



Polibotánica

ISSN electrónico: 2395-9525

polibotanica@gmail.com

Instituto Politécnico Nacional

México

<http://www.polibotanica.mx>

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 antimotilítico 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:

$$\text{Actividad antifúngica (\%)} = ((Dc - Ds) / Dc) \times 100$$

Donde:

Dc = diámetro de crecimiento en la placa de control

Ds = 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 μ 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.

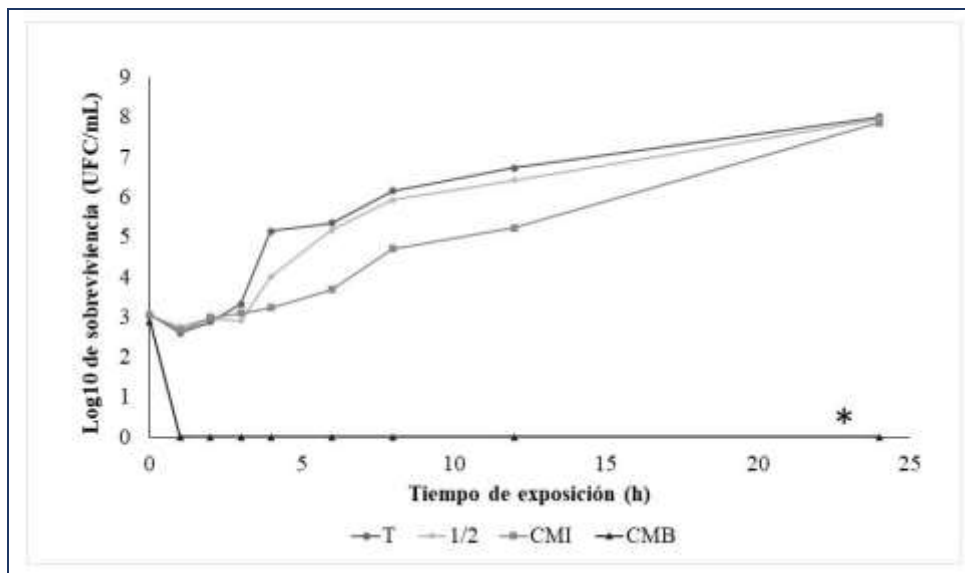


Fig. 1. Cinética de muerte para *S. aureus* CUSI del extracto acetónico de semilla de *L. leucocephala*. T: testigo: sin extracto, 1/2 CMI: 2000 µg/mL, CMI: 4000 µg/mL, CMB: 6000 µg/mL. *Significancia de CMB. $\alpha=0.05$

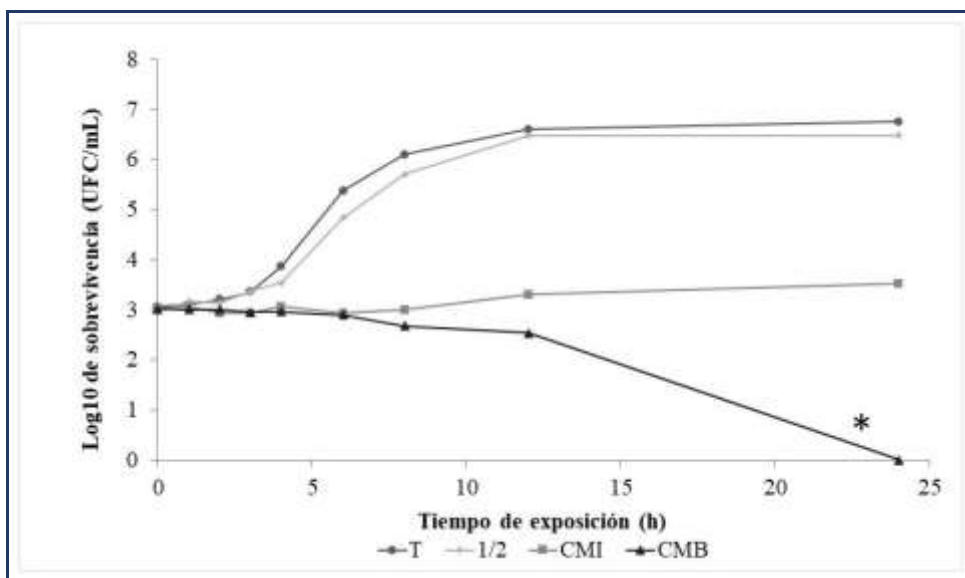


Fig. 2. Cinética de muerte para *S. aureus* CUSI del extracto metanólico de semilla de *L. leucocephala*. T: testigo: sin extracto, 1/2 CMI: 2000 µg/mL, CMI: 4000 µg/mL, CMB: 6000 µg/mL. *Significancia de CMB. $\alpha=0.05$

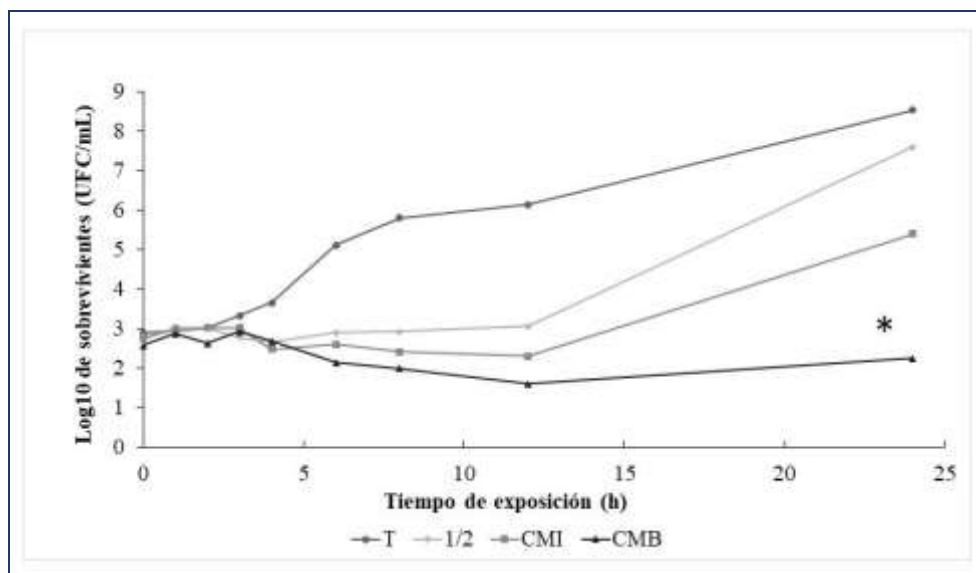


Fig. 3. Cinética de muerte para *S. aureus* CUSI del extracto metanólico de semilla de *L. esculenta*. T: testigo: sin extracto, 1/2 CMI: 1000 µg/mL, CMI: 2000 µg/mL, CMB: 4000 µg/mL. *Significancia de CMB. $\alpha=0.05$

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*.

Extractos										
Cepa	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.

Controles positivos				
Halos de inhibición (mm)				
Cepa	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 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 son inferiores a los de la presente investigación, donde solo se obtuvieron para el extracto de hexano de la semilla: CMI > 3000 µg / 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 µg / 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 µg / 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., Adetunji, 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 Research*, 14(1), 63–68. <https://cutt.ly/Pl2ii3c>
- Ávalos, G. A., & Pérez, E. C. (2009). Metabolismo secundario de planta. *Serie Fisiología Vegetal.*, 2(3), 119–145. <https://cutt.ly/ll2iLbA>
- 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/F12pWi9>
- 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/DI2kkK0>
- 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 wildlly 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/YI0wSrb>
- 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/OI1trI0>
- 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 Ocotepec, 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/Gl0uuH1>
- Scruse, 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/Ql1k1Re>
- Sierra, M., Barros, R., Gómez, D., Mejía, A., & Suárez, D. (2018). *Productos naturales: Metabolitos secundarios y aceites esenciales*. UNIAGRARIA. <https://cutt.ly/7lueIzL>
- 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/il1hWOH>
- 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>