

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 (Akerlele, 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-Quiopepec 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; Bulugahapitiya, 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 alícuotas 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 alícuotas 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 alícuotas 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*

<i>L. leucocephala</i>				
Extracto o partición	Rendimiento (%)	Actividad biológica (mm)		Metabolitos secundarios
		<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 caféico	4.98
	Ácido gálico	5.97
	Quercetina	6.57
	Ácido p-cumárico	7.37
	Catequina	9.31
	Apigenina	17.84
8	Ácido caféico	4.73
	Quercetina	6.93
	Catequina	9.55
	Apigenina	17.03
5	Ácido caféico	4.72
	Ácido gálico	5.10
	Quercetina	6.74
	Ácido p-cumárico	7.83
	Apigenina	17.45
<i>L. esculenta</i>		
5	Ácido caféico	4.14
	Ácido gálico	5.72
	Quercetina	6.31
	Ácido p-cumárico	7.10
	Apigenina	17.46
3	Ácido caféico	4.79
	Ácido gálico	5.53
	Quercetina	6.22
	Apigenina	17.49
4	Ácido caféico	4.81
	Ácido gálico	5.38
	Apigenina	17.67

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

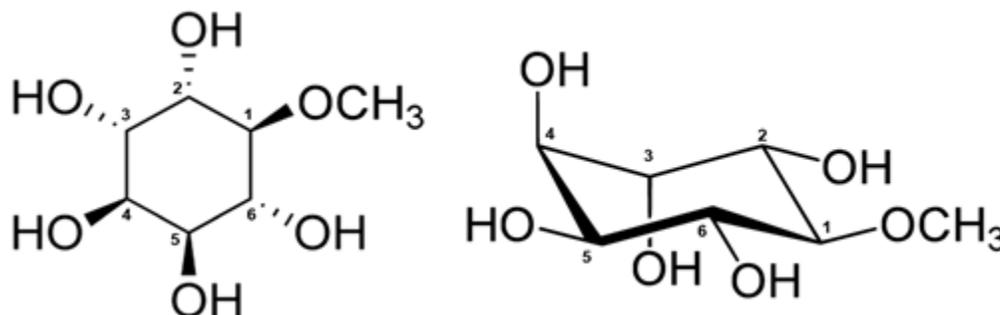


Figura N° 1

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.

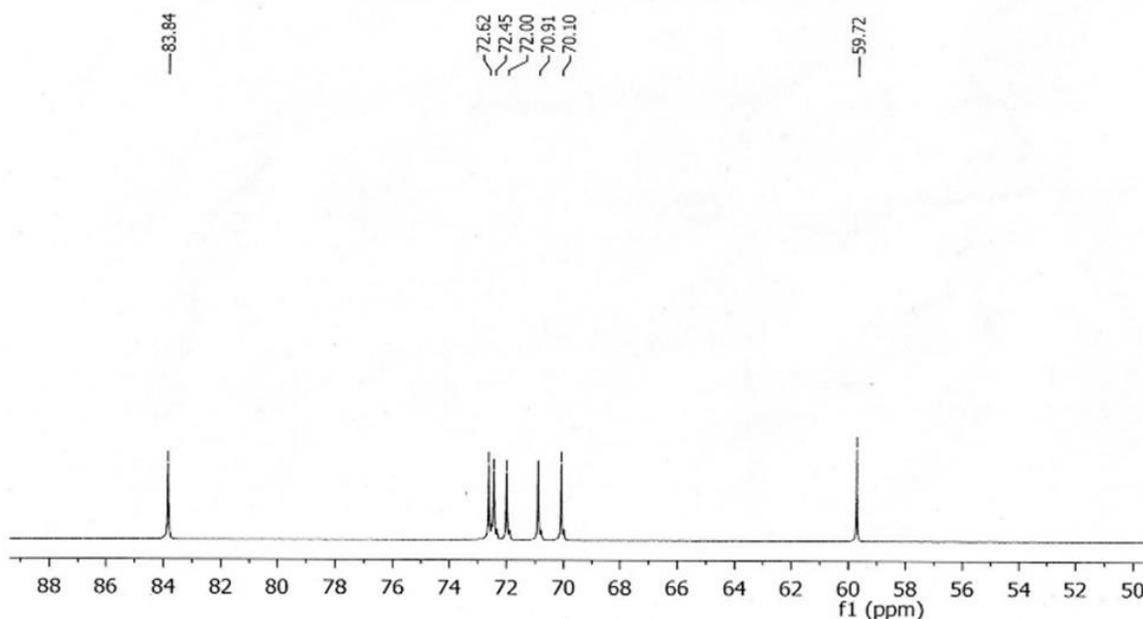


Figura N° 2
Espectro de RMN C¹³ del D-Pinitol

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.

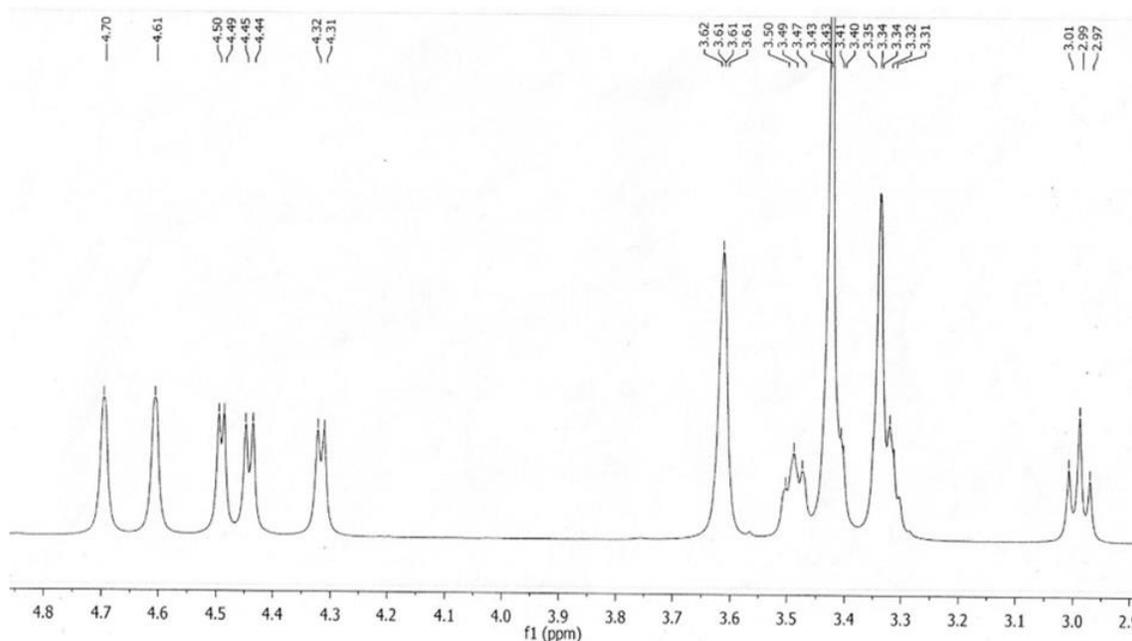


Figura N° 3
Espectro de RMN H¹ del D-pinitol

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: singlete; d: doble; sg: singlete 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; Mikłasińska *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, Ibsouda 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/KPI.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-Šonje 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-Oesterhelt 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>
- Miklasińska MM, Kępa M, Wojtyczka RD, Idzik D, Wąsik 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, Martin-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)