

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA



***"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS
SECUNDARIOS EN ACACIA CONFUSA CON ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA Y ANTINOCICEPTIVA"***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:
Q.F.B. LINETTE GODOY ARECHIGA

DIRECTOR DE TESIS
DR. JOSÉ DE JESÚS MANRÍQUEZ TORRES

CO-DIRECTORA DE TESIS
DRA. ANA LAURA MARTÍNEZ MARTÍNEZ

TIJUANA, B.C., MÉXICO

NOVIEMBRE, 2023

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN ACACIA CONFUSA CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTINOCICEPTIVA"

Se permite el uso académico de información contenida en esta tesis, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente al autor. Para la reproducción parcial o total de este documento con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de las autoridades que avalan esta tesis.

Dra. Susana González Reyes

RESPONSABLE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS

Dra. Julieta Yadira Islas Limón

DIRECTORA DE LA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA

Dr. Carlos José Martín Vera Hernández

SUB-DIRECTOR DE LA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme permitido terminar una etapa muy importante en mi vida profesional, y haber puesto grandes bendiciones en mi camino.

A mi madre y hermana, por ser un pilar importante en mi vida, que siempre han estado conmigo y me han brindado su apoyo y soporte emocional, sin ustedes nada hubiera sido posible, las quiero mucho.

Al Dr. José de Jesus Manríquez por dirigir esta investigación, por compartir sus conocimientos y brindarme su apoyo y consejos en todo momento.

Al Dr. Román Chavez por haberme instruido en el mundo de la investigación y siempre brindarme su apoyo en todo momento.

Al Dr. Martín Torres por abrirme las puertas de su laboratorio y estar pendiente de mi durante el transcurso de mi estancia. De igual manera agradezco a la Dra Ana Laura por su apoyo en el transcurso de esta investigación.

A Conacyt por haberme brindado la beca número 1144222 y poder realizar esta investigación.

RESUMEN

Se determinó la actividad antibacteriana y antinociceptiva de los extractos de hexano, AcOEt y MeOH de las flores, hojas y tallos de *Acacia confusa*.

La prueba de actividad antibacteriana se realizó contra una bacteria gram negativa, una bacteria gram positiva y dos hongos de interés clínico utilizando el método de difusión en agar. Los extractos presentaron actividad similar a los controles positivos utilizados a una concentración de 100mg/mL.

La prueba de actividad antinociceptiva se realizó mediante la prueba de la formalina en ratas Wistar con un peso de 200 a 280 g, evaluándose los extractos de Hexano, MeOH y AcOEt en comparación con el grupo control de solución salina. Los resultados fueron expresados como la media $\pm$ el error estándar de la media para cada grupo. Para realizar la comparación se utilizó la prueba de Dunnett. Al analizar las ABC de cada grupo estudiado, el extracto de AcOEt de las hojas y el de AcOEt de flores fueron los que tuvieron ABC menores, lo cual fueron los candidatos a purificación e identificación de metabolitos secundarios.

La purificación del extracto de AcOEt de hojas se realizó mediante cromatografía en capa fina y cromatografía en columna utilizando distintos solventes de polaridad ascendente. La identificación química se realizó mediante RMN de una y dos dimensiones y comparación bibliográfica. Se determinó la estructura química de un producto natural nuevo llamado: 28-acetoxi-3-O-p-cumaril- β -amirina a la cual se le atribuye la posible actividad antibacteriana y antinociceptiva del extracto y cuyo estudio fundamenta su uso en la medicina tradicional.

ABSTRACT

The antibacterial and antinociceptive activity of hexane, AcOEt and MeOH extracts of the flowers, leaves and stems of *Acacia confusa* was determined.

The antibacterial activity test was performed against one gram-negative bacterium, one gram-positive bacterium and two fungi of clinical interest using the agar diffusion method. The extracts showed similar activity to the positive controls used at a concentration of 100 mg/ml.

The antinociceptive activity test was performed using the formalin test in Wistar rats weighing 200-280 g, evaluating the hexane, MeOH and AcOEt extracts in comparison with a saline control group. The results were expressed as the mean ($\pm$ standard deviation) of each group. Comparison was performed using Dunnett's test. When analyzing the ABCs of each group studied, the AcOEt extract from leaves and the AcOEt extract from flowers had the lowest ABCs, which were the candidates for purification and identification of secondary metabolites.

Purification of leaf AcOEt extract was performed by thin layer chromatography and column chromatography using different solvents of ascending polarity. Chemical identification was performed with one- and two-dimensional NMR and literature comparison. The chemical structure of a new natural product called: 28-acetoxy-3-O-p-coumaryl- β -amyrin was determined, to which the possible antibacterial and antinociceptive activity of the extract is attributed and whose study supports its use in traditional medicine.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
ÍNDICE	6
1. INTRODUCCIÓN	10
2. ANTECEDENTES	11
2.1 MEDICINA TRADICIONAL	11
2.2 METABOLITOS SECUNDARIOS	12
2.3 METABOLITOS SECUNDARIOS IDENTIFICADOS EN EXTRACTOS DE <i>ACACIA CONFUSA</i>	13
2.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y EL USO DE PRODUCTOS NATURALES.	15
2.5 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL GÉNERO <i>ACACIA</i> .	15
2.6 FITOQUÍMICOS Y METABOLITOS SECUNDARIOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN EL GÉNERO <i>ACACIA</i>	19
2.7 EFECTO ANTINOCICEPTIVO Y EL USO DE LA MEDICINA TRADICIONAL	20
2.8 FITOQUÍMICOS Y METABOLITOS SECUNDARIOS DE DISTINTAS ESPECIES CON ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA	21
2.9 ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA EN EL GÉNERO <i>ACACIA</i>	22
2.10 GÉNERO <i>ACACIA</i>	22
2.10.1 Corteza	23
2.10.2 Hojas y Filoides	23
2.10.3 Espinas	23
2.10.4 Estípulas	24
2.10.5 Flores	24
2.10.6 Frutos	25
2.10.7 Semillas	25
2.10.8 Desarrollo Floral	25
2.11 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE <i>ACACIA CONFUSA</i>	25
2.11.1 Distribución geográfica género <i>Acacia</i>	26
2.11.2 Distribución de <i>Acacia confusa</i>	27
3. OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GENERAL:	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	28
4. JUSTIFICACIÓN	29
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
5.1 COLECTA E IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE	31
5.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS	31
5.3 EVALUACIÓN ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS	32
5.3.1 Bacterias de prueba	32
5.3.2 Preparación de los medios de cultivo	33

5.3.3 Activación de las cepas	33
5.3.4 Preparación de la muestra	33
5.3.5 Inoculación de las placas	34
5.3.6 Formación de los pocillos	34
5.3.7 Sembrado de las muestras	34
5.3.8 Incubación	35
5.3.9 Interpretación de los resultados	35
5.3.10 Resultados de actividad antibacteriana	35
5.4 EVALUACIÓN ANTINOCICEPTIVA DE LOS EXTRACTOS DE <i>ACACIA CONFUSA</i> .	37
5.4.1 Tratamiento del extracto	37
5.4.2 Animales	37
5.4.3 Efecto antinociceptivo	37
5.4.4 Actividad antinociceptiva	38
5.4.5 Evaluación de la actividad antinociceptiva en extractos hexánicos de <i>Acacia confusa</i>	39
5.4.6 Evaluación de la actividad antinociceptiva en extractos de Acetato de etilo de <i>Acacia confusa</i>	40
5.4.7. Actividad antinociceptiva en extractos de metanólicos de <i>Acacia confusa</i>	42
5.5 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS EXTRACTOS DE <i>ACACIA CONFUSA</i>	45
5.5.1 Cromatografía en capa fina	45
5.5.2 Cromatografía en columna (Flash)	46
5.6 PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN EL EXTRACTO DE ACOET HOJAS DE <i>ACACIA CONFUSA</i>	47
6. CONCLUSIONES	51
7. EXPERIMENTAL	52
8. REFERENCIAS	53

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1. Polifenoles de *Acacia confusa*

Figura 2. Estructura química de berberina

Figura 3. *Acacia confusa*

Figura 4. Distribución geográfica del género *Acacia* en baja california

Figura 5. Flujograma de la metodología.

Figura 6. Tallos, flores y hojas en proceso de maceración.

Figura 7. Sembrado de las muestras

Figura 8. Medición de halo de inhibición

Figura 9. Caja de Petri con siembra masiva de *Cándida albicans*

Figura 10. Caja de Petri con siembra masiva de *Cryptococcus neoformans*

Figura 11. Prueba de la formalina.

Figura 12. 28-acetoxi-3-O-*p*-cumaril- β -amirina.

Figura 13. Espectro de RMN de ^1H del 28-acetoxi-3-O-*p*-cumaril- β -amirina

Figura 14. Espectro de RMN de ATP del 28-acetoxi-3-O-*p*-cumaril- β -amirina.

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1. Metabolitos secundarios aislados en *Acacia confusa*

Tabla 2. Metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana aislados en el género *Acacia*

Tabla 3. Fitoquímicos y Metabolitos secundarios con actividad antinociceptiva

Tabla 4. Rendimiento de los extractos de *Acacia confusa*

Tabla 5. Actividad antimicrobiana de los extractos de *Acacia confusa*

ÍNDICE DE GRÁFICAS:

Gráfica 1. Comparación del grupo control contra los grupos de hexano flores (azul) y hexano hojas (naranja) durante las dos fases del experimento.

Gráfica 2. Gráfica de área bajo la curva en comparación del grupo control contra los grupos de hexano flores (azul) y hexano hojas (naranja) durante la primera fase del experimento 0-10 minutos.

Gráfica 3. Gráfica de área bajo la curva en comparación del grupo control contra los grupos de hexano flores (azul) y hexano hojas (naranja) durante la segunda fase del experimento 10-60 minutos.

Gráfica 4. Comparación del grupo control contra los grupos de AcOEt flores (azul) y hexano hojas (naranja) durante las dos fases del experimento.

Gráfica 5. Gráfica de área bajo la curva en comparación del grupo control contra los grupos de hexano flores (azul) y hexano hojas (naranja) durante la primera fase del experimento 0-10 minutos.

Gráfica 6. Gráfica de área bajo la curva en comparación del grupo control contra los grupos de hexano flores (azul) y hexano hojas (naranja) durante la segunda fase del experimento 10-60 minutos.

Gráfica 7. Comparación del grupo control contra los grupos de MeOH flores (azul), MeOH hojas (naranja) y MeOH tallos (verde) durante las dos fases del experimento

Gráfica 8. Gráfica de área bajo la curva en comparación del grupo control contra los grupos de MeOH flores (azul), MeOH hojas (naranja) y MeOH tallos (verde) durante la primera fase del experimento 0-10 minutos.

Gráfica 9. Gráfica de área bajo la curva en comparación del grupo control contra los grupos de hexano flores (azul) y hexano hojas (naranja) durante la segunda fase del experimento 10-60 minutos.

Gráfica 10. Comparación del grupo control contra los grupos de AcOEt flores (azul), MeOH hojas (naranja) y MeOH tallos (verde) durante las dos fases del experimento.

Gráfica 11. Gráfica de área bajo la curva en comparación del grupo control contra los grupos de AcOEt flores (azul), MeOH hojas (naranja) y MeOH tallos (verde) durante la segunda fase del experimento 10-60 minutos.

1. INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional es la forma más antigua de asistencia primaria a través de la utilización de plantas y extractos con valor terapéutico (Cruz, 2016). Estas alternativas en el tratamiento son reconocidas hoy como un recurso fundamental para la salud, y forman parte de la cosmovisión de pueblos indígenas en el conocimiento sobre el uso de plantas medicinales, dado que en México tenemos más de 60 pueblos indígenas que representan un 10% aproximado de la población total, hace que sea un país reconocido como multiétnico y pluricultural, en el cual la medicina tradicional es un fenómeno de la cultura nacional con características propias y autosustentable (Jiménez Silva, 2017). Las plantas utilizadas por estos pueblos indígenas contienen numerosos compuestos orgánicos denominados “metabolitos secundarios”, los cuales no intervienen directamente en su metabolismo, o al menos no se conoce con profundidad su función en la planta y se asume que se emplean como mecanismo de defensa (Garcia Adrian, 2021) .

Estos compuestos pertenecen a diferentes grupos como son: aceites esenciales, alcaloides, cumarinas, esteroides, fenoles, flavonoides, glucósidos, gomas, iridoides, líganos, mucílagos, pectinas, quinonas, saponinas, taninos y terpenos, entre otros (Ávalos García et al., 2009) a los cuales se les atribuye propiedades curativas (Nicolás et al., 2017).

Estas plantas que contienen dichos compuestos o metabolitos secundarios son usadas principalmente para aliviar afecciones primarias como: diarrea, vómitos, dolor de estómago, fiebre, mareos, entre otras (De La Cruz & Dixon, 2012).

Actualmente se busca estudiar a mayor profundidad los extractos de distintas especies vegetales debido a que tienen un alto potencial y las actividades biológicas que puedan poseer suelen ser prometedoras; tal es el caso de los extractos de *Verbena officinalis* y su actividad antinociceptiva (Plata Rivera et al., 2022) y los extractos de *Malva sylvestris* que poseen actividad antimicrobiana (Cantaro Guzman & Pachas Lugo, 2023) o incluso agregando nanotecnología a la prueba de estos extractos, como es el caso de las nanopartículas cargadas con el extractos de *Ilex guayusa* con actividad antimicrobiana (Pinedo Delgado, 2022).

El género de *Acacia* ha sido estudiado ampliamente en el cual se ha encontrado la presencia de metabolitos secundarios con efecto antimicrobiano y antinociceptivo (Martínez Valencia, 2021)(Cavazos et al., 2021).

Los metabolitos secundarios de *Acacia confusa* han sido poco estudiados y los estudios con los que cuenta han sido en regiones endémicas como Taiwán donde se han reportado diversas actividades biológicas como la capacidad antioxidante, hepatoprotectora, antihiperuricemiante, inmunorreguladora y actividad contra el virus de hepatitis C, entre otras (Yu-Tang et al., 2009).

El ambiente en donde se rodea la planta influye en la producción de metabolitos secundarios debido que al estar sometida a distintas condiciones como lo son la temperatura, plagas, altitud, luz, entre otras, provoca la producción de estos compuestos como un mecanismo de defensa (Sepúlveda Jiménez et al., 2003). Es por ello que se enfatizó el estudio de esta especie en otro punto de recolección diferente al de la literatura citada.

Este trabajo fue realizado con la finalidad de evaluar la actividad antibacteriana y antinociceptiva de los extractos de *Acacia confusa* cuya especie fue recolectada en la ciudad de Tijuana B.C. y así mismo contribuir con la identificación química de dichos compuestos responsables de ambas actividades biológicas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Medicina Tradicional

La medicina tradicional es una herramienta importante la cual es subestimada en la atención de padecimientos primarios practicándose todos los días, en casi todos los países del mundo su demanda aumenta con el paso del tiempo (Cruz, 2016). Estas especies utilizadas (que pueden estar basadas en plantas, animales y/o minerales) en terapias espirituales, técnicas manuales y ejercicios aplicados de forma individual o en combinación para mantener el bienestar, además de tratar, diagnosticar y prevenir las enfermedades, deben tener seguridad y eficacia comprobadas para que contribuyan a asegurar el acceso de todas las personas a la salud (Cruz, 2016). Muchos países reconocen actualmente la necesidad de elaborar un enfoque coherente e integral de la atención a la salud, que facilite a todos los usuarios el acceso a la medicina tradicional de manera segura, respetuosa, asequible y efectiva (OMS, 2014).

El reino vegetal posee muchas especies de plantas que contienen sustancias de valor medicinal y un gran número de ellas son ensayadas constantemente respecto a su posible valor preventivo y curativo (Alvarez Quiroz et al., 2017). Es importante destacar que también reciben la denominación de productos naturales y tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica (Velázquez Vázquez et al., 2019).

2.2 Metabolitos Secundarios

Los organismos están en constante cambio y adaptación al ambiente, estos son fábricas químicas vivientes para la biosíntesis de una gran variedad de metabolitos secundarios y de hecho, son estos metabolitos los que forman la base de muchas drogas farmacéuticas comerciales, así como remedios herbales derivados de plantas medicinales (Li et al., 2020). Los diferentes componentes químicos de las plantas medicinales poseen actividades biológicas que pueden mejorar la salud humana a través de las industrias farmacéutica y alimentaria, pero también representan un valor importante en las industrias de perfumería, agroquímica y

cosmética (Rasool Hassan, 2012). Muchos metabolitos secundarios, como los alcaloides, los terpenoides y los fenilpropanoides, se están considerando para el desarrollo de fármacos (Sanchita & Sharma, 2018).

La síntesis activa de metabolitos secundarios es inducida por la planta al exponerse a estrés ambiental, como el ataque de organismos herbívoros, fitopatógenos, alta densidad vegetal, competencia con otros organismos por nutrientes, falta o exceso de luz o cualquier otro tipo de condición que provoque un estado de estrés o tensión en la planta (Pagán & García, 2020). Las sustancias químicas que producen las plantas como defensa son muy variadas y poseen diferentes funciones como la inhibición de agentes patógenos y evitar su ataque u ocasionando efectos negativos a distintos niveles del organismo siendo algunos compuestos químicos producidos: saponinas, compuestos fenólicos que incluyen los ácidos fenólicos y polímeros complejos como los taninos y la lignina. Estos fitoquímicos tienen la capacidad de provocar efectos farmacológicos, toxicológicos, bactericidas o bacteriostáticos (Camacho Escobar et al., 2020).

2.3 Metabolitos secundarios identificados en extractos de *Acacia confusa*

Diversas investigaciones sobre metabolitos secundarios contenidos en extractos de *Acacia confusa* han permitido el aislamiento de derivados fenólicos y flavonoides de diferentes partes de la planta. Se han obtenido a la fecha un aproximado de 55 compuestos, incluidos 13 derivados fenólicos, 3 derivados del ácido cafeico, 21 flavonoides, 13 glucósidos de flavonoides, 1 lignano y 4 alcaloides, aislados de los extractos de diferentes partes vegetales de *Acacia confusa*. Los extractos de hojas, ramas, flores y capullos contienen glucósidos de flavonol, algunos flavonoides y derivados fenólicos (Lin et al., 2018). En la Tabla 1 están enlistados algunos de los metabolitos encontrados en las diferentes partes de *A. confusa*.

Tabla 1. Metabolitos secundarios aislados en *Acacia confusa* (Lin et al., 2018).

Parte de <i>Acacia confusa</i>	Metabolitos encontrados
Madera	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico, éster metílico del ácido 3,4 dihidroxibenzóico, éster etílico del ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido 3-hidroxi-4 metoxibenzoico, 4'-pentahidroxi flavanona, 7,3,4'-trihidroxiflavona, 7,8,3,4'-tetrahidroxiflavona, 4'-trihidroxi-3-O-metilflavonol, melanoxetina, transilitina, 4'-O-metilmelanoxetina, 4'-O-metiltransilitina, okanin.
Corteza	4-hidroxibenzoico, éster etílico del ácido 4-hidroxibenzoico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, éster metílico del ácido 3,4-dihidroxibenzoico, 3,4- éster etílico del ácido dihidroxibenzoico, éster butílico del ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido 3-hidroxi-4-metoxibenzoico, ácido 4 hidroxi-3-metoxibenzoico, 4-hidroxi-3,Ácido 5-dimetoxibenzoico, éster etílico del ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico, ácido gálico, éster etílico del ácido gálico, ácido 3,4-dihidroxi- <i>trans</i> -cinámico, éster etílico del ácido 3,4-dihidroxi- <i>trans</i> -cinámico,3,4-dihydroxy- <i>trans</i> cinámico, ácido pentil éster, lyoniresinol.
Ramas	Catequina, epicatequina ,catequina-3-O- α -ramnopiranósido, quercetina-3-O- α -ramnopiranósido, luteolina, miricetina-3-O- β -glucopiranósido, miricetina-3-O- α -ramnopiranósido, miricetina-3-O-(2"-O-galloil) y α -ramnopiranósido.
Hojas	Quercitrina, isomiricetina, miricitrina, 7-O-metilmiricitrina, miricetina-3-O-(2"-O-galloil)- α -ramnopiranósido, miricetin-3-O- (2"-O-galloil) α -ramnopiranósido-7-metil éter, miricetin-3-O- (3 "-O-galloil) - α -ramnopiranósido-7-metil éter (50) y miricetin-3-O- (2", 3 "-di-O-galloil) - α -ramnopiranósido, catequina, epicatequina, luteolina, miricetina, 3-O-metilmiricetina, europetina, ácido gálico y éster metílico del ácido gálico.
Flores y Capullos	Ácido gálico, afzelina, quercitrina, ramnetina-3-O- α -glucopiranósido (quercetina-3-O- α -glucopiranósido-7-O-metiléter), ramnitrina, miricitrina, 7-O-metilmiricitrina.

A continuación, se muestran las estructuras químicas de algunos metabolitos secundarios aislados en *Acacia confusa*:

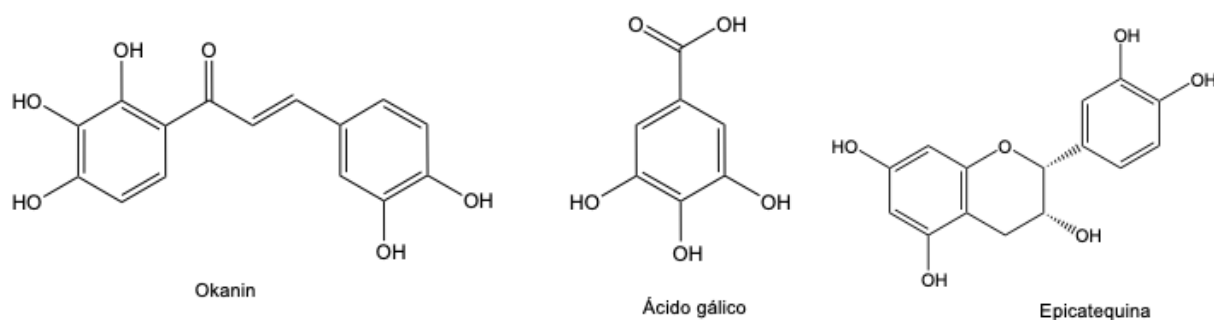


Figura 1. Polifenoles de *Acacia confusa*.

2.4 Actividad antimicrobiana y el uso de productos naturales.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) define a un antimicrobiano como aquel medicamento que es utilizado para prevenir o tratar infecciones en los seres humanos, animales y plantas. Si bien la OMS en conjunto de otras organizaciones como la Comunidad Andina de Naciones y la Universidad Nacional de Colombia establecen que pueden diseñarse nuevas alternativas de tratamientos mediante bioprospección y así aprovechar los recursos naturales como lo son las plantas formulando nuevos compuestos antimicrobianos y poder beneficiar al sector salud en el aspecto costo/beneficio comparado a utilizar antimicrobianos conocidos de origen sintético (Nicolás et al., 2017).

2.5 Actividad antimicrobiana del género *Acacia*.

En distintas especies del género *Acacia* se ha encontrado que sus extractos poseen actividad inhibitoria del crecimiento de algunos microorganismos lo cual nos da una pauta para investigar si los extractos de *Acacia confusa* poseen esta actividad, como lo son los extractos de hexano, AcOEt y MeOH de flores, hojas y tallos de *Acacia cochliacantha*, los cuales presentan actividad similar o más alta que los antibióticos estándar y las bacterias con mayor sensibilidad ante estos extractos fueron *B. subtilis* y *S. aureus* (Manríquez Torres, 2007).

Otro estudio reveló que los extractos de *Acacia auricoliformis* han presentado actividad antibacteriana con concentraciones menores a las reportadas para inhibir el crecimiento de *B. megaterium*, *S. typhimurium* y *P. aeruginosa* (Mandal et al., 2005).

El autor Arias reportó en el año 2004 la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de *Acacia aroma* frente a algunas bacterias gram positivas como *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212 y bacterias gram negativas como: *E. coli*., *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *E. cloacae*, *M. morgani*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 (Arias et al., 2004). También se ha reportado que otra especie de este género como lo es *Acacia catechu* tiene propiedades antimicrobianas contra seis microorganismos patógenos como lo son *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. typhi*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* (Negi et al. 2010).

Así como para las especies mencionadas anteriormente, también existen reportes para la actividad antimicrobiana de la especie *Acacia arabica* contra las cepas *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *S. typhi*, *S. flexneri*, *S. Paratyphi*, *S. typhimurium*, *P. Aeruginosa* y *E. aerogenes* en el año de 2009. (Tambekar et al., 2009).

Otro estudio demostró que los extractos de *Acacia rigidula* son eficaces frente a bacterias gram negativas y positivas como: *P. alcalifaciens*, *P. aeruginosa*, *Y. enterocolitica* y *E. coli*; *S. aureus* y *E. faecalis* respectivamente (Cavazos et al., 2021a)

Acacia nilotica otra especie del género *Acacia* también conocida como goma arábica también mostró actividad antimicrobiana frente a tres bacterias: *E. coli*, *S. aureus* y *S. Typhi* siendo el extracto de las vainas el más potente frente a *E. coli* (Saini et al., 2008a).

Otro estudio demostró que los metabolitos (20S)-oxolupano-30-al, (20R)-oxolupano-30-al y ácido betulínico aislados de la corteza de los tallos de *Acacia mellifera* presentan actividad antimicrobiana frente a distintos microorganismos, como lo es *S. aureus* ATCC 25923 (Mutai, Bii, Rukunga, et al., 2009).

Un estudio reciente nos muestra que los extractos de etanol y cloroformo de las hojas de *Acacia mearnsii* mostraron actividad antibacteriana contra *P. aeruginosa* y *E. faecalis* (Ntshanka et al., 2020a).

En otro estudio se aisló de la corteza de *Acacia ataxacantha* el metabolito ácido betulínico-3- *trans* -cafeato y se evaluó su actividad frente a distintas bacterias mostrando eficacia contra ante *S. aureus* y *P. Aeruginosa* (Amoussa et al., 2016).

El extracto metanólico de la corteza de *Acacia polyacantha* mostró actividad antibacteriana contra *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* y *P. Aeruginosa* (Daffalla et al., 2018b).

El extracto metanólico de los tallos de *Acacia caesia* presentó una actividad antibacteriana similar a la del antibiótico usado como grupo control frente a las cepas *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923) y *P. aeruginosa* (ATCC 27853) (Ashwini et al., 2021a).

Los extractos de la corteza de tallos de *Acacia senegal* presentaron actividad antibacteriana frente a *S. aureus*, *E. coli*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *S. typhi* y *S. dysenteriae* (Okoro et al., 2012a).

Los extractos de *Acacia bivenosa* mostraron actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *S. pyogenes* (Pennacchio et al., 2005).

Otro estudio evaluó la actividad antibacteriana de los extractos de raíces y hojas de *Acacia karoo* los cuales demostraron efectividad contra distintas cepas bacterianas como: *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*, *K.pneumoniae*, *P. vulgaris* y *B. subtilis* (Priyanka et al., 2015).

Los extractos de hojas de *Acacia galpinii*, *Acacia karroo*, *Acacia xanthophloea* y *Acacia sieberiana* presentaron actividad antibacteriana contra *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 27853 siendo el de *A. xanthophloea* el más activo y el de *A. galpinii* con menor actividad (Katerere & Eloff, 2004).

Los extractos etanólicos de hojas de *A. kempeana* y *A. tetragonophylla* fueron evaluados frente a diversas especies bacterianas pero solo presentaron sensibilidad frente a *B. cereus* ATCC 11778, *E. faecalis* ATCC 19433 (Palombo & Semple, 2001).

El extracto metanólico de las hojas de *Acacia saligna* demostró una actividad antibacteriana frente a las siguientes cepas bacterianas: *Listeria monocytogenes* (aislado clínico), *E. coli* ATCC 35210, *S. aureus* ATCC 6538, *B. cereus* ATCC 14579, *Micrococcus flavus* ATCC 10240 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Elansary et al., 2020a).

El extracto metanólico de la corteza de *Acacia seyal* mostró actividad antibacteriana contra *S. aureus*, *C. urealyticum* y *P. aeruginosa* (Elmi et al., 2020a).

El extracto crudo de la corteza de los tallos de *Acacia macrostachya* presentó actividad antibacteriana contra *E. coli*, mientras que los extractos con los solventes éter de petróleo, etanol y metanol no presentaron actividad antibacteriana (Barfour et al., 2021a).

Los extractos de *A. arábica* y *A. raddiana* presentaron actividad antifúngica contra *C. albicans* y *A. niger* (Tissouras et al., 2014a).

En la literatura se demuestra que más especies del género *Acacia* presentan actividad antibacteriana y antifúngica como: *Acacia salicina*, *Acacia jacquemontii*, *Acacia mangium*, *Acacia tortilis*, *Acacia ampliceps*, *Acacia concinna*, *Acacia robusta*, entre otras. En general, el género *Acacia* posee una actividad antimicrobiana de moderada a alta por lo cual este género puede explorarse más a

fondo para estudios farmacológicos que permitan producir agentes antimicrobianos potentes de origen natural (Adhikari Deeksha et al., 2023).

2.6 Fitoquímicos y metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana en el género *Acacia*

El género *Acacia* contiene varias sustancias bioactivas, incluidos los alcaloides (fenetilamina, anfetamina, candicina, mescalina, tricocereína y hordenina); glucósidos cianogénicos (linamarina, procacipetalina, heterodendrina, prunasina, sambunigrina y lotaustralina); flavonoides (epicatequina, robinetinidol, fasciculiferina, melacacidina, galangina, miricetina, crisina y apigenina); terpenoides (acacigenina); compuestos fenólicos (ácido elágico, ácido ferúlico y ácido gálico) y taninos (galotanino). Durante las últimas décadas se han encontrado más de 100 compuestos activos en el género cuyos compuestos están presentes principalmente en las vainas, raíz, corteza y hojas de los arbustos de *Acacia* (Adhikari Deeksha & Rangra Naresh Kumar, 2023).

En secciones anteriores se mencionaron algunas de las distintas especies de *Acacia* con actividad antimicrobiana. A continuación en la siguiente tabla se enlistan algunos metabolitos secundarios y fitoquímicos encontrados en este género que poseen actividad antimicrobiana.

Tabla 2. Metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana aislados en el género *Acacia*.

Especie de <i>Acacia</i>	Metabolitos secundarios
<i>Acacia arábica</i>	Glucósidos cardíacos, flavonoides, alcaloides, taninos y fenoles. (Tissouras et al., 2014).
<i>Acacia raddiana</i>	Saponinas, triterpenos, alcaloides, flavonoides y taninos. (Tambekar et al., 2009).
<i>Acacia ataxacantha</i>	Lupeol, ácido betulínico, ácido-3-trans-cafeate (Amoussa et al., 2016).
<i>Acacia auricoliformis</i>	Saponinas (Mandal et al., 2005).
<i>Acacia caesia</i>	Terpenos, fenoles, alcaloides, ácidos grasos (Ashwini et al., 2021).
<i>Acacia macrostachya</i>	Taninos, flavonoides, triterpenos, fitoesteroides, cumarinas y saponinas. Estigmaesterol (Barfour et al., 2021b)

<i>Acacia mearnsii</i>	Fenoles, flavonoides, taninos y saponinas (Ntshanka et al., 2020)
<i>Acacia mellifera</i>	Triterpenos como: (20S)-oxolupano-30- al, (20R)-oxolupano-30-al y ácido betulínico (Mutai, Bii, Vagias, et al., 2009)
<i>Acacia nilotica</i>	Alcaloides, flavonoides, taninos y saponinas (Saini et al., 2008b)
<i>Acacia polyacantha</i>	Taninos, saponinas, esteroides, flavonoides, alcaloides y cumarinas (Daffalla et al., 2018a)
<i>Acacia rigidula</i>	Flavonoides, saponinas, terpenos y taninos (Cavazos et al., 2021b)
<i>Acacia berlandieri</i>	Flavonoides, saponinas, terpenos y taninos
<i>Acacia senegal</i>	Taninos, saponinas y esteroides (Okoro et al., 2012b)
<i>Acacia saligna</i>	Rutina, hiperósido, Miquelianina, ácido gálico, y ácido p-cumarico. <i>El ácido p-cumarico se asocia a una fuerte actividad antifúngica.</i> (Elansary et al., 2020b)
<i>Acacia seyal</i>	Catequina, epicatequina, lupeol, campesterol, estigmasterol, clionasterol, oleamida (Elmi et al., 2020b)
<i>Acacia farneaciana</i>	Flavonoides (Santander Ingrid, 2018)

2.7 Efecto antinociceptivo y el uso de la medicina tradicional

Existen diferentes tipos de dolor, en esta investigación nos centramos en el dolor nociceptivo, que también es conocido como dolor fisiológico. Este es producido ante una lesión en un tejido no neuronal activando nociceptores como consecuencia. Así como las plantas producen metabolitos secundarios como defensa, nuestro cuerpo hace lo mismo produciendo este tipo de dolor como un mecanismo de protección para mantener la integridad de nuestro cuerpo. Esto se debe al activar nociceptores de alto umbral que solo se activan ante estímulos nocivos. El dolor nociceptivo suele ser adaptativo provocando respuestas del sistema endocrino y del sistema autónomo que generan conductas de protección, posturas de resguardo, alerta, respuestas de retirada o huida entre otras (Rodríguez Gil, 2021).

El proceso neuronal de una señal nociceptiva inicia con la transducción donde el estímulo nociceptivo es convertido en una señal eléctrica en los nociceptores (Wilfredo & Piérola, 2007). La nocicepción involucra la activación de los

nociceptores y comprende los procesos de transducción, conducción, transmisión y percepción (Woolf, 2004):

1. La transducción es la conversión de los estímulos nocivos térmicos, químicos y mecánicos en actividad eléctrica por las terminales de las fibras aferentes periféricas (nociceptores). Los estímulos nocivos son transformados en actividad eléctrica por los receptores de potencial transitorio (TRP, del inglés transient receptor potential) y los canales purinérgicos, esta actividad eléctrica es amplificada por canales de sodio que inducen potenciales de acción (Kuner, 2010).

2. La conducción es el paso de los potenciales de acción desde la terminal periférica a lo largo de los axones hasta la terminal central de los nociceptores en el sistema nervioso central (SNC). Las fibras aferentes nociceptivas llevan esta información periférica a través de sinapsis glutamatérgicas hasta neuronas de segundo orden principalmente en las láminas superficiales I y II del asta dorsal de la médula espinal (Kuner, 2010).

3. La transmisión es la transferencia sináptica de la información sensorial desde las fibras primarias a través del asta dorsal de la médula espinal, hasta estructuras cerebrales. En el asta dorsal de la médula espinal ocurre la integración y el procesamiento de la información sensorial entrante, mientras que la información sensorial saliente de las redes espinales es enviada a través de diferentes vías a sitios de proyección en el cerebro. Por ejemplo, el tracto espinotálmico lateral proyecta información sensorial multimodal de neuronas de amplio espectro dinámico (WRD, del inglés wide dynamic range) hacia el tálamo lateral y ha sido involucrado en el procesamiento del aspecto sensorial y discriminativo del dolor. En contraste, el tracto medial espinotálmico y el tracto espinoparabraquial proyectan al tálamo medial y estructuras límbicas, las cuales se cree median el componente emocional y aversivo del dolor (Kuner, 2010).

4. La percepción se refiere al proceso por el cual los procesos anteriores interaccionan con la psique del individuo, para crear la experiencia emocional y; como tal subjetiva que se percibe como dolor (Rang y col., 1994; Woolf, 2004).

La experiencia dolorosa es percibida en la corteza, en consecuencia la información es enviada a la médula espinal para producir que un reflejo produzca el retiro del estímulo nocivo (Kuner, 2010).

El dolor se considera uno de los factores que más afecta la calidad de vida de los pacientes y entre las alternativas terapéuticas no sólo son considerados los fármacos sino también el uso de plantas medicinales. La OMS revela que las plantas siguen siendo una gran fuente para el cuidado general de la salud de la mayoría de la población mundial (González Trujano et al., 2006).

2.8 Fitoquímicos y Metabolitos secundarios de distintas especies con Actividad Antinociceptiva

En la literatura se encuentra evidencia de distintas especies vegetales que contienen fitoquímicos y metabolitos secundarios previamente identificados a los que se les atribuye tener actividad antinociceptiva. Algunos de estos ejemplos están enlistados en la siguiente tabla.

Tabla 3. Fitoquímicos y Metabolitos secundarios con actividad antinociceptiva.

Especie	Metabolitos secundarios
<i>Erythrina crista-galli</i> L.	Alcaloides (Miño Jorge et al., 2002)
<i>Solanum multifidum</i> <i>Lycianthes lycioides</i>	Alcaloides (Soto Marilu, 2014)
<i>Salvia purpurea</i>	Terpenos y compuestos fenólicos (Cuevas-Morales et al., 2022)
<i>Clusia ellipticifolia</i>	Ácido betulínico, friedelinol and friedelina (Ahmed M. et al., 2004)
<i>Berberis ruscifolia</i>	Berberina (ver figura 2) (Del Gaudio Micaela et al., 2023)
<i>Salvia microphylla</i>	Ácido rosmarínico (Ghasemzadeh Rahbardar & Mahboobeh Hosseinzadeh, 2020)
<i>Salvia lachnostachys</i>	Fruticulina (Santos et al., 2017)
<i>Salvia circinata</i>	Amarsolide A, Pedalitina (Moreno-Pérez et al., 2019)
<i>Pereskia bleo</i> Kunth	Vitexina, glucósido de β -sitosterol y β -sitosterol (Abdul-Wahab et al., 2012)

<i>Syzygium cumini</i>	Delfinidina 3-glucósido, peonidina-3,5-diglucósido, escopoletina y umbeliferona, ácido quínico, la catequina y la miricetina. (Qamar M et al., 2022)
<i>Paederia scandens</i>	Glucósidos y polisacáridos iridoides (Chu et al., 2008)

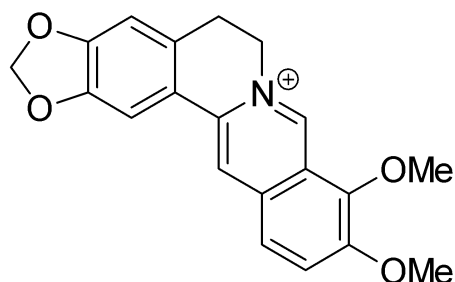


Figura 2. Estructura química de la berberina (Del Gaudio Micaela et al.,2023).

2.9 Actividad Antinociceptiva en el género *Acacia*

En el género *Acacia* no hay muchos estudios donde se evalúe el efecto antinociceptivo. En la literatura se muestra un estudio realizado en el año 2021 con la especie *Acacia farnesiana* donde sus extractos metanólicos presentaron mejor actividad que los fármacos control pero carece de estudios de caracterización donde se identifique los metabolitos responsables de dicha actividad (Martínez Valencia,2021).

En el estudio realizado por Lin y colaboradores se caracterizaron los metabolitos de las diferentes partes de *Acacia confusa* y se encontraron glicósidos de flavonoides como quercetina, isomyricetina y myricitrina, en los cuales ya se han demostrado en algunos estudios su actividad antinociceptiva (Espinosa-Juárez et al., 2017).

2.10 Género *Acacia*

Acacia es un género de arbustos y árboles de la familia *Leguminosae*, subfamilia *Mimosoideae*, compuesto por más de 1300 especies, que se distribuyen en forma natural en todos los continentes con la excepción de Europa. Más de 900 de estas especies son nativas de Australia y las restantes de las regiones tropicales secas y templadas cálidas de África, sur de Asia y América; pueden ser árboles, arbustos,

trepadoras, rara vez hierba: armados con aguijones o espinas, sus hojas bipinnadas o reducidas a filodios, presentan inflorescencias individuales que pueden ser cabezas globulares o picos cilíndricos; las inflorescencias pueden variar en color que van desde crema, amarillo oro, púrpura o rojas y muchas de estas especies están delicadamente perfumadas (Barros Asenjo, 2007). A continuación, en los siguientes párrafos se describen los órganos principales de este género.

2.10.1 Corteza

El color de la corteza en las especies americanas es variable de liso a casi blanco en *A. feddeana* Harms, de color rojizo a marrón oscuro en *A. macracantha*; existen al menos tres especies que se reconocen fácilmente por su corteza descascarada amarilla: *A. albicorticata*, *A. coulteri* y *A. willardiana* (Mendez Pérez, 2017).

2.10.2 Hojas y Filoides

En las plántulas de todas las acacias los primeros pares de hojas son pinnadas o bipinnadas; en las especies de África persiste la hoja bipinnada por ejemplo en *A. nilotica*. En muchas especies australianas las hojas se marchitan y desaparecen durante el primer año y su función es tomada en los pecíolos que se desarrollan en estructuras semejantes a hojas denominadas filoides. Cada filoide puede tener una sola vena o una serie de venas más o menos paralelas (Méndez Pérez, 2017). Los filoides consisten principalmente en pecíolos aplastados verticalmente (unas pocas especies se han aplanado horizontalmente), el raquis de las hojas verdaderas tiene glándulas pequeñas (también llamadas nectarios extraflorales) en sus lados superiores; Estas glándulas están aparentemente mejor desarrollados en América Central que en especies australianas; Los filoides varían en tamaño, miden aproximadamente 1,5 mm de largo (Barros Asenjo, 2007).

2.10.3 Espinas

No todas las especies tienen espinas, cuando están presentes, están dispersas por las partes vegetativas de la planta, las espinas son rectas, por ejemplo, en tallo viejo de *A. polyphylla* y *A. riparia* Kunth son más curvados, en *A. lacerans* son abundantes y dispuestos en filas; en algunas especies las espinas se parecen a los nódulos de

la raíz, por ejemplo en *A. picachensis* Brandegees y *A. ilioana* o en grupos de tres como en *A. purpusii*; Las especies americanas generalmente tienen espinas más pequeñas que las especies africanas y asiáticas (Mendez Pérez, 2017).

2.10.4 Estípulas

Las estípulas de *Acacia* son apéndices de la hoja y se presentan en pares y tienen tejido vascular. En el género *Acacia* las estípulas tienen espinas persistentes y evidentes; sin embargo, en algunas especies robustas, en los ganglios se encuentran pústulas lignificadas que pueden ser confundidas con estípulas espinosas, por ejemplo, las ramas maduras de *A. Picachensis* tienen pares de espinas en los nudos y también pequeñas cicatrices de las estípulas foliares decrecientes. La especie *A. choriophylla* tiene espinas anatómicamente verdaderas, aunque no se agrandan como en otras especies de *Acacia*; entonces, las estípulas van desde muy discretas hasta las espinas largas persistentes; Si una especie de *Acacia* presenta estípulas foliares llamativas, el taxón debe pertenecer al subgénero *Aculeiferum*, porque este tipo de estípula foliar no está presente en el subgénero *Acacia*; estas se extienden de un estrecho linear a ancho y tienen muchas nervaduras; por ejemplo, en *A. reniformis* , las estípulas son de 2-3 x 1.3-3.5 cm en el tamaño y tienen nervaduras múltiples fuertes (Cialdella, 1984).

2.10.5 Flores

Las flores de *Acacia* son pequeñas, regulares y generalmente hermafroditas. Básicamente cada flor contiene 4 o 5 sépalos y pétalos; Los sépalos pueden hallarse libres o unidos formando un cáliz, y los pétalos pueden estar libres o unidos formando una corola. Los estambres son numerosos y emergen desde abajo o justo arriba de la base del ovario; un estilo filiforme sobresale levemente más arriba de los estambres. El ovario es sésil o con un corto pedúnculo y su superficie externa puede ser lisa o cubierta de pelos diminutos; cada flor está sostenida por una bráctea pequeña cuya forma varía con las especies. Las *acacias* son muy conspicuas en su floración y una floración abundante indica grandes cosechas potenciales de semillas. El color de la flor se debe principalmente al color de los filamentos estaminales emergentes (Cialdella, 1984).

2.10.6 Frutos

Los frutos varían de una simple legumbre plana, recta, dehiscente, papirácea o coriácea, con un subdesarrollado endocarpo, a una fruta turgente, casi cilíndrica, septada, no dehiscente con un mesocarpo poco desarrollado. Los frutos varían en longitud, de 5-35 a 40 cm de largo en especies americanas (Mendez Pérez, 2017). Una característica de *Acacia* es la gran diversidad de sus vainas. Las vainas son en forma lineal a oblongo, plana para cilíndrica, recta o curva o retorcido en espiral, y por lo general dehiscente (Cialdella, 1984).

2.10.7 Semillas

En las especies americanas la mayoría de las semillas son de tipo ortodoxo, con un pleurograma muy desarrollado; las excepciones son *A. mikanii* Benth, *A. miersii* Benth y *A. scleroxyla* Tuss, con semillas muy planas y aladas, sin pleurograma; No se han utilizado semillas para identificar las especies, ya que muchas de ellas no se conocen maduras, especialmente en especímenes de herbario, sin embargo, el tamaño, la forma, y el pleurograma son caracteres consistentes dentro de las especies, de modo que cuando se conocen semillas de todos los taxones, las características de la semilla deben ser taxonómicamente útiles (Rico Arce, 2001).

2.10.8 Desarrollo Floral

Existen pocos estudios sobre la edad mínima en la que las acacias pueden producir flores ya que puede ocurrir entre el primer y cuarto año; En Sudáfrica en plantaciones de *A. mearnsii* las plantas comienzan a florecer a la edad de 20 meses y producir poca semilla a partir del tercer año, pero es al quinto o sexto año cuando producen grandes cantidades de semilla (FAO, 1983).

2.11 Descripción de la especie *Acacia confusa*

Acacia confusa es una planta de hoja perenne; los tallos y las raíces son increíblemente duras y extremadamente fuertes; la albura es de color amarillo pálido (ver Figura 3) y el duramen es marrón chocolate por los taninos; Los filoides son de color verde opaco, de 8 a 10 cm de largo y 10 a 15 mm de ancho, alternados de forma curvada, ligeramente engrosada, lampiña, con 3 a 5 delgadas venas paralelas

desde la base, los racimos de flores son de bolas de color amarillo brillante de aproximadamente 6 a 20 mm de diámetro que emergen de las ramitas. Los frutos (vainas) son estrechos y planos, de 5 a 10 cm de largo y 8 a 10 mm de ancho, marrón oscuro y abierto. Las semillas son como frijoles, alrededor de 5 mm de largo, con forma elíptica, de color marrón oscuro, ligeramente aplanadas y brillantes (Wei et al., 2011).



Figura 3. *Acacia confusa*.

2.11.1 Distribución geográfica género *Acacia*

El género *Acacia* es el segundo mayor de la Familia Leguminosae, con alrededor de 1,400 especies distribuidas alrededor del mundo en climas tropicales y calurosos. La mayor abundancia de especies se encuentra en Australia (1,010 especies), seguida de América (185 especies), África (150 especies) y Asia (60 especies), mientras que en Europa han sido introducidas para su cultivo. De las aproximadamente 85 especies de *Acacia* presentes en México (ver Figura 5) 35 de ellas se distribuyen en los estados fronterizos del norte, 12 en Coahuila, 12 en Nuevo León y 11 en el centro de Chihuahua. La mayoría de las especies crecen en áreas de planicie de climas áridos y conforman parte importante de los matorrales en el norte de México (Mendez Pérez, 2017).

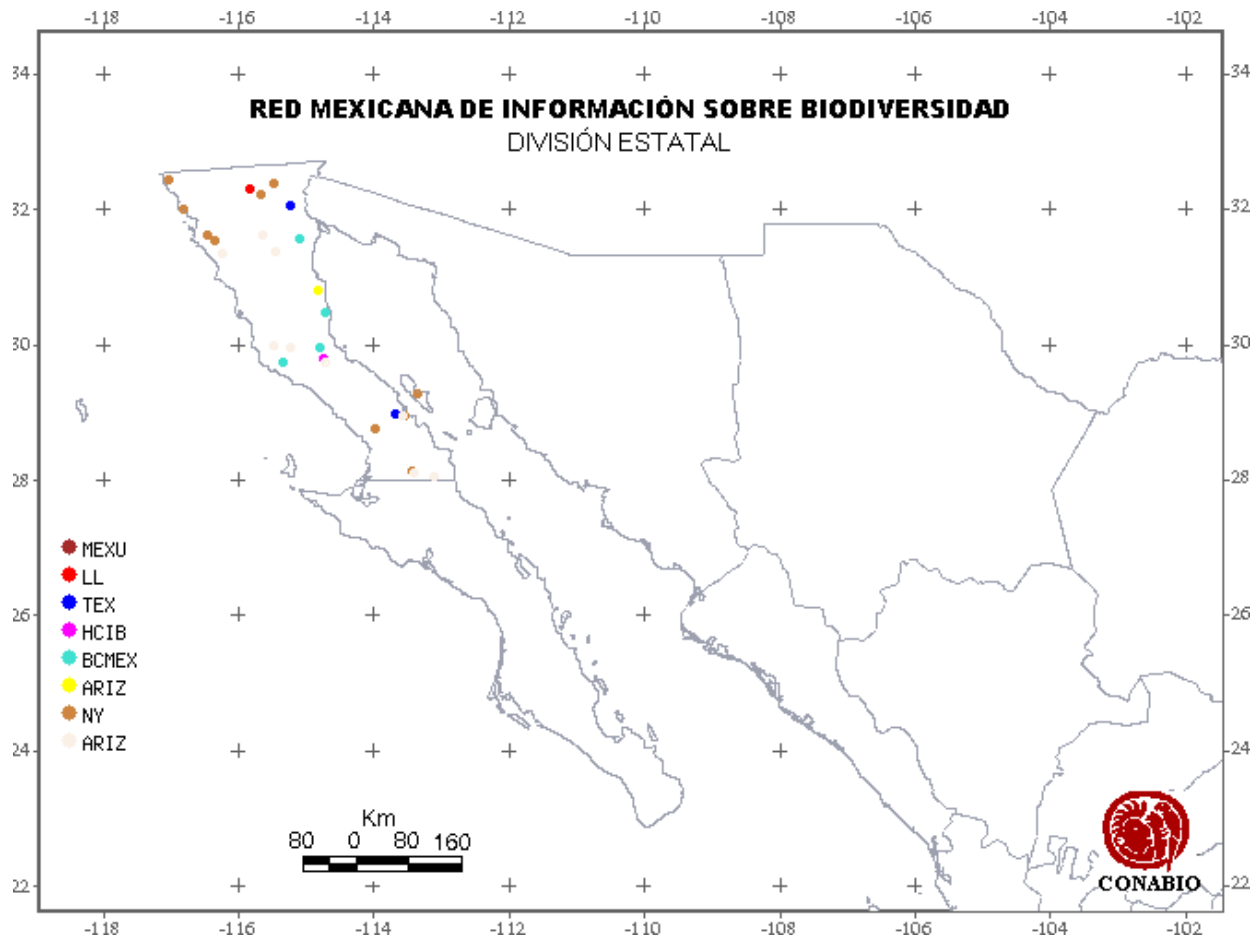


Figura 4. Distribución geográfica del género *Acacia* en baja california (CONABIO,2022). Los puntos marcados en el mapa señalan la presencia de Acacias distribuidas por todo el estado de Baja California.

2.11.2 Distribución de *Acacia confusa*

Acacia confusa (Leguminosae) es una especie endémica de Taiwán y es una de las plantas más extendidas. *A. Confusa* es una planta muy adaptable y de rápido crecimiento apta para vivir en condiciones extremas condiciones. Se puede encontrar a lo largo de la costa y el río, ligeramente en desde la marca de la marea alta; hasta los bosques templados en las alturas de montañas, pero muy por debajo de la línea de congelación; sin embargo, suele ser más común por debajo de los 1000m a las temperaturas en el rango de 20°C a 30 °C. En la naturaleza, puede crecer en los suelos con pobres valor nutricional, como arcilla dura, limo, tierra y llanuras rocosas y sierras (Wei et al., 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general: Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos de *Acacia confusa*, así como aislar los metabolitos secundarios de los extractos obtenidos mediante técnicas físicas, químicas y espectroscópicas con la finalidad de identificar a los metabolitos responsables de su actividad biológica.

3.2 Objetivos específicos:

1. Recolectar, separar y moler la especie vegetal seleccionada para este estudio, para la obtención de extractos con solventes de polaridad creciente.
2. Obtener extractos mediante maceración utilizando solventes orgánicos, hexano, acetato de etilo y metanol en hojas, tallos y flores de *Acacia confusa*.
3. Determinar la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos en las cepas *C. albicans* ATCC 14053, *E. coli* ATCC 25922, *Cryptococcus neoformans* y *Streptococcus mutans* mediante el método de multi sensidiscos de Kirby Bauer.
4. Determinar la actividad antinociceptiva de los diferentes extractos obtenidos de hoja, tallo y flor de *Acacia confusa* en la prueba de la formalina en ratas.
5. Seleccionar los extractos bioactivos que serán candidatos a separación cromatográfica.
6. Identificar los metabolitos secundarios presentes en los extractos mediante métodos físicos, químicos y espectroscópicos.

4. JUSTIFICACIÓN

Durante muchos años las plantas medicinales han sido utilizadas alrededor del mundo para tratar múltiples enfermedades. Por lo que se les consideran viables para ser estudiadas, debido a que estas pueden tener un alto potencial en la contribución de entidades farmacológicas, que pueden beneficiar a la sociedad, siempre y cuando su uso sea el adecuado. En México, se tiene una amplia variedad de especies vegetales que han permitido la utilización de especies tradicionalmente en el tratamiento de padecimientos primarios; sin embargo, muchas carecen de estudios biológicos y químicos que corroboren el efecto terapéutico, que potencialmente se les atribuye en la medicina tradicional. Debido a que acudir a los servicios de salud para ciertas localidades puede ser limitado, generar estudios químicos de las especies vegetales que utilizan las comunidades de escasos recursos o con acceso limitado a centros de salud, permite el uso seguro y correcto de la planta. Es por esto que las plantas medicinales han resultado una buena opción para la obtención de nuevas moléculas diana con potencial actividad farmacológica como lo son los estudios de la especie *Cordia dentata* (*Boraginaceae*) o conocida comúnmente como Tigüilote en donde se ha encontrado que los frutos de esta especie tienen propiedades antipirética (tratar la fiebre) y antitusivas (para tratar la tos)(Núñez et al., 2014). También es el caso de la especie *Quercus spp* o mejor conocida como bellota de la cual se han estudiado sus propiedades astringentes para combatir las diarreas debido a los taninos que posee (García Gómez & Pereira Sieso, 2013).

México al ser un país con una gran diversidad de especies tiene una gran oportunidad de realizar estudios fitoquímicos y estudios biológicos para sustentar el uso de sus especies vegetales para beneficio de sus habitantes de manera segura, rápida y menos costosa.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El desarrollo del presente proyecto de investigación, fue llevado a cabo mediante la siguiente metodología (Figura 5). Primero, la especie fue recolectada siendo identificada después por un experto que proporcionó la clasificación botánica de la misma. Después fueron separadas las partes de interés de la planta y se dejaron secar para proceder a la maceración con los distintos solventes de polaridad ascendente.

Los extractos obtenidos fueron evaluados para determinar su capacidad antibacteriana y antinociceptiva. Posteriormente se eligieron los extractos activos para analizar su composición y aislar y purificar los metabolitos secundarios mediante técnicas como cromatografía en capa fina y en conjunto con otros métodos físicos, químicos y espectroscópicos se determinó su estructura molecular.

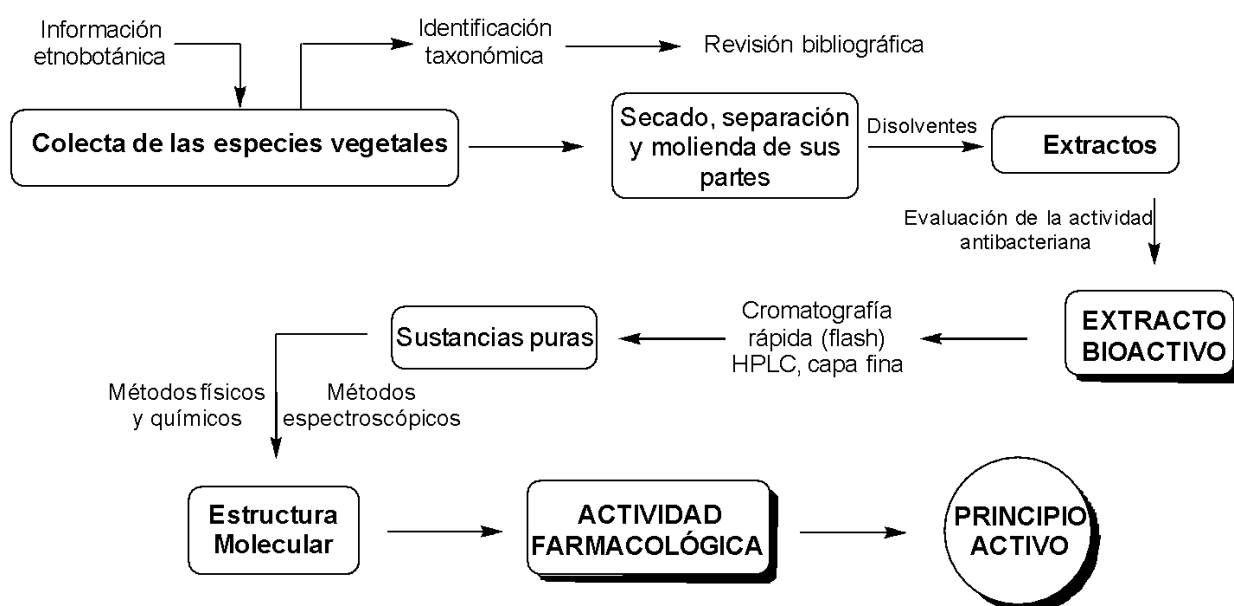


Figura 5. Flujograma de la metodología.

5.1 Colecta e identificación de la especie

Las muestras vegetales fueron colectadas en el estado de Baja California, en la ciudad de Tijuana.

5.2 Obtención de los extractos

La especie fue separada (tallos, hojas y flores) y secada a la sombra durante aproximadamente 30 días. Las distintas partes se sometieron a molienda mecánica.

Las muestras vegetales secas y molidas fueron colocadas en un matraz con capacidad de 3L para ser extraídas mediante maceración (ver figura 6) utilizando tres solventes de diferente polaridad (hexano, acetato de etilo y metanol) por 15 días cada uno.



Figura 6. Tallos, flores y hojas en proceso de maceración.

Después se filtraron y se procedió a separar el disolvente en un rotavapor a temperatura de 50 °C para evitar una pérdida de los metabolitos secundarios. Los extractos fueron guardados en viales y conservados en refrigeración hasta su uso.

Los rendimientos obtenidos de las extracciones realizadas en la especie se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 4. Rendimiento de los extractos de *Acacia confusa*.

Rendimiento de los extractos		
Tipo de extracto	Peso (g)	%
Hexano flores	2	0.2%
Hexano hojas	3	0.3%
Hexano tallos	≤ 1	0.1%
Acetato de etilo flores	10	1%
Acetato de etilo hojas	13	1.3%
Acetato de etilo tallos	4	0.4%
Metanol flores	28	2.8%
Metanol Hojas	32	3.2%
Metanol tallos	21	2.1%

Nota: los porcentajes de rendimiento se calcularon con base en peso seco de la planta sometida a maceración.

Fueron seleccionados para separación los extractos con mayor bioactividad identificada en las pruebas biológicas, siendo el extracto de hojas de acetato de etilo el candidato principal.

5.3 Evaluación antibacteriana de los extractos

Los extractos obtenidos se sometieron a un estudio de evaluación antibacteriana usando el método de Kirby-Bauer modificado.

5.3.1 Bacterias de prueba

C. albicans ATTC 14053

E. coli ATTC 25922

Cryptococcus neoformans

Streptococcus mutans

Las cepas de *C. albicans* ATCC 14053 y *E. coli* ATCC 25922 fueron donadas por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Autónoma de Baja California campus Valle de las Palmas y las cepas de *Cryptococcus neoformans* y *Streptococcus mutans* fueron extraídas de muestras clínicas de voluntarios que residen en el Albergue Las Memorias A.C. donde la mayoría de sus residentes padecen tuberculosis o VIH, estas muestras también fueron aisladas e identificadas en el laboratorio de microbiología antes mencionado.

5.3.2 Preparación de los medios de cultivo

Se prepararon medios de cultivo Mueller Hinton (MH) y Sabouraud según las especificaciones del fabricante y fueron llevados al autoclave a 121°C y 15 lb/pg2 durante 15 minutos. Una vez temperado se vertió el preparado fresco y tibio a placas Petri de vidrio estériles, para dar un fondo uniforme de aproximadamente 4 mm, esto corresponde a 25- 30 ml para placas de 90 mm de diámetro. El agar ya plaqueado se dejó solidificar a temperatura ambiente.

5.3.3 Activación de las cepas

Las cepas se encontraban refrigeradas en caldo MH para activarlas se resembraron en placas con agar MH y se llevaron a la incubadora a 37°C por 24 horas. Después se tomaron colonias aisladas y se resuspendieron en solución salina hasta tener una turbidez estándar de 0.5 en la escala de Mcfarland para estandarizar cada inóculo de las bacterias correspondientes.

5.3.4 Preparación de la muestra

Para preparar el extracto se tomó un gramo previamente liofilizado y cada uno fue resuspendido en 1 mL de agua destilada con ayuda tween 80 para una mejor disolución. La muestra solo fue evaluada a la concentración de 1g/mL, no se realizaron diluciones.

5.3.5 Inoculación de las placas

Se agregó 500 µL de cada inóculo bacteriano preparado (1×10^8 ufc/mL) a 8 placas con agar MH (2 placas para cada microorganismo) y con la ayuda de un hisopo se esparcieron los inóculos por todas las placas de tal manera que se obtenga un crecimiento homogéneo, luego se repitió el procedimiento rotando la placa 60° en dos oportunidades más. Se dejó secar de 5 a 10 minutos antes de hacer los pocillos.

5.3.6 Formación de los pocillos

Se esterilizó el sacabocados con alcohol y se flameó en el mechero, luego con mucho cuidado se realizaron los pocillos, no más de 6 pocillos por placa.

Los pocillos deben estar a más de 15 mm del borde de la placa y deben distribuirse de tal manera que no haya superposición de los halos de inhibición.

5.3.7 Sembrado de las muestras

Se agregaron 100 µL de extracto a cada pocillo y como controles positivos se utilizaron nistatina 100 µg/mL para *C. Albicans* y *Cryptococcus neoformans* y estreptomicina 100 µg/mL para *E. Coli* y *Streptococcus mutans*.

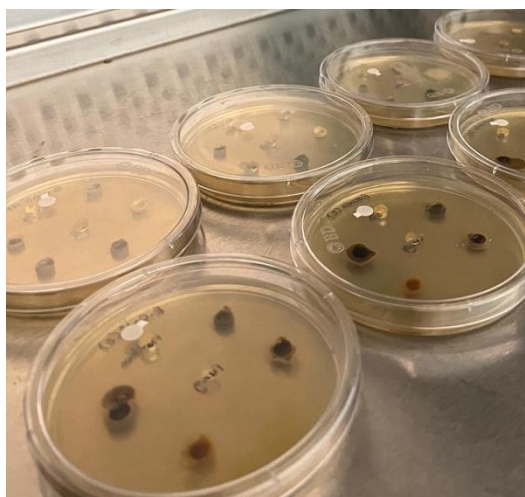


Figura 7. Sembrado de las muestras.

5.3.8 Incubación

Las placas inoculadas se llevaron a una incubadora a 37 °C durante 24 horas. Después de 18 a 24 horas de incubación, cada placa fue examinada. Las zonas de inhibición resultantes deben ser uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento bacteriano. Los diámetros de la zona de inhibición completa se midieron en milímetros pasando por el centro de cada pocillo. La medición se realizó con un Vernier.

5.3.9 Interpretación de los resultados

Una vez transcurrido el periodo de incubación se observó un halo de inhibición en cada uno de los pozos, esto como consecuencia de la actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano de los extractos. La medición de los halos de inhibición se realiza con un vernier o en su defecto con una regla.

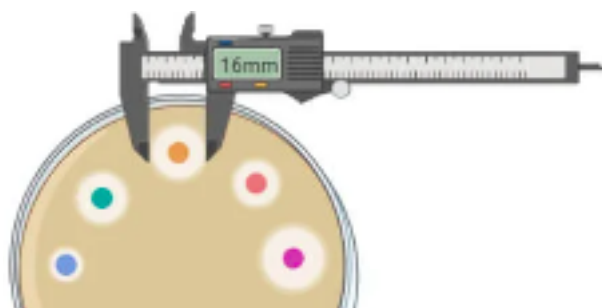


Figura 8. Medición del halo de inhibición.

5.3.10 Resultados de actividad antibacteriana

La evaluación antimicrobiana se realizó utilizando el método de Kirby bauer modificado, donde se observó inhibición del crecimiento de los cuatro microorganismos evaluados. El extracto hexánico de hojas y el extracto metanólico de tallos no presentaron actividad inhibitoria sobre ninguno de los microorganismos. Los extractos que mostraron mejor inhibición fueron los extractos de acetato de etilo, en especial, el extracto de AcOEt de hojas siendo este el principal candidato a separación cromatográfica e identificación de metabolitos secundarios.

Los resultados del experimento se muestran detalladamente en la tabla 5 y figuras 9 y 10.

Tabla 5. Actividad antimicrobiana de los extractos de *Acacia confusa*.

Tipo de extracto [1gr/ml]	Diámetro del halo de inhibición (mm)			
	<i>C. albicans</i> ATTCC 14053	<i>Cryptococcus</i> <i>neoformans</i>	<i>E. coli</i> ATTCC 25922	<i>Streptococcus</i> <i>Mutans</i>
Hexano flores	-	-	8±1	-
Hexano hojas	-	-	-	-
Hexano tallos	-	7±1	-	7±1
Acetato de etilo flores	10±1	9±1	13±1	15±1
Acetato de etilo hojas	11±1	8±1	11±1	17±1
Acetato de etilo tallos	10±1	8±1	11±1	12±1
Metanol flores	-	-	-	13±1
Metanol Hojas	-	-	-	11±1
Metanol tallos	-	-	-	-
Control positivo	18±1 ^a	21±1 ^a	15±1 ^b	15±1 ^b
Control negativo	-	-	-	-

***Nota:** - No mostró inhibición; ^a Nistatina 100 µg/ml , ^b Estreptomicina 100 µg/ml



Figura 9 y 10. Caja de Petri con siembra masiva de *Cándida albicans* y *Cryptococcus neoformans* respectivamente.

5.4 Evaluación antinociceptiva de los extractos de *Acacia confusa*.

Los extractos obtenidos fueron evaluados para determinar su actividad antinociceptiva usando el método de la formalina 1% en ratas. La colecta y obtención de los extractos de *Acacia confusa* se describen en los apartados 5.1 y 5.2.

5.4.1 Tratamiento del extracto

El extracto fue recuperado y disuelto con tween 80 al 1% para obtener la dosis requerida en el experimento que fue de 100 mg/kg vía oral empleando como vehículo solución salina.

5.4.2 Animales

Se utilizaron Ratas macho Wistar de entre 200 y 280 g obtenidas del Bioterio de la Facultad de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja California campus Olay. Las cuales fueron mantenidas bajo condiciones controladas: temperatura preestablecida de 19-22°C; una humedad relativa del 45-65%; un ciclo de luz/oscuridad 12 h /12 h y alimentados con Lab Rodent Diet 5001 de PetFoods.

5.4.3 Efecto antinociceptivo

Para la evaluación del efecto antinociceptivo, se empleó el modelo experimental de la prueba de formalina al 1%, conforme al protocolo previamente reportado por Gong et al. en 2014. Este modelo se seleccionó debido a su utilidad en la detección de nuevos compuestos, al abarcar los mecanismos inflamatorios, neurogénicos y centrales de la nocicepción.

En primer lugar, se procedió a pesar a cada uno de los especímenes de rata, que fueron debidamente identificados con números con el fin de facilitar su seguimiento. Posteriormente, se administró la dosis correspondiente del extracto de *Acacia confusa* por vía oral mediante el uso de una cánula gastroesofágica. Posteriormente, los animales fueron colocados en cilindros transparentes de acrílico con dimensiones de 30x30x60 cm, durante un período de 30 minutos, con el propósito de permitirles adaptarse a su entorno.

Una vez transcurrido este periodo, se procedió a la administración de 50 μ L de formalina al 1% en la superficie plantar de la extremidad posterior derecha por vía subcutánea, utilizando una aguja de calibre 31G. La solución de formalina se preparó a partir de una solución comercial de formaldehído al 37%, la cual se diluyó en solución salina isotónica. Después de la administración de la formalina, los animales fueron nuevamente ubicados en los cilindros de observación, y se cuantificó su conducta nociceptiva en intervalos de 1 minuto cada 5 minutos, durante un período de 60 minutos en total. Las conductas relacionadas con el estímulo nociceptivo se cuantificaron mediante la determinación de la incidencia de sacudidas espontáneas de la extremidad inyectada o el tiempo acumulado de lamidas de la pata inyectada (frecuencia de sacudidas/lamidas). Se registraron conductas nociceptivas tanto en la fase aguda temprana (fase 1) durante los primeros 10 minutos después de la inyección, como en la fase tónica tardía (fase 2) durante el período que abarcó de los 10 a los 60 minutos posteriores a la inyección de formalina. Al finalizar el experimento, los animales fueron sacrificados mediante la administración de una sobredosis de pentobarbital (150 mg/kg, i.p.).



Figura 11. Prueba de la formalina.

5.4.4 Actividad antinociceptiva

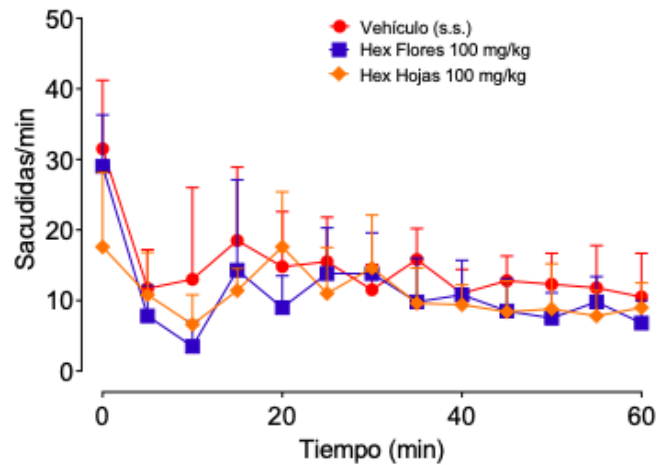
El efecto antinociceptivo del extracto fue analizado como se describe a continuación: en la dosis suministrada, se graficaron cursos temporales con la finalidad de analizar la reducción de la conducta nociceptiva (número de sacudidas y el tiempo de lamidas) con respecto al tiempo transcurrido en la prueba de formalina; se comparó el grupo control con los grupos de ratas tratadas con distinto extracto. Así mismo se realizó un gráfico del área bajo la curva de sacudidas para determinar el efecto antinociceptivo total en cada una de las fases de la prueba de la formalina.

Estos resultados fueron expresados como la media aritmética $\pm$ el error estándar de la media, se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para determinar diferencias significativas entre los grupos, así como la prueba complementaria de Dunnett para comparaciones múltiples. Los resultados con una $p < 0.05$, se consideraron significativos.

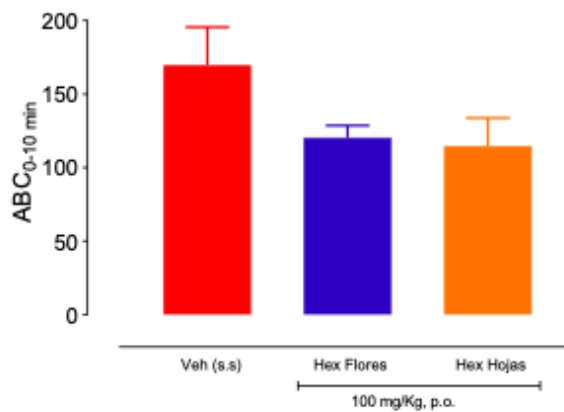
5.4.5 Evaluación de la actividad antinociceptiva en extractos hexánicos de *Acacia confusa*

Los extractos hexánicos de flores y hojas fueron evaluados y comparados contra el grupo control el cual fue administrado con solución salina. En las gráficas **1, 2 y 3** podemos observar detalladamente los resultados.

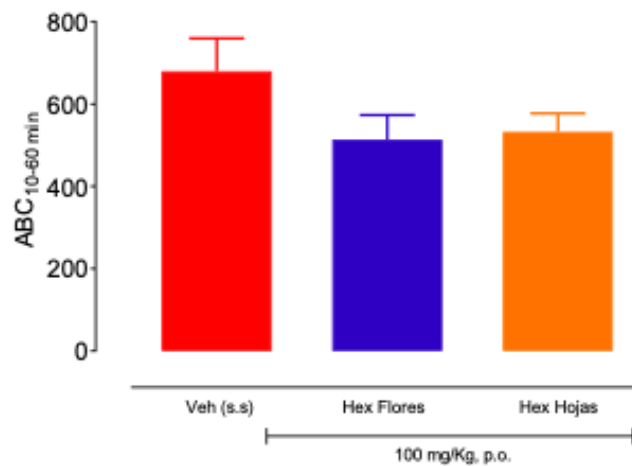
En la gráfica **1** se puede observar una pequeña disminución en el número de sacudidas cuando se administraron ambos extractos hexánicos en comparación con el grupo control. Comparando los tres grupos respecto al área bajo la curva, las diferencias no son tan significativas si se comparan con el grupo de extractos de acetato de etilo.



Gráfica 1. Comparación del grupo control (rojo) contra los grupos de hexano flores (azul) y hexano hojas (naranja) durante las dos fases del experimento de la prueba de la formalina en ratas.



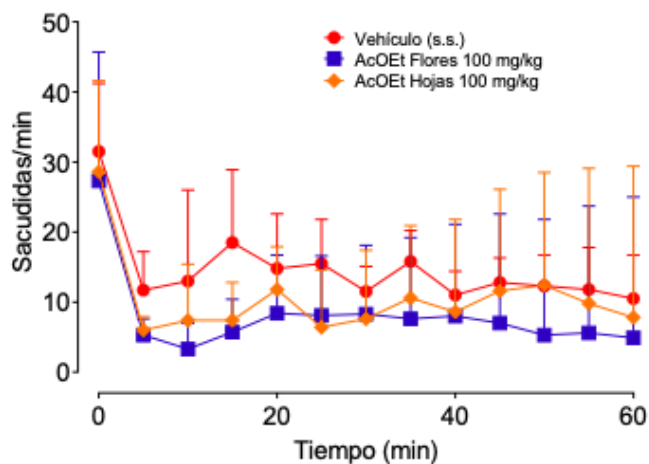
Gráfica 2. Gráfica de área bajo la curva (ABC) del grupo control (rojo), en comparación con los grupos de hexano flores (azul) y hexano hojas (naranja) durante la primera fase (0-10 min) de la prueba de la formalina en ratas.



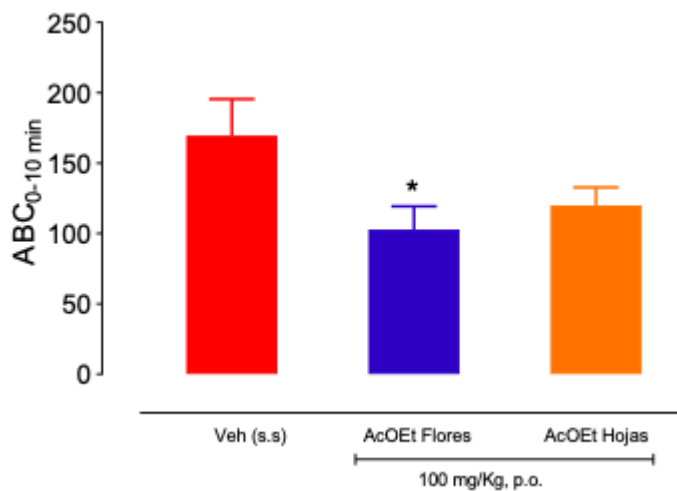
Gráfica 3. Gráfica de área bajo la curva (ABC) del grupo control (rojo), en comparación con los grupos control de hexano flores (azul) y hexano hojas (naranja) durante la segunda fase del experimento (10-60 min) de la prueba de la formalina en ratas.

5.4.6 Evaluación de la actividad antinociceptiva en extractos de Acetato de etilo de *Acacia confusa*

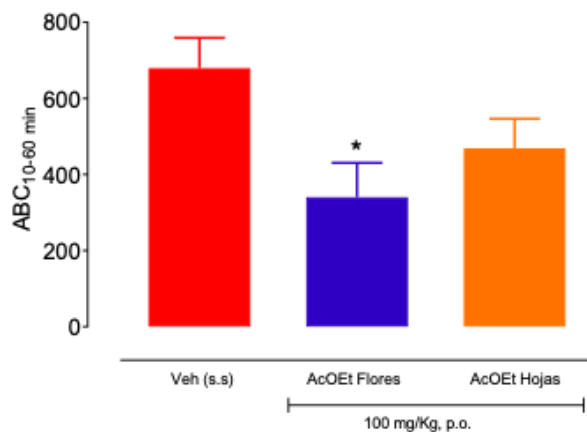
Fueron evaluados los extractos de AcOEt de flores y hojas, comparados con el grupo control el cual fue administrado con solución salina. En las gráficas 4, 5 y 6 podemos observar detalladamente los resultados.



Gráfica 4. Comparación del grupo control (rojo) contra los grupos de AcOet flores (azul) y hexano hojas (naranja) durante las dos fases de la prueba de la formalina en ratas.



Gráfica 5. Gráfica de área bajo la curva (ABC) del grupo control (rojo) en comparación con los grupos de hexano flores (azul) y hexano hojas (naranja) durante la primera fase del experimento (0-10 min) de la prueba de formalina en ratas.

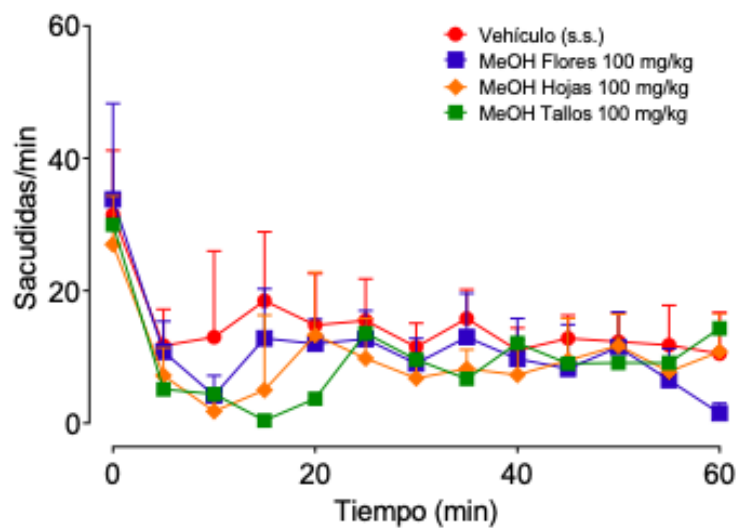


Gráfica 6. Gráfica de área bajo la curva (ABC) en comparación del grupo control (rojo) en comparación con los grupos de hexano flores (azul) y hexano hojas (naranja) durante la segunda fase (10-60 min) de la prueba de la formalina en ratas

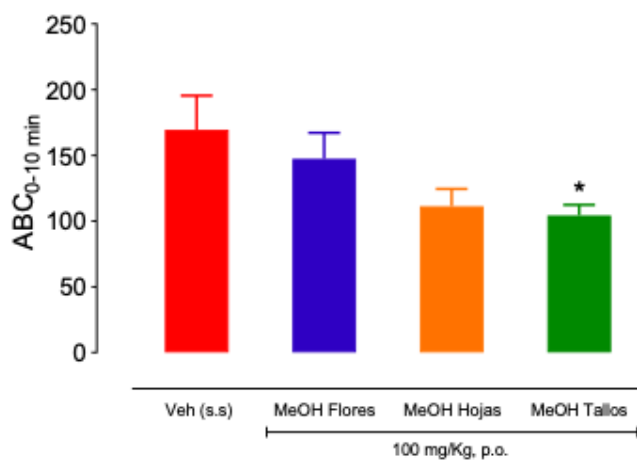
En la gráfica **4** se puede observar una notable disminución en el número de sacudidas en ambos grupos tratados con los extractos de AcOEt de *A. Confusa* en comparación con el grupo control. En cuanto al área bajo la curva del extracto de acetato flores y acetato hojas se puede apreciar que el extracto de flores es más activo que el extracto de acetato hojas y que los extractos hexánicos.

5.4.7. Actividad antinociceptiva en extractos de metanólicos de *Acacia confusa*

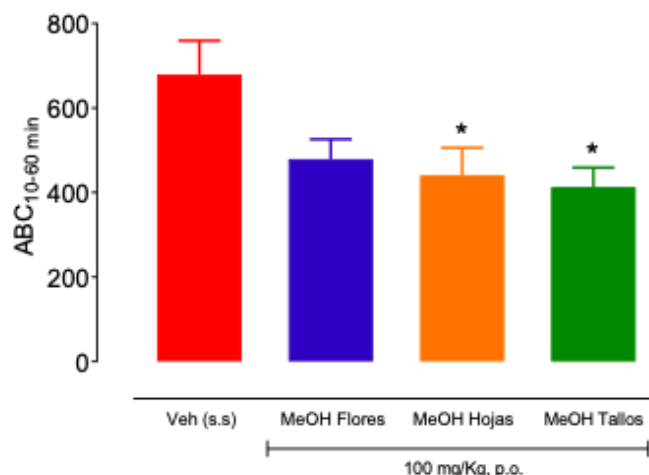
Fueron evaluados los extractos metanólicos de flores, hojas y tallos y estos se compararon con el grupo control el cual fue suministrado con solución salina. En las gráficas **7,8 y 9** podemos observar detalladamente los resultados.



Gráfica 7. Comparación del grupo control contra los grupos de MeOH flores (azul), MeOH hojas (naranja) y MeOH tallos (verde) durante las dos fases del experimento.



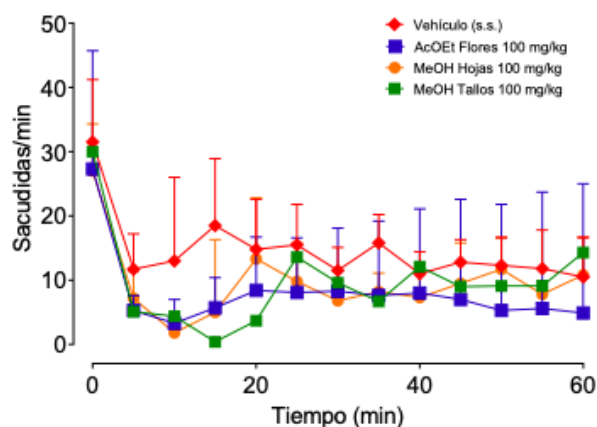
Gráfica 8. Gráfica de área bajo la curva (ABC) del grupo control (rojo) en comparación con los grupos de MeOH flores (azul), MeOH hojas (naranja) y MeOH tallos (verde) durante la primera fase (0-10 min) de la prueba de la formalina en ratas.



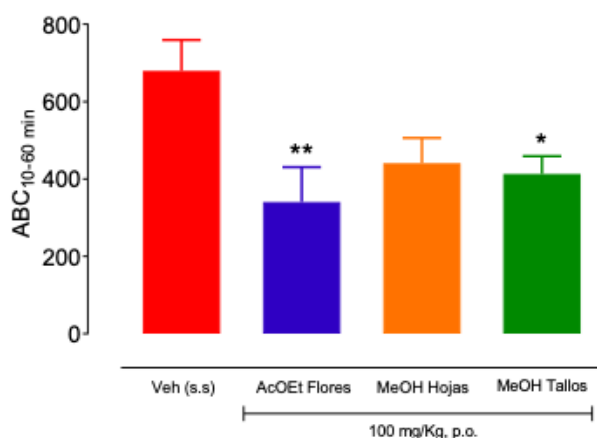
Gráfica 9. Gráfica de área bajo la curva (ABC) del grupo control (rojo) en comparación con los grupos de hexano flores (azul) y hexano hojas (naranja) durante la segunda fase (10-60min) de la prueba de la formalina en ratas.

Se puede observar una disminución en el número de sacudidas en los grupos de ratas a los que se les administró los diferentes extractos metanólicos en comparación con el grupo control. Al analizar el área bajo la curva de los animales tratados con los extractos metanólicos con respecto al grupo de animales tratado con el vehículo, los extractos con mayor actividad son los extractos de metanol hojas y metanol tallos.

Al comparar las áreas bajo la curva de todos los extractos evaluados se observa en la gráfica **10** que los extractos que presentaron mayor actividad son los extractos de acetato de etilo y metanol, pero el extracto de AcOEt flores presentó un área bajo la curva de 300 unidades de área (gráfica **11**) en comparación con los extractos metanólicos y hexánicos que presentaron áreas superiores, siendo en esta prueba el principal candidato a separación cromatográfica.



Gráfica 10. Comparación del grupo control (rojo) contra los grupos de AcOEt flores (azul), MeOH hojas (naranja) y MeOH tallos (verde) durante las dos fases de la prueba de la formalina en ratas.



Gráfica 11. Gráfica de área bajo la curva (ABC) del grupo control (rojo) en comparación con los grupos de AcOEt flores (azul), MeOH hojas (naranja) y MeOH tallos (verde) durante la segunda fase (10-60 min) de la prueba de la formalina en ratas.

5.5 Separación cromatográfica de los extractos de *Acacia confusa*

En primer lugar, el extracto fue probado en una cromatografía de capa fina a distintas polaridades para elegir el sistema de solventes ideales para su separación en una columna cromatográfica.

5.5.1 Cromatografía en capa fina

Se tomó una hoja de sílica gel 60 F₂₅₄ de una medida de 3 cm x 5 cm dejando en ambos extremos una distancia de 0.5cm para poder depositar la muestra y que ésta pudiese correr por la placa de manera adecuada.

A una pequeña parte del extracto se le añadió AcOEt para disolverse y con ayuda de un capilar se tomó una pequeña muestra la cual se depositó al centro de la placa y se dejó secar por 1 minuto.

Se eligió un sistema en el que se encontrara un desplazamiento de los metabolitos presentes en cada extracto a una distancia aproximada de 2/3 del tamaño de la placa utilizada equivalente a un factor de retención de 0.3 ($R_f = 0.3$).

Después de elegir a conveniencia el sistema de solventes ideales para su separación, se llenó a una altura adecuada una cámara cromatográfica cuidando de no exceder la altura de 0.5 cm que se señaló en un inicio. Acto seguido se introdujo a la cámara la hoja de gel de sílice con la muestra impregnada, dejando el tiempo necesario hasta observar que el solvente llega al límite superior señalado. Una vez en su límite se sacó de la cámara y se dejó secar para poder observar en lámpara UV. Una vez la placa introducida en una cámara oscura de luz UV se observó el desplazamiento de los metabolitos y se toma la decisión de elección de otros sistemas de solventes que sean ideales para la separación de los metabolitos presentes o si ese es el adecuado.

Al final se revelaron las placas con el revelador de cloruro de cobalto II (CoCl_2) para fijar el desplazamiento de los metabolitos y ver de nuevo en luz UV el desplazamiento de los metabolitos presentes.

5.5.2 Cromatografía en columna (Flash)

Después de elegir los sistemas ideales para la separación de los metabolitos con la cromatografía en capa fina, se siguió la siguiente metodología. Para la preparación de la columna cromatográfica, se pesaron 500 mg del extracto en un vial seco y

limpio, el cual se disolvió con un mínimo de AcOEt. A continuación, se homogeneizó el extracto con medio cucharada de gel de sílice en otro vial, y se permitió que se secara hasta obtener una consistencia de polvo fino. Luego, se seleccionó el tamaño adecuado de la columna siguiendo las recomendaciones de Clark Still (1978). Marcas de una pulgada de separación se hicieron en la columna con la ayuda de un marcador permanente, numerándolas desde la base hasta la parte superior. Un pequeño tapón de algodón en forma de cono se insertó en la parte inferior de la columna para permitir el paso del solvente y evitar que el gel de sílice se desplace. La columna se colocó en un soporte universal, se llenó con gel de sílice hasta la séptima pulgada, y se agitó para un empaquetamiento uniforme.

La altura del gel disminuyó a aproximadamente la sexta pulgada, indicando el tamaño óptimo de la columna. Se verificó que la columna estuviera nivelada en la parte frontal y los laterales. Posteriormente, se empaquetó la columna con el solvente menos polar (hexano en este caso), y se aseguró de que el gel de sílice se impregnara por completo. La columna se llenó tantas veces como fuera necesario para un adecuado empaquetamiento. Se reguló la presión con una bomba de aire para que el solvente descendiera uniformemente (idealmente, una pulgada en 30 segundos o dos pulgadas en un minuto). Luego, se añadió el extracto homogeneizado al gel de sílice, cuidando que descendiera uniformemente a través de la columna. Para evitar que la columna se quedará sin solvente y se secara, se utilizó un delgado tapón de algodón seguido del extracto. Se prepararon frascos numerados para coleccionar las fracciones que salieran de la columna. La columna se llenó con el solvente de elección en sistemas ascendentes de polaridad, y finalmente, se encendió la bomba de aire para coleccionar las fracciones, registrando su desplazamiento por la columna pulgada a pulgada. Este procedimiento se repitió con distintos sistemas de menor a mayor polaridad para permitir la separación de los compuestos.

Una vez obtenidas las fracciones de la columna, se llevaron cada una de ellas a concentrar mediante rotavapor, lo cual permitió la recuperación del solvente utilizado y se procedió al análisis en cromatografía en capa fina.

Cuando las muestras ya estaban mayormente concentradas se repitió el procedimiento de analizar las fracciones en cromatografía de capa fina, esperando observar los compuestos de manera pura.

Si se observan los compuestos puros en cromatografía de capa fina, la muestra es llevada a resonancia magnética nuclear, de lo contrario se somete esa muestra a una columna de menor tamaño según sea el peso de la muestra.

5.6 Purificación e identificación de metabolitos secundarios en el extracto de AcOEt Hojas de *Acacia confusa*

La purificación e identificación del extracto se llevó a cabo con la metodología descrita en los apartados anteriores. Se utilizaron distintos sistemas de solventes para la separación de los metabolitos secundarios contenidos en el extracto. Se inició con un sistema poco polar (hexano-AcOEt, 9:1) y se terminó con un solvente de alta polaridad (MeOH).

Mediante cromatografía en capa fina se observaron las fracciones recolectadas. Se midieron los R_f de cada una de ellas y las fracciones con valores semejantes se tomaron como una misma fracción, resultando 7 grupos. Cada uno de esos grupos aún no tenían un grado alto de pureza, sino una mezcla de compuestos, por lo que se continuó con su purificación mediante cromatografía en columna (CC).

La fracción del grupo 3 (77.4 mg) se sometió dos veces a CC en gel de sílice usando como eluyente hexano y hexano-AcOEt en orden creciente de polaridad. Lo anterior condujo a la obtención de un compuesto en forma de pequeños cristales (2 mg), cuyo espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) se muestra en la Figura 13. La comparación de sus datos de RMN con los descritos (Tang et al., 2012) para compuestos estructuralmente relacionados, permitió la caracterización de un producto natural nuevo llamado: 28-acetoxi-3-*O-p*-cumaril- β -amirina (ver figura 12). De los cuales observamos la señal doble característica de la β -amirina a 5.26 ppm y las señales dobles de los protones 28 y 28' del grupo acetato a 4.04 y 3.71 ppm respectivamente (Bandeira et al., 2007). Por otro lado, también son observables las señales para la funcionalización en 3 del ácido *p*-cumarínico, tal es el caso de las

señales dobles de alqueno alfa al carbonilo de los protones 2' y 3' a 6.3 y 7.6 ppm (Ramorobi et al., 2022), así como la señal doble para los protones aromáticos 5' y 9' a 6.83 ppm y 6' y 8' a 7.43 ppm (López-Martínez et al., 2015).

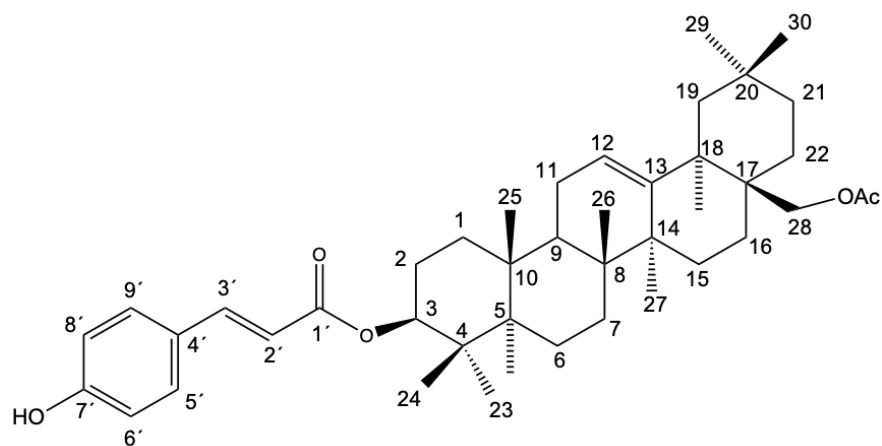


Figura 12. 28-acetoxi-3-O-*p*-cumaril- β -amirina.

100 MHz
CDCl₃

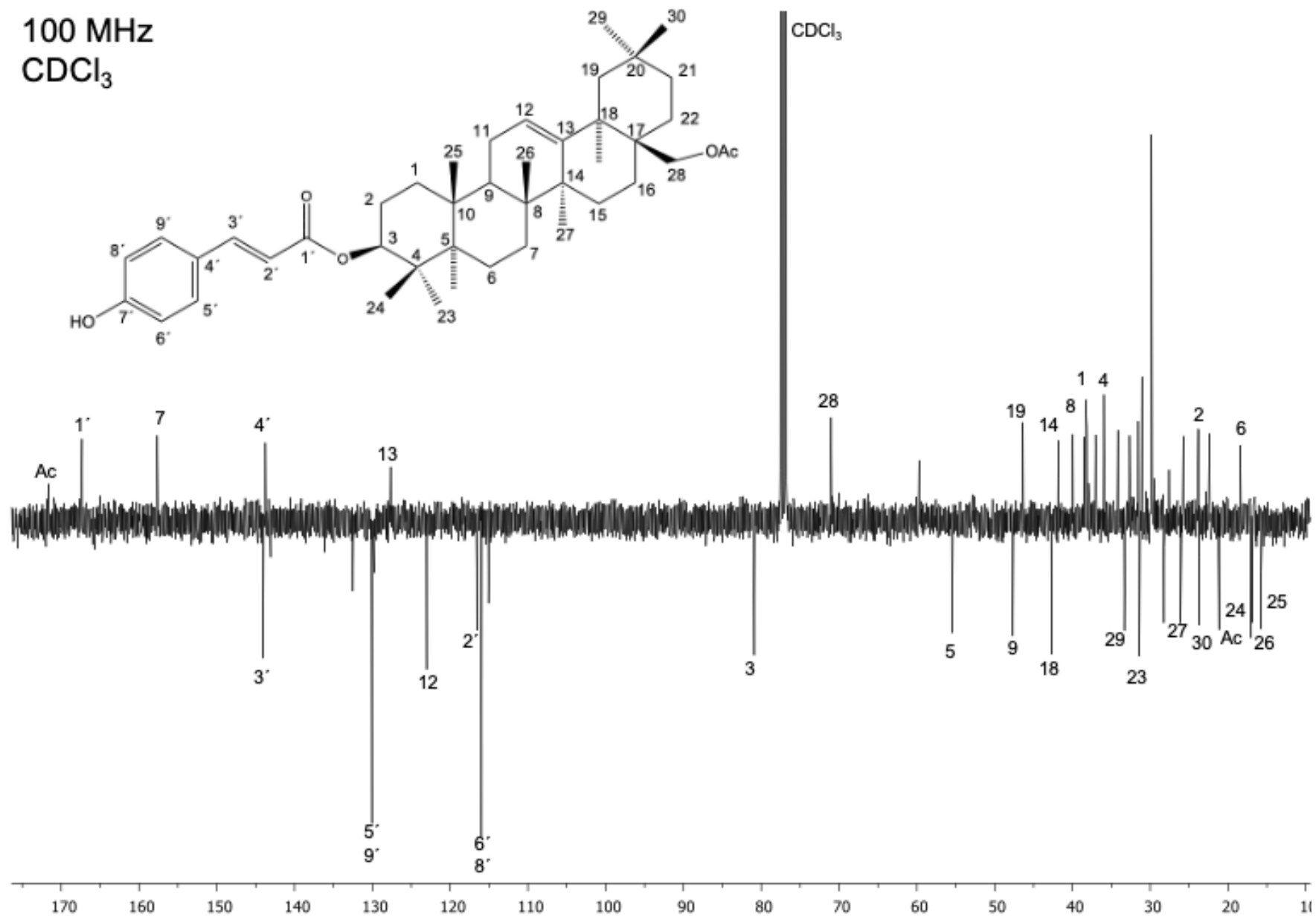


Figura 14. Espectro de RMN de ATP del 28-acetoxi-3-O-p-cumaril- β -amirina.

6.CONCLUSIONES

En este estudio, se llevaron a cabo ensayos para evaluar la actividad antibacteriana y antinociceptiva de los extractos hexánicos, de acetato de etilo (AcOEt) y metanólicos (MeOH) de las flores, hojas y tallos de *Acacia confusa*. En los ensayos de actividad antibacteriana, probamos los extractos frente a una bacteria gram positiva, una bacteria gram negativa y dos hongos. Se observó una destacada inhibición con el extracto de hojas en AcOEt, a una concentración de 1 g/mL. Del mismo modo, en los ensayos de actividad antinociceptiva utilizando la prueba de formalina, los extractos que mostraron los mejores resultados fueron los de flores y hojas en AcOEt. Estos extractos arrojaron resultados similares a los del control positivo utilizado en el experimento.

Además, llevamos a cabo la separación cromatográfica de los extractos y caracterizamos las sustancias a través de métodos espectroscópicos, lo que nos llevó a identificar un nuevo producto natural: 28-acetoxi-3-O-p-cumaril- β -amirina. Los análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) de una y dos dimensiones, así como las comparaciones con la literatura, confirmaron los desplazamientos químicos de este nuevo producto natural.

Este metabolito secundario aislado de *Acacia confusa* demuestra un gran potencial para su uso individual o en combinación con otros antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) en el contexto de la actividad antinociceptiva, o con otros antibióticos para potenciar su actividad antibacteriana. Nuestros resultados respaldan la continuación de investigaciones químicas y experimentos específicos que puedan atribuir directamente la actividad biológica a este metabolito secundario.

En última instancia, los hallazgos de esta investigación respaldan el uso tradicional de *Acacia confusa* en la medicina tradicional y sugieren un gran potencial para su aplicación en la atención médica moderna.

7. EXPERIMENTAL

Experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La elucidación estructural de los compuestos obtenidos se realizó mediante la adquisición de espectros de RMN utilizando un equipo Bruker de 400 MHz. Para la obtención de los espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , experimentos COSY, HSQC y HMBC se utilizó CDCl_3 (99.8% D).

Los experimentos (FIDs) obtenidos se procesaron y analizaron con el software MestReNova.

Consideraciones bioéticas

El presente trabajo cuenta con la aprobación del Comité Científico y Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja California. Todos los RPBI fueron dispuestos según la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002.

8.REFERENCIAS

- Abdul-Wahab, I. R., Guilhon, C. C., Fernandes, P. D., & Boylan, F. (2012). Anti-nociceptive activity of *Pereskia bleo* Kunth. (Cactaceae) leaves extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 144(3), 741–746. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.029>
- Adhikari Deeksha, & Rangra Naresh Kumar. (2023). Antimicrobial activities of *Acacia* genus: A review . *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 13(2), 45. <https://doi.org/10.4103/2221-1691.369609>
- Ahmed M., Gamboa Sandra, & Buitrago Gustavo. (2004, December 13). Antinociceptive activity of triterpenes isolated from *Clusia ellipticifolia*. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*
- Alvarez -Quiroz, Barrera, C., Aliphath Fernández, & Galmiche Tejeda. (2017). *Plantas medicinales con propiedades frías y calientes en la cultura Zoque de Ayapa, Tabasco, México*. www.blacpma.usach.cl
- Amoussa, A. M. O., Lagnika, L., Bourjot, M., Vonthron-Senecheau, C., & Sanni, A. (2016). Triterpenoids from *Acacia ataxacantha* DC: Antimicrobial and antioxidant activities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1266-y>
- Arias, M. E., Gomez, J. D., Cudmani, N. M., Vattuone, M. A., & Isla, M. I. (2004). Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Acacia aroma* Gill. ex Hook et Arn. *Life Sciences*, 75(2), 191–202. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.12.007>
- Ashwini, J., Aswathy, T. R., Rahul, A. B., Thara, G. M., & Nair, A. S. (2021a). Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using *acacia caesia* bark extract and its photocatalytic and antimicrobial activities. *Catalysts*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/catal11121507>
- Ashwini, J., Aswathy, T. R., Rahul, A. B., Thara, G. M., & Nair, A. S. (2021b). Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using *acacia caesia* bark extract and its photocatalytic and antimicrobial activities. *Catalysts*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/catal11121507>
- Bandeira, P. N., Lemos, T. L. G., Costa, S. M. O., & Dos Santos, H. S. (2007). Obtenção de derivados da mistura triterpenoídica α -e β -amirina. In *Revista*

Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy (Vol. 17, Issue 2).

Barfour, A. F., Mensah, A. Y., Asante-Kwatia, E., Danquah, C. A., Anokwah, D., Adjei, S., Baah, M. K., & Mensah, M. L. K. (2021a). Antibacterial, Antibiofilm, and Efflux Pump Inhibitory Properties of the Crude Extract and Fractions from *Acacia macrostachya* Stem Bark. *Scientific World Journal*, 2021.

<https://doi.org/10.1155/2021/5381993>

Barfour, A. F., Mensah, A. Y., Asante-Kwatia, E., Danquah, C. A., Anokwah, D., Adjei, S., Baah, M. K., & Mensah, M. L. K. (2021b). Antibacterial, Antibiofilm, and Efflux Pump Inhibitory Properties of the Crude Extract and Fractions from *Acacia macrostachya* Stem Bark. *Scientific World Journal*, 2021.

<https://doi.org/10.1155/2021/5381993>

Barros Asenjo, S. (2007). *El género acacia, especies multipropósito* (Issue 5).
www.infor.d

Camacho-Escobar, M. A., Ramos-Ramos, D. A., Ávila-Serrano, N. Y., Sánchez-Bernal, E. I., López-Garrido, S. J., Camacho-Escobar, M. A., Ramos-Ramos, D. A., Ávila-Serrano, N. Y., Sánchez-Bernal, E. I., & López-Garrido, S. J. (2020). Las defensas físico-químicas de las plantas y su efecto en la alimentación de los rumiantes. *Terra Latinoamericana*, 38(2), 443–453.

<https://doi.org/10.28940/TERRA.V38I2.629>

Cantaro Guzman, & Pachas Lugo. (2023). *Actividad antimicrobiana In vitro de Malva sylvestris (Extracto hidroalcohólico) sobre bacterias uropatógenas*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Cavazos, P., Gonzalez, D., Lanorio, J., & Ynalvez, R. (2021a). Secondary metabolites, antibacterial and antioxidant properties of the leaf extracts of *Acacia rigidula* benth. and *Acacia berlandieri* benth. *SN Applied Sciences*, 3(5).

<https://doi.org/10.1007/s42452-021-04513-8>

Cavazos, P., Gonzalez, D., Lanorio, J., & Ynalvez, R. (2021b). Secondary metabolites, antibacterial and antioxidant properties of the leaf extracts of *Acacia rigidula* benth. and *Acacia berlandieri* benth. *SN Applied Sciences*, 3(5).

<https://doi.org/10.1007/s42452-021-04513-8>

- Chu, C., Huang, Y., Chen, Y. F., Wu, J. H., Rahman, K., Zheng, H. C., & Qin, L. P. (2008). Anti-nociceptive activity of aqueous fraction from the MeOH extracts of *Paederia scandens* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 118(1), 177–180. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.03.011>
- Cialdella Ana Maria. (1984). EL GENERO ACACIA (LEGUMINOSAE) EN LA ARGENTINA. *Source*, 1, 59–111.
- Cruz, S. M. (2016). Medicina tradicional y fitoterapia una alternativa para el mejoramiento de la salud en Guatemala Ensayo Científico / Scientific Essay. *Tecnología y Salud*, 3(1).
- Cuevas-Morales, C., Zavala-Ocampo, L. M., Miguel-Chávez, R. S., González-Trujano, M. E., Basurto-Peña, F. A., Muñoz-Ocotoero, V., & Aguirre-Hernández, E. (2022). PHARMACOLOGICAL EVALUATION OF THE ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY AND PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF ACTIVE EXTRACTS OF SALVIA PURPUREA CAV. *Botanical Sciences*, 100(2), 383–396. <https://doi.org/10.17129/botsoci.3013>
- Daffalla, H. M., Hagr, T. E., Ahmed, N. S., & Ahmed, R. H. (2018a). *Larvicidal and Antibacterial Activities of Methanol Extract of Acacia polyacantha Willd.* <https://www.researchgate.net/publication/332631952>
- Daffalla, H. M., Hagr, T. E., Ahmed, N. S., & Ahmed, R. H. (2018b). *Larvicidal and Antibacterial Activities of Methanol Extract of Acacia polyacantha Willd* *Phytochemical screening and Biological activities of some Sudanese Medicinal Plant View project Investigation of Antidiabetic, Antimicrobial and Antioxidant compounds in Four Sudanese Medicinal plant Species Grown in Kordofan View project.* <https://www.researchgate.net/publication/332631952>
- De La Cruz, J., & Dixon, M. (2012). Plantas medicinales para tratar enfermedades primarias en tres comunidades tuahkas. *Central American Journals Online*, 66, 57–60. <https://www.lamjol.info/index.php/WANI/article/view/896>
- Elansary, H. O., Szopa, A., Kubica, P., Ekiert, H., Al-Mana, F. A., & Al-Yafarsi, M. A. (2020a). Antioxidant and biological activities of acacia saligna and lawsonia inermis natural populations. *Plants*, 9(7), 1–17. <https://doi.org/10.3390/plants9070908>

- Elansary, H. O., Szopa, A., Kubica, P., Ekiert, H., Al-Mana, F. A., & Al-Yafrsi, M. A. (2020b). Antioxidant and biological activities of acacia saligna and lawsonia inermis natural populations. *Plants*, 9(7), 1–17. <https://doi.org/10.3390/plants9070908>
- Elmi, A., Spina, R., Risler, A., Philippot, S., Mérito, A., Duval, R. E., Abdoul-Latif, F. M., & Laurain-Mattar, D. (2020a). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities, cytotoxicity of acacia seyal del bark extracts and isolated compounds. *Molecules*, 25(10). <https://doi.org/10.3390/molecules25102392>
- Elmi, A., Spina, R., Risler, A., Philippot, S., Mérito, A., Duval, R. E., Abdoul-Latif, F. M., & Laurain-Mattar, D. (2020b). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities, cytotoxicity of acacia seyal del bark extracts and isolated compounds. *Molecules*, 25(10). <https://doi.org/10.3390/molecules25102392>
- Espinosa-Juárez, J. V., Jaramillo-Morales, O. A., Navarrete-Vázquez, G., Melo-Hernández, L. A., Déciga-Campos, M., & López-Muñoz, F. J. (2017). N-(2-morpholin-4-yl-ethyl)-2-(1naphthyloxy)acetamide inhibits the chronic constriction injury-generated hyperalgesia via the antagonism of sigma-1 receptors. *European Journal of Pharmacology*, 812, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.06.026>
- FAO. (1983). *Manual sobre las semillas de acacias de zonas secas*. <https://www.fao.org/3/q2190s/Q2190S03.htm#ch2.3.1>
- Garcia Adrian. (2021). *Efecto de los mecanismos de defensa de las plantas en la eficacia de transmisión por semilla de los virus [grado de biotecnología]*. universidad politécnica de madrid.
- Ghasemzadeh Rahbardar, & Mahboobeh Hosseinzadeh. (2020). Effects of rosmarinic acid on nervous system disorders: an updated review. In *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* (Vol. 393, Issue 10). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00210-020-01935-w>
- González Trujano, Peña Fajardo Erika, Ventura Martínez Rosa, & López Muñoz Francisco. (2006). Detección y comparación del efecto antinociceptivo de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) en el modelo PIFIR. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 29(2), 80–85. <https://www.medigraphic.com/pdfs/rma/cma-2006/cma062e.pdf>

- Katerere, D. R., & Eloff, J. N. (2004). Variation in chemical composition, antibacterial and antioxidant activity of fresh and dried Acacia leaf extracts. *South African Journal of Botany*, 70(2), 303–305.
- Kuner, R. 2010. Central mechanisms of pathological pain. *Nat Med*. 16(11):1258-1266.
- Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., & Wu, H. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. In *Plant Physiology and Biochemistry* (Vol. 148, pp. 80–89). Elsevier Masson SAS.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006>
- Lin, H. Y., Chang, T. C., & Chang, S. T. (2018). A review of antioxidant and pharmacological properties of phenolic compounds in *Acacia confusa*. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 8(4), 443–450.
<https://doi.org/10.1016/J.JTCME.2018.05.002>
- López-Martínez, L. M., Santacruz-Ortega, H., Navarro, R. E., Sotelo-Mundo, R. R., & González-Aguilar, G. A. (2015). A ¹H NMR investigation of the interaction between phenolic acids found in mango (*Manguifera indica* cv Ataulfo) and papaya (*Carica papaya* cv Maradol) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radicals. *PLoS ONE*, 10(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140242>
- Mandal, P., Sinha Babu, S. P., & Mandal, N. C. (2005a). Antimicrobial activity of saponins from *Acacia auriculiformis*. *Fitoterapia*, 76(5), 462–465.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.03.004>
- Mandal, P., Sinha Babu, S. P., & Mandal, N. C. (2005b). Antimicrobial activity of saponins from *Acacia auriculiformis*. *Fitoterapia*, 76(5), 462–465.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.03.004>
- Manríquez Torres Jose de Jesus. (2007). “Metabolitos antibacterianos de *Acacia cochliacantha*.” UAEH.
- Martínez Valencia. (2021). *Efecto antinociceptivo y antiinflamatorio del extracto metanólico de Acacia farnesiana en un modelo de dolor inflamatorio*.
<https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/handle/123456789/25110>
- Mendez Pérez. (2017). *Antología del género Acacia mill. en México*.
http://dicifo.chapingo.mx/pdf/tesislic/2017/M%C3%A9ndez_P%C3%A9rez_Rebeca.pdf

- Miño Jorge, Gorzalczany Susana, Moscatelli Valeria, Ferraro graciela, Acevedo cristina, & Hnatyszyn Oksana. (2002). Actividad Antinociceptiva y Antiinflamatoria de *Erythrina crista-galli* L. ("Ceibo"). *Acta Farm. Bonaerense*, 2(21), 93–98.
- Moreno-Pérez, G. F., González-Trujano, M. E., Martínez-Gordillo, M. J., Miguel-Chávez, R. S., Basurto-Peña, F. A., Dorazco-González, A., & Aguirre-Hernández, E. (2019). Amarisolide A and pedalitin as bioactive compounds in the antinociceptive effects of *Salvia circinata* (Lamiaceae). *Botanical Sciences*, 97(3), 355–365. <https://doi.org/10.17129/botsci.2187>
- Mutai, C., Bii, C., Rukunga, G., Ondicho, J., Mwitari, P., Abatis, D., Vagias, C., Roussis, V., & Kirui, J. (2009). Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from *Acacia mellifera*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 6(1), 42–48. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v6i1.57072>
- Mutai, C., Bii, C., Vagias, C., Abatis, D., & Roussis, V. (2009). Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. *Journal of Ethnopharmacology*, 123(1), 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.02.007>
- Negi, B. S., & Dave, B. P. (2010). In Vitro Antimicrobial Activity of *Acacia catechu* and Its Phytochemical Analysis. *Indian Journal of Microbiology*, 50(4), 369–374. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0061-1>
- Nicolás, C., Pava, R., Gabriel, A., Sanabria, Z., Consuelo, L., & Leal, S. (2017a). *Antimicrobial activity of four varieties of plants against pathogens clinical significance in Colombia*. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v15n27/1794-2470-nova-15-27-00119.pdf>
- Nicolás, C., Pava, R., Gabriel, A., Sanabria, Z., Consuelo, L., & Leal, S. (2017b, June 1). Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. *NOVA*, 119–129.
- Ntshanka, N. M., Ejidike, I. P., Mthunzi, F. M., Moloto, M. J., & Mubiayi, K. P. (2020a). Investigation into the phytochemical profile, antioxidant and antibacterial potentials of *Combretum molle* and *Acacia meurnsii* leaf parts. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 13(4), 1683–1694. <https://doi.org/10.13005/BPJ/2043>
- Ntshanka, N. M., Ejidike, I. P., Mthunzi, F. M., Moloto, M. J., & Mubiayi, K. P. (2020b). Investigation into the phytochemical profile, antioxidant and antibacterial potentials

- of Combretum molle and Acacia mearnsii leaf parts. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 13(4), 1683–1694. <https://doi.org/10.13005/BPJ/2043>
- Okoro, S., Kawo, A., & Arzai, A. (2012a). Phytochemical Screening, Antibacterial and Toxicological Activities of *Acacia Senegal* Extracts. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 5(1). <https://doi.org/10.4314/bajopas.v5i1.29>
- Okoro, S., Kawo, A., & Arzai, A. (2012b). Phytochemical Screening, Antibacterial and Toxicological Activities of *Acacia Senegal* Extracts. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 5(1). <https://doi.org/10.4314/bajopas.v5i1.29>
- Pagán Israel, & García Fernando. (2020). Tolerance of Plants to Pathogens: A Unifying View. *Annual Review of Phytopathology*, 58, 9–20. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-010820>
- Palombo, E. A., & Semple, S. J. (2001). Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 77). www.elsevier.com/locate/jethpharm
- Pennacchio, M., Kemp, A. S., Taylor, R. P., Wickens, K. M., & Kienow, L. (2005). Interesting biological activities from plants traditionally used by Native Australians. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(3), 597–601. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.10.012>
- Plata Rivera, J., Biológicas de la Salud, C., & Ángel Zavala Sánchez, M. (2022). *Efecto antiinflamatorio y antinociceptivo de Verbena officinales en el modelo de edema plantar en ratones CD-1 y formalina 1% en ratas wistar*.
- Priyanka, C., Kumar, P., Bankar, S. P., & Karthik, L. (2015). In vitro antibacterial activity and gas chromatography–mass spectroscopy analysis of Acacia karoo and Ziziphus mauritiana extracts. *Journal of Taibah University for Science*, 9(1), 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.06.007>
- Ramorobi, L. M., Matowane, G. R., Mashele, S. S., Bonnet, S. L., Noreljaleel, A. E. M., Swain, S. S., Makhafola, T. J., & Chukwuma, C. I. (2022). Bioactive synergism between zinc mineral and p-coumaric acid: A multi-mode glycemic control and antioxidative study. *Journal of Food Biochemistry*, 46(10). <https://doi.org/10.1111/jfbc.14360>

- Rasool Hassan, B. A. (2012). Medicinal Plants (Importance and Uses). *Pharmaceutica Analytica Acta*, 03(10). <https://doi.org/10.4172/2153-2435.1000e139>
- Rico Maria de Lourdes. (2001). EL GÉNERO ACACIA (LEGUMINOSAE, MIMOSOIDEAE) EN EL ESTADO DE OAXACA, MÉXICO. *Anales Del Jardín Botánico de Madrid*, 58, 251–275.
- Rodriguez Gil. (2021). *Evaluación del efecto antinociceptivo de fosfoserinas α -metiladas en roedores*. UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MORELOS.
- Saini, M. L., Saini, R., Roy, S., & Kumar, A. (2008a). Comparative pharmacognostical and antimicrobial studies of acacia species (Mimosaceae). In *Journal of Medicinal Plants Research* (Vol. 2, Issue 12). <http://www.academicjournals.org/JMPR>
- Saini, M. L., Saini, R., Roy, S., & Kumar, A. (2008b). Comparative pharmacognostical and antimicrobial studies of acacia species (Mimosaceae). In *Journal of Medicinal Plants Research* (Vol. 2, Issue 12). <http://www.academicjournals.org/JMPR>
- Sanchita, & Sharma Ashok. (2018). Gene Expression Analysis in Medicinal Plants Under Abiotic Stress Conditions. *Plant Metabolites and Regulation under Environmental Stress*, 407–414. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812689-9.00023-6>
- Santander Ingrid. (2018). *Cuantificacion de metabolitos secundarios y capacidad antioxidante en extractos de especies de Acacia (Acacia schaffneri, laevigata y aculeaticarpa)*. Universidad autonoma del estado de hidalgo.
- Santos, J. A., Piccinelli, A. C., Formagio, M. D., Oliveira, C. S., Santos, E. P. Dos, Stefanello, M. É. A., Junior, U. L., Oliveira, R. J., Sugizaki, M. M., & Kassuya, C. A. L. (2017). Antidepressive and antinociceptive effects of ethanolic extract and fruticuline a from salvia lachnostachys benth leaves on rodents. *PLoS ONE*, 12(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172151>
- Sepúlveda Jiménez, Porta-Ducoin, & Rocha Sosa. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatologia*, 21, 355–363. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221317>
- Soto Marilu. (2014). Actividad antinociceptiva y antibacteriana de los alcaloides totales de dos especies de la familia Solanaceae Antinociceptive and antibacterial activity

- of total alkaloids from two species of the Solanaceae family. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(1), 361–373. <http://scielo.sld.cu><http://scielo.sld.cu>
- Tambekar, D. H., Khante, B. S., Chandak, B. R., Titare, A. S., Boralkar, S. S., & Aghadte, S. N. (2009a). SCREENING OF ANTIBACTERIAL POTENTIALS OF SOME MEDICINAL PLANTS FROM MELGHAT FOREST IN INDIA. In *Afr. J. Trad. CAM* (Vol. 6, Issue 3). www.africanethnomedicines.net
- Tambekar, D. H., Khante, B. S., Chandak, B. R., Titare, A. S., Boralkar, S. S., & Aghadte, S. N. (2009b). SCREENING OF ANTIBACTERIAL POTENTIALS OF SOME MEDICINAL PLANTS FROM MELGHAT FOREST IN INDIA. In *Afr. J. Trad. CAM* (Vol. 6, Issue 3). www.africanethnomedicines.net
- Tang, S. A., Ding, L. L., Zhai, H. Y., Qin, N., & Duan, H. Q. (2012). Four new triterpenes from the endemic relict shrub *Tetraena mongolica*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 14(9), 838–843.
<https://doi.org/10.1080/10286020.2012.699525>
- Tissouras, F., Larid, M., & Lotmani, B. (2014a). Antifungal activities of seeds oils *Acacia arabica* and *raddiana* from the Hoggar region (southern Algeria) *Advances in Environmental Biology* Corresponding Auteur: F Antifungal activities of seeds oils *Acacia arabica* and *raddiana* from the Hoggar region (southern Algeria). *AENSI Journals Adv. Environ. Biol*, 8(10), 137–141.
<http://www.aensiweb.com/aeb.html>Tél:+213
- Tissouras, F., Larid, M., & Lotmani, B. (2014b). Antifungal activities of seeds oils *Acacia arabica* and *raddiana* from the Hoggar region (southern Algeria) *Advances in Environmental Biology* Corresponding Auteur: F Antifungal activities of seeds oils *Acacia arabica* and *raddiana* from the Hoggar region (southern Algeria). *AENSI Journals Adv. Environ. Biol*, 8(10), 137–141.
<http://www.aensiweb.com/aeb.html>Tél:+213
- Velázquez-Vázquez, G., Pérez-Armendáriz, B., Daniel Ortega-Martinez, L., & Nelly-Juarez, Z. (2019). Conocimiento etnobotánico sobre el uso de plantas medicinales en la Sierra Negra de Puebla, México. *AROMÁTICAS*, 18(3), 265–276.
<https://doi.org/10.37360/blacpma.19.18.3.17>

- Wei, S. D., Zhou, H. C., & Lin, Y. M. (2011). Antioxidant activities of fractions of polymeric procyanidins from stem bark of *Acacia confusa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(2), 1146–1160. <https://doi.org/10.3390/ijms12021146>
- Wilfredo, J., & Piérola, Z. (2007). *Bases fisiopatológicas del dolor*. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172007000200007
- Woolf, C.J. 2004. Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. *Ann Intern Med*.140:441-451.
- Yu-Tang Tung, Jyh-Horng, Chi-Chang HuangHsiang, Chi PengYa, Ling ChenSuh, Ching YangShang, & Tzen Chang. (2009). *Protective effect of Acacia confusa bark extract and its active compound gallic acid against carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in rats*. <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S027869150900129X?token=DD9E7E8E87CE60BAF9BD7A84997B973DDC059987DCE1FBC1073D2C66B0FA237ED51846DF2A74EDE3FDDC714D790A5794&originRegion=us-east-1&originCreation=20211103202519>