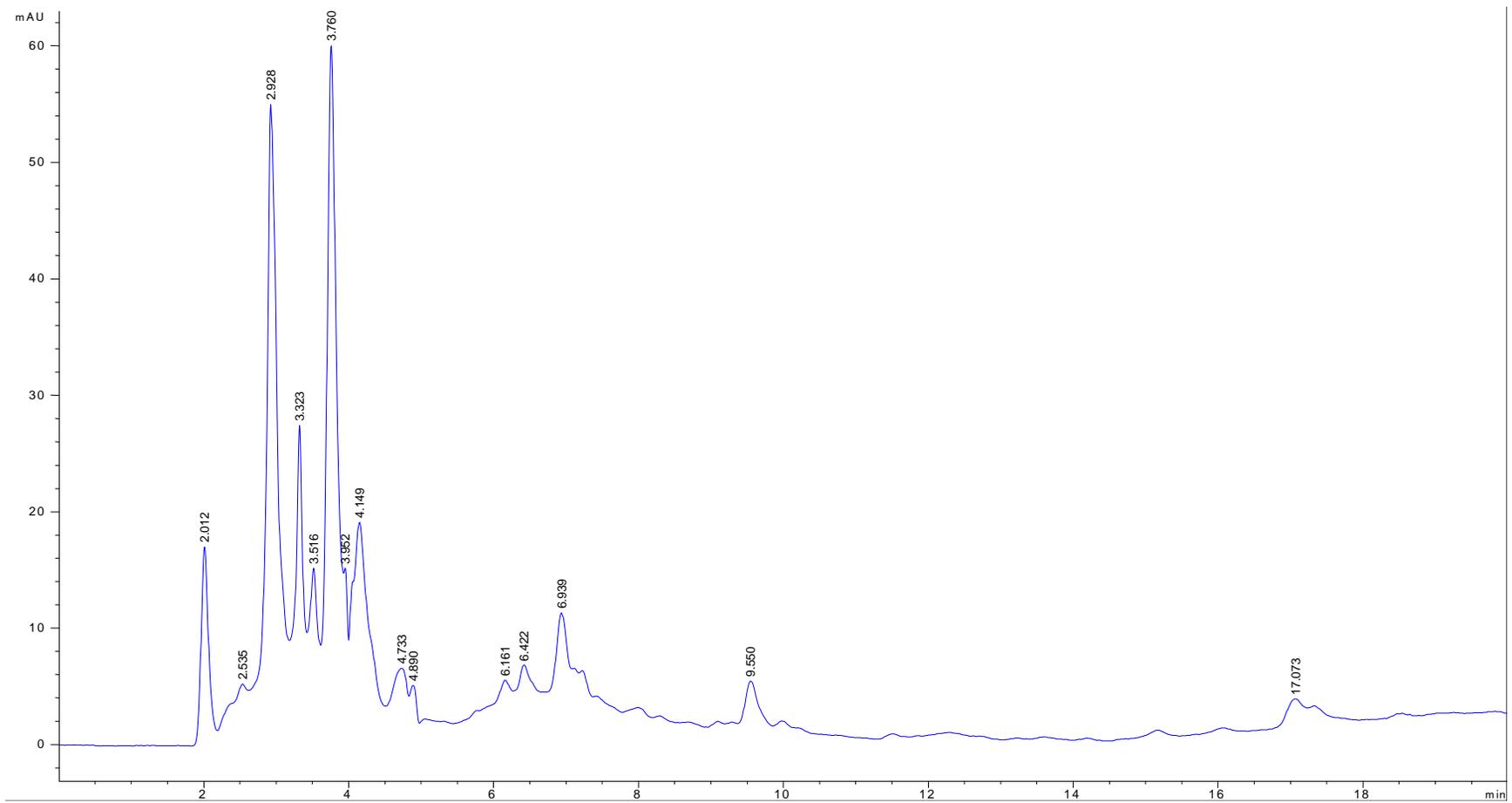


Fig. 8. Cromatograma UV- VIS. Fracción 8. 280 nm, 25° C en un sistema metanol-agua.

Cromatograma *L. leucocephala*

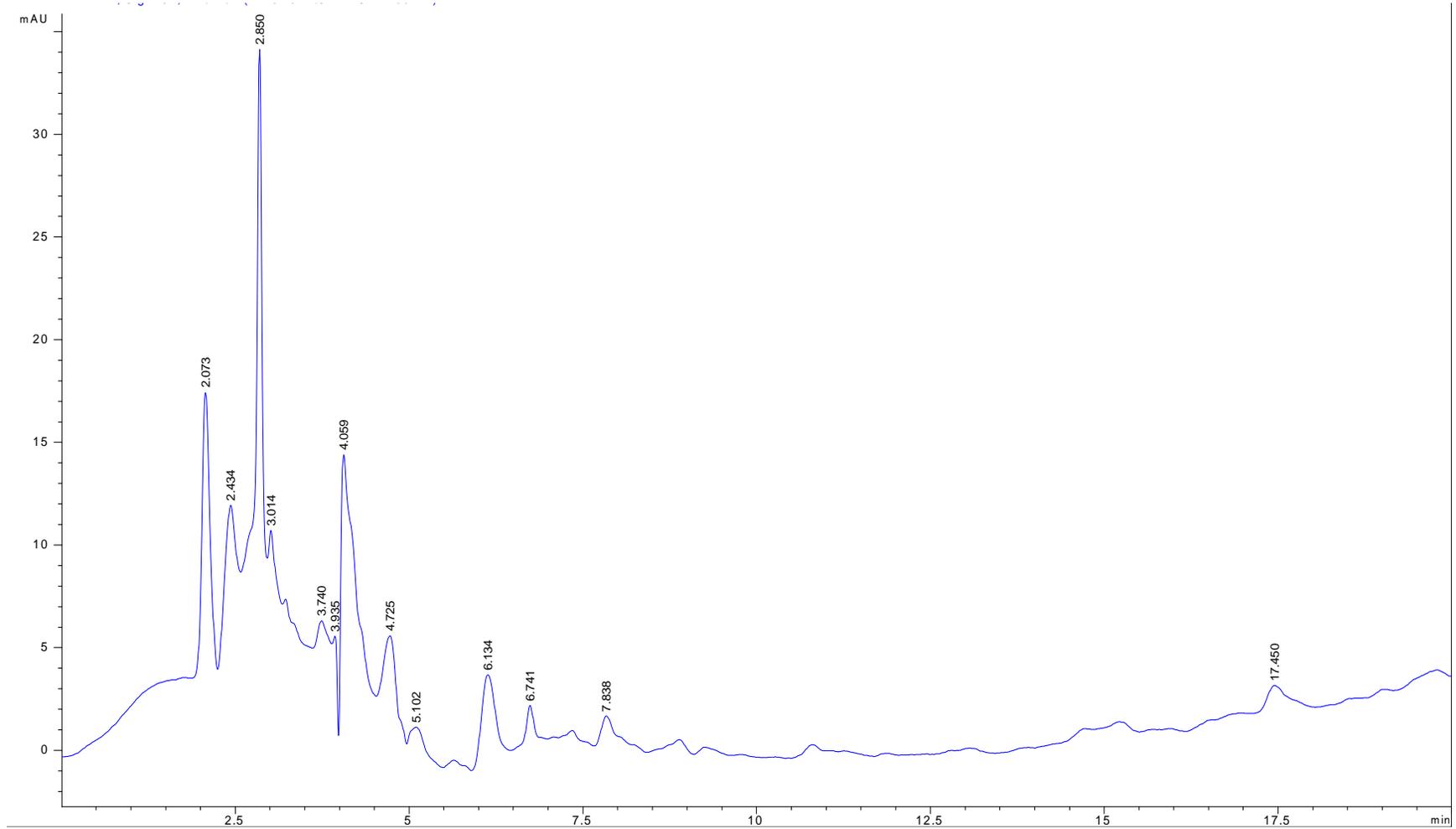


Fig. 9. Cromatograma UV- VIS. Fracción 5. 280 nm, 25° C en un sistema metanol-agua.

Cromatograma *L. esculenta*

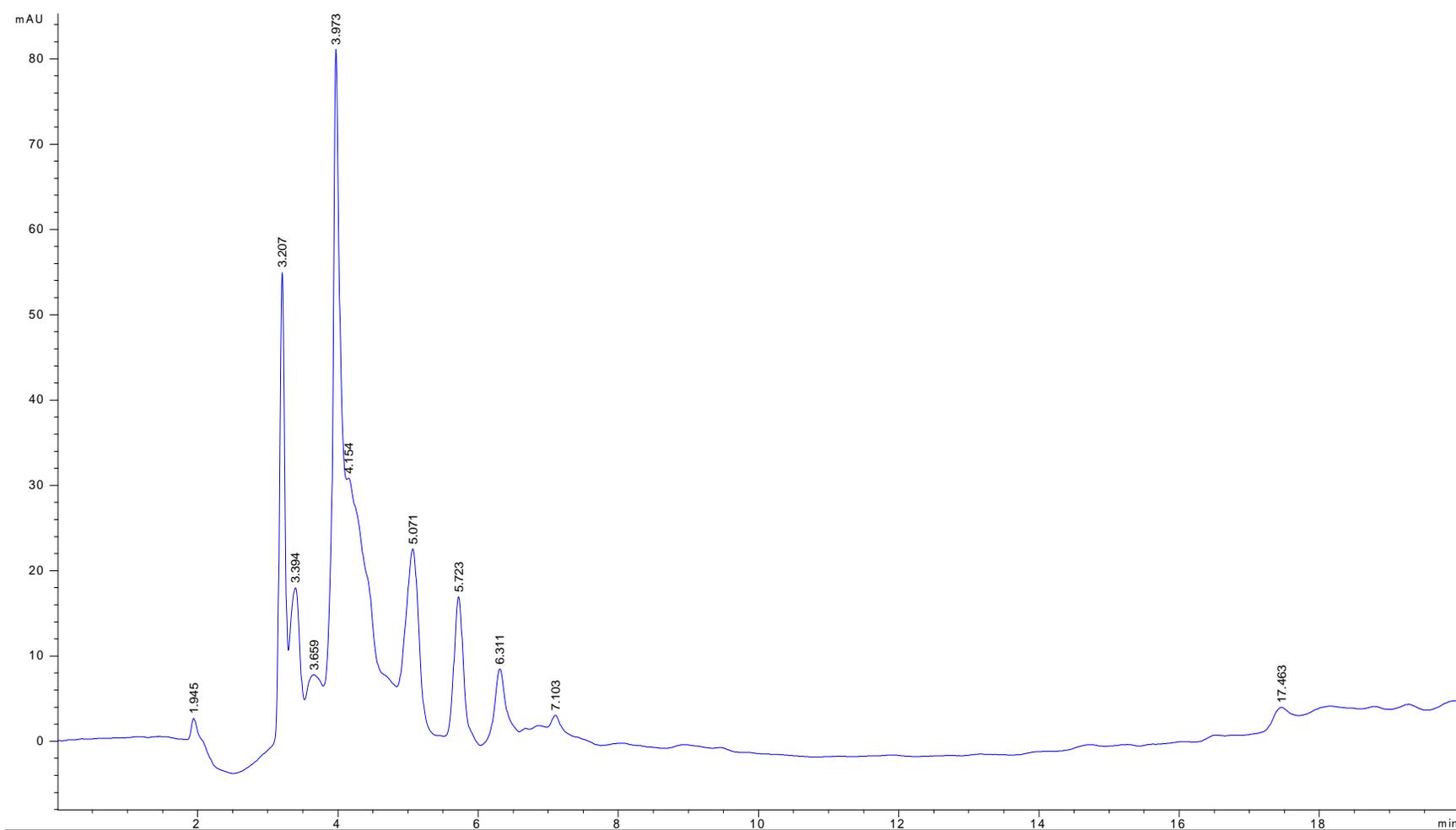


Fig. 10. Cromatograma UV- VIS. Fracción 5. 280 nm, 25° C en un sistema metanol-agua.

Cromatograma *L. esculenta*

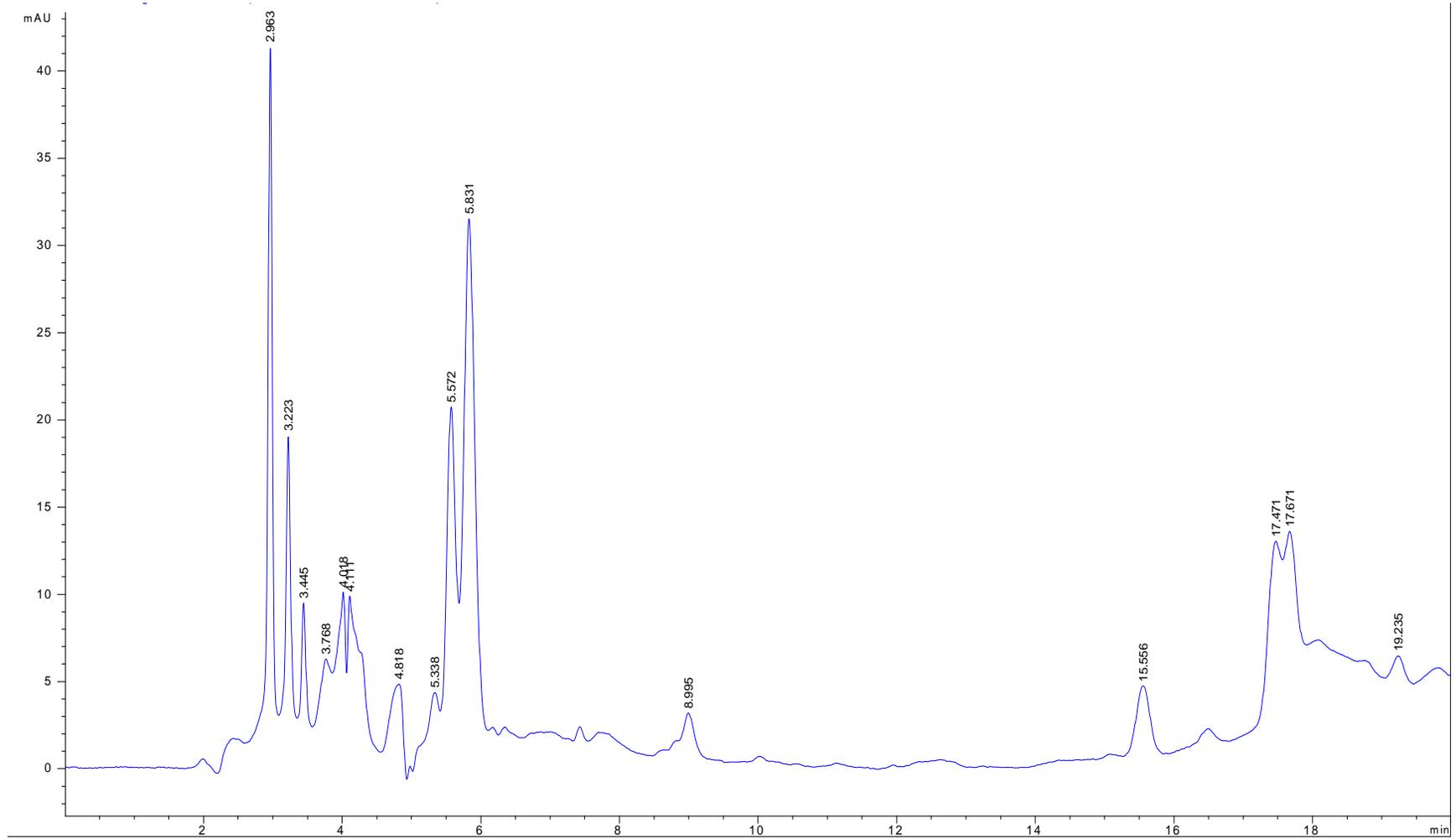


Fig. 11. Cromatograma UV- VIS. Fracción 4. 280 nm, 25° C en un sistema metanol-agua.

Cromatograma *L. esculenta*

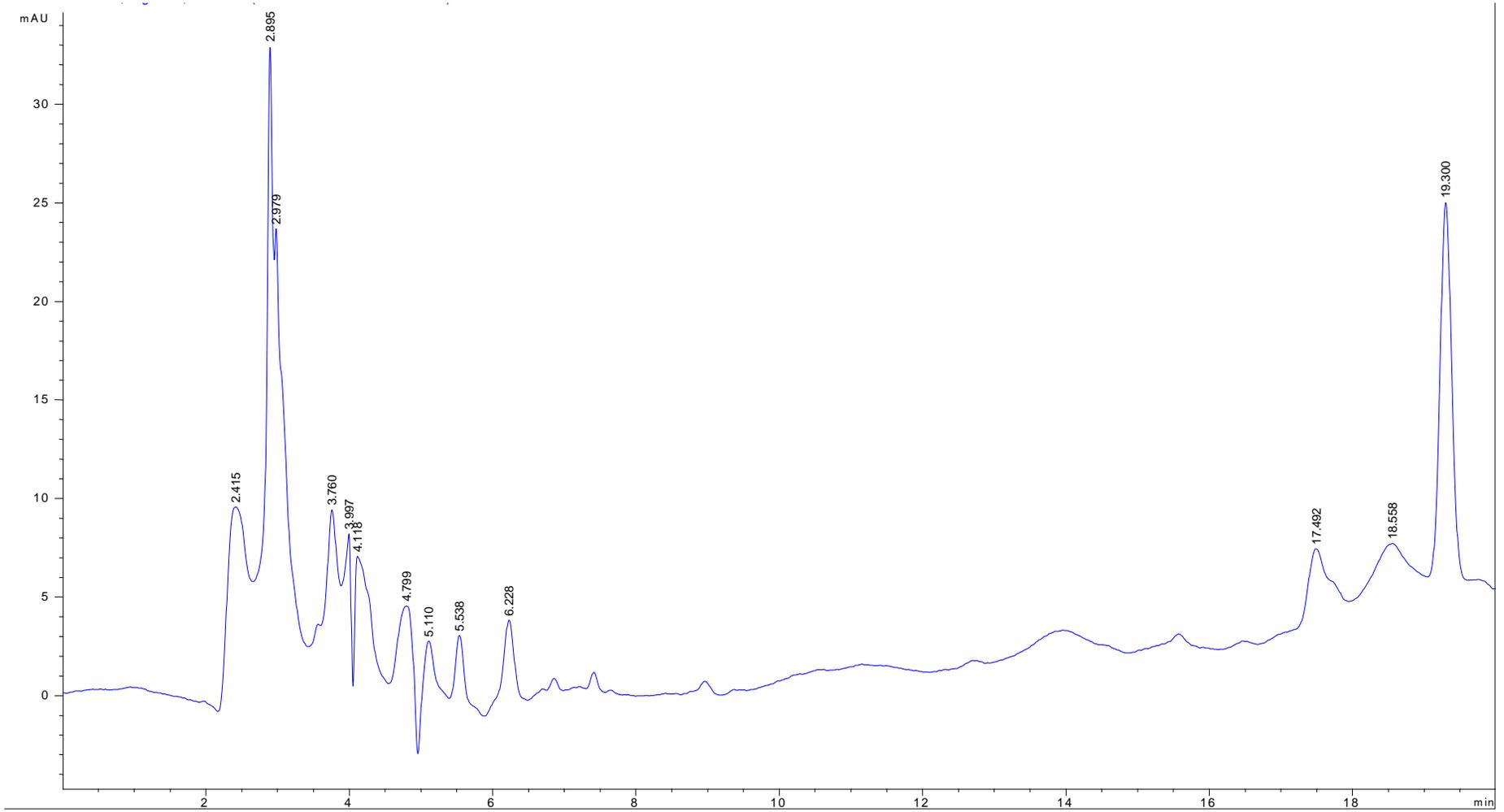


Fig. 12. Cromatograma UV- VIS. Fracción 3. 280 nm, 25° C en un sistema metanol-agua.

Se muestran los espectros de los compuestos obtenidos y sus estructuras moleculares a través de un análisis mediante HPLC-UV-VIS. 280 nm, 25°C. Sistema metanol-agua.

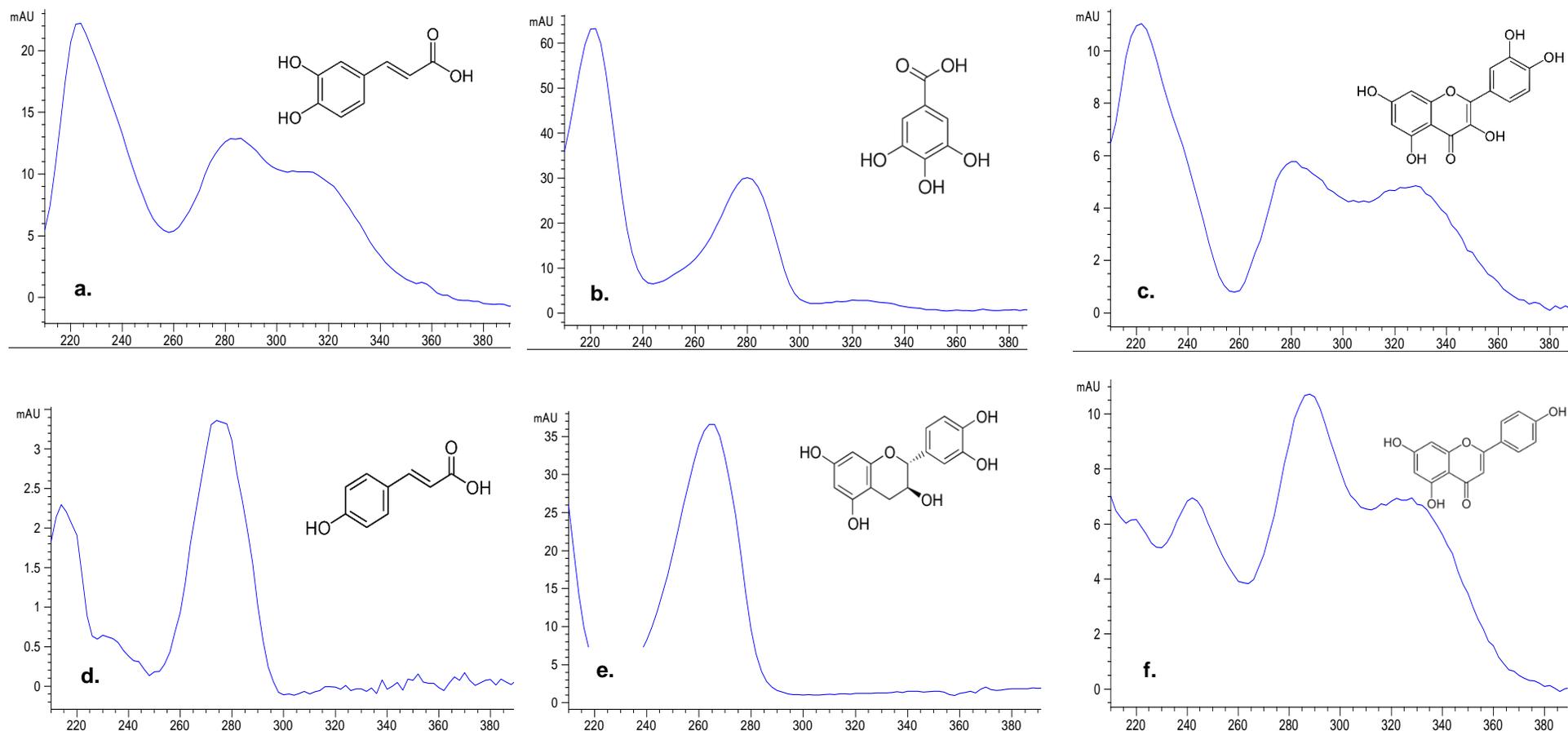


Fig. 13. Espectro UV-VIS de los compuestos: a) ácido cafeico; b) ácido gálico; c) quercetina; d) ácido p-coumárico; e) catequina; f) apigenina.