

COMPONENTES NUTRICIONALES Y ANTIOXIDANTES DE DOS ESPECIES DE GUAJE (*Leucaena* spp.): UN RECURSO ANCESTRAL SUBUTILIZADO

Nallely Román-Cortés¹; María del Rosario García-Mateos^{1*}; Ana María Castillo-González¹; Jaime Sahagún-Castellanos¹; Adelina Jiménez-Arellanes²

¹Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. km 38.5 Carretera México-Texcoco. C. P. 56230. Chapingo, Texcoco, Estado de México, México. Correo-e: rosgar08@hotmail.com (*Autor para correspondencia).

²Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales UMAE. Hospital de Pediatría, Siglo XXI IMSS. Av. Cuauhtémoc 330, col. Doctores. C. P. 06720. Delegación Cuauhtémoc, México, D. F.

RESUMEN

El guaje (*Leucaena* spp.) es una planta de vaina y semillas comestibles, un recurso ancestral subutilizado por los pueblos mesoamericanos. El valor nutricional y nutraceutico del guaje se desconoce pese a su consumo vigente en las poblaciones rurales. El objetivo de este trabajo fue evaluar el contenido de minerales, componentes nutricionales y antioxidantes para contribuir a la revalorización alimentaria del guaje rojo (*L. esculenta* Benth.) y verde (*L. leucocephala* Lam.). Los contenidos de antocianinas, flavonoides, fenoles totales, taninos y actividad antioxidante se cuantificaron, así como la composición proximal y mineral. Las semillas de guaje rojo superaron a las de guaje verde en los contenidos de N, Mg, Mn, P y Zn; en contraste, las semillas de guaje verde presentaron niveles mayores de Na y de Fe. El contenido de fibra cruda fue 10.55 y 10.07 % en guaje rojo y verde, respectivamente, mientras que el de proteína fue 33.12 % en guaje rojo y 31.7 % en el verde. El alto contenido de compuestos fenólicos fue mayor en las semillas frescas de guaje rojo (1,088.70 mg equivalentes de ácido gálico [EAG]-100 g⁻¹ p. f.) que en las verdes (969.09 mg EAG-100 g⁻¹ p. f.), pero las últimas presentaron mayor cantidad de taninos. La elevada actividad secuestradora de radicales libres (97.22 a 98.11 %) obtenida por el método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilben-zotiazolin)-6-sulfónico), puede estar asociada al contenido de compuestos fenólicos. En conclusión, las semillas de guaje podrían considerarse un alimento funcional, principalmente las de guaje rojo debido a su calidad nutricional y mayor actividad antioxidante.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: Flavonoides, fenoles totales, taninos, proteína, minerales.

NUTRITIONAL COMPONENTS AND ANTIOXIDANTS OF TWO SPECIES OF GUAJE (*Leucaena* spp.): AN UNDERUTILIZED TRADITIONAL RESOURCE

ABSTRACT

The guaje (*Leucaena* spp.), a leguminous plant with edible seeds, is a traditional resource underutilized by Mesoamerican peoples. The nutritional and nutraceutical value of the guaje is unknown despite being consumed by rural people today in mainly central and southern Mexico. The aim of this study was to assess the mineral, nutritional and antioxidant contents of the red guaje (*L. esculenta* Benth.) and green guaje (*L. leucocephala* Lam.) in order to contribute to a reevaluation of their food properties. Their anthocyanin, flavonoid, total phenol, and tannin contents, as well as their antioxidant activity and proximate and mineral composition, were quantified. Red guaje seeds outperformed green guaje ones in N, Mg, Mn, P and Zn contents; by contrast, green guaje seeds had higher Na and Fe levels. Crude fiber content was 10.55 and 10.07 % in red and green guaje, respectively, while protein content was 33.12 % and 31.7 %, respectively. The high content of phenolic compounds was greater in the fresh red guaje seeds (1,088.70 mg gallic acid equivalents [GAE]-100 g⁻¹ FW) than in the green ones (969.09 mg GAE-100 g⁻¹ FW), but the latter had a greater amount of tannins. The high free radical scavenging activity (97.22 to 98.11 %) obtained by the ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid) method may be associated with the content of phenolic compounds. In conclusion, guaje seeds could be considered as a functional food, but mainly the red guaje ones due to their nutritional quality and higher antioxidant activity.

ADDITIONAL KEYWORDS: Flavonoids, total phenols, tannins, protein, minerals.

INTRODUCCIÓN

Una dieta elevada en alimentos de origen animal y grasas saturadas incrementa el riesgo de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cáncer (Pierart y Rozowzky, 2006), lo que ha generado el interés de promover el consumo de proteínas de origen vegetal (Pamplona-Roger, 2006; Espín *et al.*, 2007). Las leguminosas, al igual que los cereales, frutas y hortalizas tienen componentes que promueven la salud, además del valor nutricional que poseen (Shetti *et al.*, 2009).

En algunos países de América y África, el consumo de leguminosas, en particular de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), ha contribuido a mejorar la mala nutrición de sus habitantes (Reynoso-Camacho *et al.*, 2006; Audu y Aremu, 2011; Duarte-Martino *et al.*, 2012), debido al alto contenido de proteína, vitaminas, minerales y fibra, ya que son alimentos de fácil consumo para la población de bajos recursos (Duarte-Martino *et al.*, 2012). Otra alternativa para tal situación podrían ser aquellas especies subutilizadas como *Leucaena* spp.; sin embargo, su potencial nutricio y nutraceutico no han sido estudiados. Diferentes especies de *Leucaena* se consumen desde épocas remotas en el México prehispánico (Basurto, 2011); después de más de 500 años, aún son un recurso alimentario vigente por su alto contenido en vitamina A, proteína, fibra (Zárate, 1987) y ácidos grasos (palmítico, esteárico, behénico, lignocérico, oleico y linoleico). Las especies de *Leucaena* se conocen comúnmente como *leucaena*, tantan, guaje o huaje según la especie y la región del país donde se consumen (Parrota, 1992; Martínez, 1994). Las especies se encuentran ampliamente distribuidas en el centro y sur de México, particularmente en la península de Yucatán y en el Istmo de Tehuantepec (Zárate, 1999; Grether *et al.*, 2006). Las semillas frescas de guaje son de suma importancia en regiones suburbanas y rurales del país, se consumen crudas o cocidas en platillos tradicionales dependiendo de su frescura o madurez y forman parte de la identidad cultural de algunas entidades (Guerrero y Oaxaca). La calidad nutricia y el contenido de nutraceuticos asociados a la actividad antioxidante de *Leucaena* se desconocen, pero otras leguminosas como el frijol son fuente importante de componentes nutricionales (proteínas, carbohidratos, fibra, vitaminas y algunos minerales) (Reynoso-Camacho *et al.*, 2006; Duarte-Martino *et al.*, 2012), por lo que han llamado la atención como un alimento funcional-nutraceutico, debido a la gran variedad de fitoquímicos (compuestos fenólicos, flavonoides, taninos y ácidos grasos insaturados).

Actualmente, el consumidor prefiere alimentos nutraceuticos o funcionales porque previenen algunas enfermedades degenerativas y mantienen la buena salud, lo que ha ocasionado gran interés de los investigadores para estudiar el contenido de fitoquímicos con actividad antioxidante en granos y leguminosas (Salinas-Moreno *et al.*, 2012). Se han incrementado las evidencias epidemiológicas y farmacológicas de las propiedades nutraceuticas de compuestos biológicamente activos presentes en las plantas comestibles, con-

INTRODUCTION

A diet high in foods of animal origin and saturated fats increases the risk of cardiovascular diseases and some cancers (Pierart and Rozowzky, 2006), which has generated interest in promoting the consumption of plant-derived proteins (Pamplona-Roger, 2006; Espín *et al.*, 2007). Legumes, like cereals, fruits and vegetables, have health-promoting compounds and nutritional value (Shetti *et al.*, 2009).

In some countries of the Americas and Africa, consumption of legumes, particularly of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), has helped to improve the poor nutrition of their inhabitants (Reynoso-Camacho *et al.*, 2006; Audu and Aremu, 2011; Duarte-Martino *et al.*, 2012), due to the high protein, vitamin, mineral and fiber contents, and the fact they are affordable foods for people with low incomes (Duarte-Martino *et al.*, 2012). Another way of coping with the problem of poor nutrition could be to make better use of underutilized species like *Leucaena* spp.; however, its nutritional and nutraceutical potential has not been studied. Different species of *Leucaena* have been consumed since ancient times in prehispanic Mexico (Basurto, 2011); after more than 500 years, they are still consumed today due to their high content of vitamin A, protein, fiber (Zárate, 1987) and fatty acids (palmitic, stearic, behenic, lignoceric, oleic and linoleic). *Leucaena* species are commonly known as *leucaena*, tantan, guaje or huaje depending on the species and region of the country where they are consumed (Parrota, 1992; Martínez, 1994). The species are widely distributed in central and southern Mexico, particularly on the Yucatan Peninsula and the Isthmus of Tehuantepec (Zárate, 1999; Grether *et al.*, 2006). Fresh guaje seeds are of utmost importance in suburban and rural regions of the country, they are eaten raw or cooked in traditional dishes depending on their freshness or maturity and they are part of the cultural identity of some states (Guerrero and Oaxaca). The nutritional quality and nutraceutical content associated with the antioxidant activity of *Leucaena* are unknown, but other legumes such as common bean are important sources of nutritional components (proteins, carbohydrates, fiber, vitamins and some minerals) (Reynoso-Camacho *et al.*, 2006; Duarte-Martino *et al.*, 2012); therefore, they have drawn attention as a functional nutraceutical food, due to the wide variety of phytochemicals (phenolic compounds, flavonoids, tannins and unsaturated fatty acids) present in them.

Currently, consumers prefer nutraceutical or functional foods because they prevent some degenerative diseases and maintain good health, which has generated great interest among researchers to study the content of phytochemicals with antioxidant activity in grains and legumes (Salinas-Moreno *et al.* 2012). Epidemiological and pharmacological evidence of the nutraceutical properties of biologically active compounds present in edible plants has increased, contributing to the prevention and reduction of heart disease, diabetes, hypertension, Alzheimer's disease and ar-

tribuyendo a la prevención y reducción de padecimientos cardiacos, diabetes, hipertensión, Alzheimer y arterioesclerosis, entre otros de origen oxidativo (Tachakittirungrod *et al.*, 2007; Chaturvedi *et al.*, 2011; Kaisoon *et al.*, 2011; Chew *et al.*, 2011). En México existe una gran riqueza productiva y diversidad vegetal, por tanto, es recomendable ampliar las investigaciones de la calidad nutricia y nutraceutica de alimentos autóctonos que contribuyan a la conservación de la identidad cultural del país y a la generación de disponibilidad comercial de especies de cultivo rural como el guaje. Con base en lo antes señalado, el objetivo del presente estudio fue evaluar el contenido de minerales, los componentes nutricionales y antioxidantes para contribuir a la revalorización alimentaria de las especies de guaje rojo (*L. esculenta* Benth.) y guaje verde (*L. leucocephala* Lam.).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las vainas de guaje rojo y verde, sin alteraciones morfológicas y patológicas visibles, se obtuvieron en el mercado municipal de la ciudad de Iguala de la Independencia, Guerrero, México. Las semillas se desprendieron de la vaina, se lavaron en agua corriente y, posteriormente, se enjuagaron con agua destilada.

Cuantificación de minerales

Las semillas se molieron en un molino Thomas-Wiley Mill (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA). La harina se mantuvo en congelación a -20 °C, para análisis posteriores. La harina de las semillas frescas de guaje rojo (0.5 g) y verde (0.5 g) se sometió separadamente a una digestión húmeda con una mezcla diácida ($H_2SO_4:HClO_4$, 4:1 v/v) y peróxido de hidrógeno. La determinación de Al, B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, N y Zn se realizó en un espectrofotómetro de emisión atómica de plasma por inducción acoplada (ICP-AES) VARIAN modelo Liberty II (USA). El contenido de N se determinó por el método colorimétrico mediante la digestión en micro-kjeldahl, descrito por Alcántar y Sandoval (1999).

Análisis proximal

Las semillas se secaron en una estufa a 55 °C y se molieron en molino Thomas-Wiley Mill (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA). Los porcentajes de humedad, lípidos, fibra cruda y ceniza se determinaron mediante los métodos descritos por la AOAC (1998). El contenido de ácidos grasos se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$AG = 0.8(FC)$$

Donde:

AG = Ácidos grasos (%)

FC = Fibra cruda (%)

teriosclerosis, among others of oxidative origin (Tachakittirungrod *et al.*, 2007; Chaturvedi *et al.*, 2011; Kaisoon *et al.*, 2011; Chew *et al.*, 2011). In Mexico there is great plant richness and diversity; it is therefore advisable to conduct further studies on the nutritional and nutraceutical quality of indigenous foods that contribute to the preservation of the country's cultural identity and the marketing of rural crop species such as guaje. Based on the above, the aim of this study was to evaluate the mineral, nutritional and antioxidant contents of the red guaje (*L. esculenta* Benth.) and green guaje (*L. leucocephala* Lam.) species in order to contribute to the revaluation of their food properties.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Red and green guaje pods, without visible morphological and pathological changes, were obtained in the municipal market of the city of Iguala de la Independencia, Guerrero, Mexico. The seeds were removed from the pod, washed in running water and then rinsed with distilled water.

Quantification of minerals

The seeds were ground in a Thomas-Wiley Mill (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA). The flour was kept frozen at -20 °C for later analysis. The flour of the fresh red and green guaje seeds (0.5 g each) was separately subjected to wet digestion with a diacid mixture ($H_2SO_4:HClO_4$, 4:1 v/v) and hydrogen peroxide. Determination of Al, B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, N and Zn was performed using a Varian Liberty II inductively coupled plasma atomic emission spectrophotometer (USA). The N content was determined by the colorimetric method using micro-Kjeldahl digestion, as described by Alcántar and Sandoval (1999).

Proximate analysis

The seeds were dried in an oven at 55 °C and ground in a Thomas-Wiley Mill (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA). The moisture, lipid, crude fiber and ash percentages were determined using the methods described by the AOAC (1998). The fatty acid content was calculated from the following formula:

$$FA = 0.8(CF)$$

Where:

FA= Fatty acids (%)

CF = Crude fiber (%)

Total carbohydrate content was calculated with the formula used by Audu and Aremu (2011):

$$TC = 100 - (CP + L + A)$$

El contenido de carbohidratos totales se calculó mediante la fórmula utilizada por Audu y Aremu (2011):

$$CT = 100 - (PC + L + C)$$

Donde:

CT = Carbohidratos totales (%)

PC = Proteína cruda (%)

L = Lípidos (%)

C = Cenizas (%)

Cuantificación de fitoquímicos

Preparación de extracto metanólico.

Se mezcló 1 g de semilla fresca molida con 10 mL de MeOH acuoso al 80 % (v/v). La mezcla se homogeneizó mediante agitación en un vortex, se sonicó por 15 min a temperatura ambiente, se dejó reposar durante 24 h, y posteriormente se centrifugó por 10 min a 1,409 \times g, para usarse en la cuantificación de los fitoquímicos.

Cuantificación de fenoles

Se tomaron 0.5 mL de extracto metanólico y se agregaron 0.5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu (0.2 N) y 4 mL de una solución de Na_2CO_3 (0.7 M). La mezcla se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 2 h. Se tomaron lecturas de la mezcla en un espectrofotómetro Genesys 10s (Thermoscientific, Florida, USA), para determinar la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm. La concentración de fenoles se calculó a partir de una curva estándar preparada a base de ácido gálico. El contenido total de fenólicos en el extracto se expresó en mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de peso fresco de la muestra ($\text{mg EAG} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ p. f.}$) según el método modificado de Waterman y Mole (1994).

Cuantificación de flavonoides

Se preparó una mezcla con 0.5 mL de extracto metanólico, 1.5 mL de etanol al 95 % (v/v), 0.1 mL de solución de AlCl_3 al 10 % (p/v), 0.1 mL de solución de CH_3COOK (1 M) y 2.8 mL de agua destilada. La mezcla se incubó por 30 min. Posteriormente, la absorbancia se determinó a una longitud de onda de 415 nm. Los flavonoides se cuantificaron a partir de una curva estándar a base de flavona quercetina (Chang *et al.*, 2002). Los resultados se expresaron en mg equivalentes de quercetina por 100 g de peso fresco de la muestra ($\text{mg EQ} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ p. f.}$).

Cuantificación de antocianinas

Se colocaron 200 μL de extracto metanólico en dos tubos de ensayo; en el primero se adicionaron 1.8 mL de una solución amortiguadora de $\text{pH} = 1.0$ (HCl/KCl) y en el segundo tubo se agregaron 1.8 mL de una solución amortiguadora de $\text{pH} = 4.5$ ($\text{CH}_3\text{COOH/CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$). La absorban-

Where:

TC = Total carbohydrates (%)

CP = Crude protein (%)

L = Lipids (%)

C = Ash (%)

Quantification of phytochemicals

Preparation of methanol extract

1 g of fresh ground seed was mixed with 10 mL of 80 % aqueous MeOH (v/v). The mixture was homogenized by stirring in a vortex mixer, sonicated for 15 min at room temperature, left to stand for 24 h and subsequently centrifuged for 10 min at 1,409 \times g, for use in the quantification of the phytochemicals.

Quantification of phenols

0.5 mL of methanol extract were taken and 0.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent (0.2 N) and 4 mL of a Na_2CO_3 solution (0.7 M) were added. The mixture was incubated at room temperature in the dark for 2 h. Mixture readings were taken on a Genesys 10s spectrophotometer (Thermoscientific, Florida, USA) to determine the absorbance at a wavelength of 765 nm. The phenol concentration was calculated on the basis of a standard curve of gallic acid. The total phenolic content in the extract was expressed as mg gallic acid equivalents per 100 g fresh weight of sample ($\text{mg GAE} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$) by the modified method of Waterman and Mole (1994).

Quantification of flavonoids

A mixture with 0.5 mL of methanol extract, 1.5 mL of 95 % ethanol (v/v), 0.1 mL of 10 % AlCl_3 solution (w/v), 0.1 mL of CH_3COOK solution (1 M) and 2.8 mL of distilled water was prepared. The mixture was incubated for 30 min. Subsequently, the absorbance was determined at a wavelength of 415 nm. Flavonoids were quantified on the basis of a standard curve of flavonol quercetin (Chang *et al.* 2002). The results were expressed as mg quercetin equivalents per 100 g fresh weight of sample ($\text{mg QE} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$).

Quantification of anthocyanins

200 μL of methanol extract were placed in two test tubes; in the first, 1.8 mL of a buffer solution of $\text{pH} = 1.0$ (HCl/KCl) were added, and in the second tube, 1.8 mL of a buffer solution of $\text{pH} = 4.5$ ($\text{CH}_3\text{COOH/CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) were added. The absorbance of the mixture in each tube was measured at wavelengths of 510 and 700 nm. The total absorbance (T_a) of the sample was calculated using the following equation:

$$T_a = [(A_{510} - A_{700})_{\text{pH} = 1.0}] - [(A_{510} - A_{700})_{\text{pH} = 4.5}]$$

The concentration of anthocyanins ($\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$) was calculated with the following equation:

cia de la mezcla de cada tubo se midió a longitudes de onda de 510 y 700 nm. La absorbancia total (A_t) de la muestra se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$A_t = [(A_{510} - A_{700})_{pH=1.0}] - [(A_{510} - A_{700})_{pH=4.5}]$$

La concentración de antocianinas ($\text{mg}\cdot\text{litro}^{-1}$) se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{antocianinas} = (A_t \cdot \text{PM} \cdot \text{FD} \cdot 1000) / (\epsilon \cdot 1)$$

Donde:

A_t = Absorbancia total

PM = Peso molecular ($449.2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) del estándar (cianidina-3-glucósido)

FD = Factor de dilución (1)

ϵ = Absortividad molar del estándar ($26,900$)

La concentración se expresó en mg de cianidina-3-glucósido por 100 g de peso fresco ($\text{mg antocianinas}\cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ p. f.}$), según lo descrito por Giusti y Wrolstad (2001).

Cuantificación de taninos condensados

Se pesaron 200 mg de semilla fresca molida y se agregaron 10 mL de solución del HCl en MeOH al 1 % (v/v). La mezcla se mantuvo en agitación constante durante 20 min. Se tomó un 1 mL de la mezcla filtrada y se agregaron 4 mL de una solución de HCl al 8 % en MeOH (v/v) y una solución de vainillina en MeOH al 4 % (v/v) en una proporción 1:1. La mezcla resultante se mantuvo en baño maría a 30°C durante 20 min; finalmente, se midió la absorbancia a 500 nm. Los taninos se cuantificaron mediante una curva estándar a base de catequina (Cardador-Martínez *et al.*, 2011). El contenido total de taninos se expresó como mg equivalentes de catequina en 100 g de peso fresco de la muestra ($\text{mg EC}\cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ p. f.}$).

Cuantificación de la capacidad inhibidora de radicales libres

Método ABTS

El radical ABTS^+ se obtuvo siguiendo la metodología descrita por Re *et al.* (1999). Para ello, se agregaron 6.61 mg de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ a una solución de 10 mL (7 mM) de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilben-zotiazolin)-6-sulfónico), para lograr una concentración 2.45 mM. La mezcla reposó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 h. Posteriormente, se tomó 1 mL de la solución de ABTS^+ y se agregó el volumen necesario de etanol anhidro hasta obtener en la mezcla una absorbancia de 0.7 ± 0.1 a una longitud de onda de 734 nm (máxima concentración de radical ABTS^+ formado). Por otra parte, se tomó 1 mL de la solución de ABTS^+ y se adicionaron 10 μL del extracto metanólico; la mezcla se incubó a baño maría a 30°C en oscuridad por 7 min. Finalmente, se tomó la lectura de la absorbancia de la mezcla a una longitud de onda de 734 nm. La actividad antioxidante se cuantificó a través de una curva estándar a

$$\text{anthocyanins} = (T_a \cdot \text{MW} \cdot \text{DF} \cdot 1000) / (\epsilon \cdot 1)$$

Where:

T_a = Total absorbance

MW = Molecular weight ($449.2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) of tandard (cyanidin-3-glucoside)

DF = Dilution factor (1)

ϵ = Molar absorptivity of the standard ($26,900$)

The concentration was expressed as mg of cyanidin-3-glucoside per 100 g fresh weight ($\text{mg anthocyanins}\cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$), as described by Giusti and Wrolstad (2001).

Quantification of condensed tannins

200 mg of fresh ground seed were weighed and 10 mL of HCl solution in 1 % MeOH (v/v) were added. The mixture was kept under constant stirring for 20 min. Then 1 mL of the filtered mixture was taken and 4 mL of an 8 % HCl solution in MeOH (v/v) and a vanillin solution in 4 % MeOH (v/v) were added at a 1:1 ratio. The resulting mixture was kept in a water bath at 30°C for 20 min; finally, the absorbance was measured at 500 nm. Tannins were quantified on the basis of a standard curve of catechin (Cardador-Martínez *et al.* 2011). Total tannin content was expressed as mg catechin equivalents per 100 g fresh weight of sample ($\text{mg CE}\cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$).

Quantification of the inhibitory capacity of free radicals

ABTS method

The ABTS^+ radical was obtained following the methodology described by Re *et al.* (1999). For this, 6.61 mg of $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ were added to a 10 mL solution (7 mM) of ABTS (2,2'-azino-acid bis (3-etilbenzotiazolin) 6-sulfonic acid) to achieve a 2.45 mM concentration. The mixture stood at room temperature in the dark for 16 h. Subsequently, 1 mL of the ABTS^+ solution was taken and the required volume of anhydrous ethanol added until obtaining in the mixture an absorbance of 0.7 ± 0.1 at a wavelength of 734 nm (maximum concentration of ABTS^+ radical formed). On the other hand, 1 mL of the ABTS^+ solution was taken and 10 μL of methanol extract were added; the mixture was incubated in a water bath at 30°C in the dark for 7 min. Finally, the absorbance reading of the mixture was taken at a wavelength of 734 nm. The antioxidant activity was quantified using a standard curve based on trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid). The results were expressed as mg trolox equivalents per 100 g fresh weight ($\text{mg TE}\cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$). The inhibition percentage of the ABTS^+ free radical was calculated with the formula:

$$\text{Inhibition (\%)} = [(I_a - F_a) / I_a] \cdot 100$$

Where:

I_a = Initial absorbance of the free radical at 734 nm

F_a = Final absorbance of the reaction with the sample

base de trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). Los resultados se expresaron en mg equivalentes de trolox por cada 100 g de peso fresco (mg ET·100 g⁻¹ p. f.). El porcentaje de inhibición del radical libre ABTS⁺ se calculó con la fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = [(A_i - A_f) / A_i] * 100$$

Donde:

A_i = Absorbancia inicial del radical libre a 734 nm

A_f = Absorbancia final de la reacción con la muestra

Método DMPD.

El radical libre DMPD[•] se obtuvo acorde con la metodología descrita por Fogliano *et al.* (1999). Esta se basa en añadir 1 mL de solución 100 mM de DMDP (diclorhidrato de N,N-dimetil-p-fenilendiamina) a 100 mL de una solución amortiguadora ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) para mantener pH de 5.25 y adicionar 200 μL de una solución 0.5 M de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; la mezcla se agitó y se dejó reposar en oscuridad. La absorbancia se leyó a una longitud de onda de 506 nm (A_i = Absorbancia inicial). Posteriormente, se tomó 1 mL de la solución del radical libre DMPD[•] y se adicionaron 50 μL del extracto metanólico, preparado anteriormente. La absorbancia se leyó a una longitud de onda de 506 nm (A_f = Absorbancia final) y los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por cada 100 g de peso fresco (mg EAG·100 g⁻¹ p. f.). El porcentaje de inhibición se calculó empleando la fórmula: % de inhibición = $[1 - (A_f / A_i)] * 100$.

Método DPPH.

Se preparó una solución metanólica al 80 % (v/v) del radical libre DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) a una concentración 100 μM . La absorbancia se midió a 515 nm (A_i = Absorbancia inicial). Se tomaron 2.9 mL de esta solución y se adicionaron 100 μL del extracto metanólico; la mezcla se incubó en oscuridad a 23 °C durante 30 min. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 506 nm (A_f = Absorbancia final) y los resultados se expresaron en mg equivalentes de quercetina por cada 100 g de peso fresco (mg EQ·100 g⁻¹ p. f.). El porcentaje de inhibición se calculó empleando la fórmula: % de inhibición = $[1 - (A_f / A_i)] * 100$ de acuerdo con lo reportado en la metodología de Kim *et al.* (2002).

Análisis estadístico

Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA), prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) y se calculó el coeficiente de correlación de Pearson mediante el programa Statistical Analysis System (SAS, version 9.0, 2003) de acuerdo con un diseño experimental completamente al azar, donde cada muestra seleccionada se consideró como tratamiento del cual se tuvieron seis repeticiones.

DMPD method

The DMPD[•] free radical was obtained according to the methodology described by Fogliano *et al.* (1999). This is based on adding 1 mL of 100 mM DMDP (N, N-dimethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride) solution to 100 mL of a buffer solution ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) to maintain pH 5.25 and add 200 μL of a 0.5 M solution of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; the mixture was stirred and left to stand in the dark. The absorbance was read at a wavelength of 506 nm (I_a = Initial absorbance). Subsequently, 1 mL of the DMPD[•] free radical solution was taken and 50 μL of methanol extract, prepared earlier, were added. The absorbance was read at a wavelength of 506 nm (F_a = Final absorbance) and the results were expressed as mg gallic acid equivalents per 100 g fresh weight (mg GAE·100 g⁻¹ FW). The inhibition percentage was calculated using the formula: % inhibition = $[1 - (F_a / I_a)] * 100$.

DPPH method

An 80 % methanol solution (v/v) of the DPPH[•] (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical was prepared at a 100 μM concentration. The absorbance was measured at 515 nm (I_a = Initial absorbance). Then 2.9 mL of this solution were taken and 100 μL of methanol extract were added; the mixture was incubated in the dark at 23 °C for 30 min. The absorbance was measured at a wavelength of 506 nm (F_a = Final absorbance) and the results were expressed in mg quercetin equivalents per 100 g fresh weight (mg QE·100 g⁻¹ FW). The inhibition percentage was calculated using the formula: % inhibition = $[1 - (F_a / I_a)] * 100$ according to the methodology described by Kim *et al.* (2002).

Statistical analysis

Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's comparison of means test ($P \leq 0.05$), and the Pearson correlation coefficient was calculated using Statistical Analysis System (SAS, version 9.0, 2003) software in accordance with a completely randomized experimental design where each selected sample was considered as a treatment, each of which had six replicates.

RESULTS AND DISCUSSION

Mineral content

Table 1 shows the contents of 12 minerals in the guaje seeds; the content of seven minerals was statistically different ($P \leq 0.05$) between the red and green guajes. The red guaje seeds exceeded the green guaje ones in N, Mg, Mn, P and Zn levels; by contrast, the green guaje seeds showed higher concentrations of Na and Fe. Table 1 also shows some mineral contents reported in other legumes. In this table it can be seen that the Ca and Na contents in the guaje species were higher than those reported for common bean, pea and dry

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de minerales

En el Cuadro 1 se muestra el contenido de 12 minerales en las semillas de guaje; el contenido de siete minerales fue estadísticamente diferente ($P \leq 0.05$) entre el guaje rojo y verde. Las semillas de guaje rojo superaron a las de guaje verde en los niveles de N, Mg, Mn, P y Zn; en contraste, las semillas de guaje verde presentaron mayores concentraciones de Na y de Fe. En el Cuadro 1 también se muestran algunos contenidos minerales reportados en otras leguminosas. En dicho cuadro se puede observar que los contenidos de Ca y Na en las especies de guaje fueron superiores a los reportados para frijol, chícharo y haba seca. Por otra parte, los niveles reportados de Fe, K y Mg en haba superaron a los encontrados en el guaje rojo y verde y en chícharo. Audu y Aremu (2011) determinaron el contenido de minerales en harina de frijol rojo y encontraron que los niveles de Mg superaron a los contenidos en seis cultivares de frijol de Brasil y a los materiales de guaje aquí reportados.

Cabe señalar que las diferencias encontradas en las concentraciones de minerales en los seis cultivares de frijol de Brasil se atribuyen a factores genéticos, condiciones edafoclimáticas y al tipo de cultivo (condiciones hidropónicas) (Reynoso-Camacho *et al.*, 2006; Duarte-Martino *et al.*, 2012), lo cual podría explicar algunas de las diferencias entre las semillas de guaje rojo y verde del presente estudio. Con base en los resultados, el consumo de leguminosas

bean. On the other hand, the reported levels of Fe, K and Mg in broad bean surpassed those found in red and green guaje and in pea. Audu and Aremu (2011) determined the mineral content of red kidney bean flour and found that the Mg levels exceeded the contents in six common bean cultivars from Brazil and the guaje materials reported here.

It should be noted that the differences found in the mineral concentrations in the six Brazilian common bean cultivars are attributed to genetic factors, edapho-climatic conditions and the type of culture (hydroponics) (Reynoso-Camacho *et al.*, 2006; Duarte-Martino *et al.*, 2012), which could explain some of the differences between the red and green guaje seeds of the present study. Based on the results, the consumption of legumes such as guaje seeds represents a low-cost alternative for people to meet their mineral intake requirements.

Proximate analysis

The proximate content of red and green guaje seeds is shown in Table 2. Red guaje seeds outperformed green guaje ones in lipid content, while no significant differences were found in protein and crude fiber levels. Sotelo (1997) carried out a proximate analysis of *L. leucocephala* (green guaje) and reported higher values for moisture, lipids and fibers than those found in this study, but not for carbohydrate and crude protein levels.

Crude fiber values found in red and green guaje exceeded those reported in red kidney bean (3.6 %) (Audu and Aremu, 2011), sorghum (2.10 %) (Giami, 1993), soybean (4.28 %)

CUADRO 1. Contenido de minerales en las semillas de guaje rojo (*Leucaena esculenta*), guaje verde (*L. leucocephala*) y otras leguminosas.

TABLE 1. Mineral content in seeds of red guaje (*Leucaena esculenta*), green guaje (*L. leucocephala*) and other legumes.

Semillas/ Seeds	Mineral (mg·100 g ⁻¹ p. f.)												Referencia
	N	Al	B	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	P	Zn	
Guaje verde/ Green guaje	1,997.30a ^z	0.88a	5.70a	156.80a	0.73a	6.40a	487.90a	105.50a	0.70a	25.20a	254.8a	2.10a	Presente publicación
Guaje rojo/ Red guaje	2,281.40b	0.85a	4.80a	146.90a	0.91a	2.80b	501.30a	173.20b	0.90b	19.10b	345.50b	2.60b	Presente publicación
Frijol negro/ Black bean	-	-	-	134.00	0.00	7.10	146.40	18.20	0.00	8.00	415.00	2.55	Menchú y Méndez (2012)
Chícharo/ Pea	-	-	-	37.00	-	2.80	244.00	33.00	-	5.00	244.00	1.24	Menchú y Méndez (2012)
Haba seca/ Dry broad	-	-	-	48.00	0.82	8.00	1,090.00	190.00	-	11.00	395.00	3.10	Gutiérrez y Matos (2011)
Frijol/ Common bean	-	-	-	129.40	1.70	6.70	1,410.80	205.80	205.80	-	-	-	Duarte-Martino <i>et al.</i> (2012)
Frijol rojo/ Red kidney bean	-	-	-	54.90	0.70	11.50	-	820.90	-	-	-	-	Audu y Aremu (2011)

^zMedias con diferente letra en una misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

^zMeans with a different letter in the same column are statistically different (Tukey, $P \leq 0.05$).

como las semillas de guaje representa una alternativa de la ingesta de minerales a bajo costo para la población.

Análisis proximal

El contenido proximal de las semillas de guajes rojo y verde se muestra en el Cuadro 2. Las semillas de guaje rojo superaron a las de guaje verde en el contenido de lípidos; mientras que en los niveles de proteína y fibra cruda no se encontraron diferencias significativas. Sotelo (1997) hizo el análisis proximal de *L. leucocephala* (guaje verde) y reportó valores de humedad, lípidos y fibra superiores a los encontrados en el presente estudio, excepto los niveles de carbohidratos y de proteína cruda.

Los valores de fibra cruda encontrados en guaje rojo y verde superaron al reportado en semilla de frijol rojo (3.6 %) (Audu y Aremu, 2011), así como a los contenidos en sorgo (2.10 %) (Giami, 1993), frijol de soya (4.28 %) y haba (5.4 %) (Apata y Ologhobo, 1994). Es importante mencionar que el consumo de fibra disminuye los niveles de colesterol y de azúcar en sangre; no obstante, el mecanismo de acción aún no está elucidado (Duarte-Martino *et al.*, 2012).

Las semillas de guaje verde presentaron niveles mayores de carbohidratos que el guaje rojo, frijol de soya, chícharo, haba y frijol rojo (Cuadro 2). El contenido de carbohidratos en guaje rojo y verde coincide con el intervalo (55-65 % p. s.) reportado para leguminosas por Reynoso-Camacho *et al.*

and broad bean (5.4 %) (Apata and Ologhobo, 1994). It is important to mention that fiber consumption lowers cholesterol and sugar levels in the blood; however, the mechanism of action is still unknown (Duarte-Martino *et al.*, 2012).

Green guaje seeds had higher carbohydrate levels than red guaje, soybean, pea, broad bean and red kidney bean seeds (Table 2). The carbohydrate content in red and green guaje coincides with the range (55-65 % DW) reported for legumes by Reynoso-Camacho *et al.* (2006). Some plants of this family contain low levels of digestible carbohydrates and a high proportion of nondigestible carbohydrates (NDC) such as resistant starch, insoluble fiber and nondigestible oligosaccharides (Henningson *et al.* 2001). NDC are associated with a low glycemic response, low cholesterol levels and a decrease in the risk factors for colon cancer, suggesting that increased consumption of legumes with high NDC levels could help reduce the incidence of this disease (Reynoso-Camacho *et al.*, 2006).

The lipid content in both guaje species was higher than that reported for common bean, pea, broad bean, except soybean, red kidney bean and green guaje as reported by Sotelo (1997) (Table 2). Baltes (2007) reports 2 % fat in soybean. Duarte-Martino *et al.* (2012) consider the lipid content in common bean to be very low (0.8-2.32 %) compared to that of other grains.

Legume seeds are rich in proteins and amino acids (Rey-

CUADRO 2. Análisis proximal de la harina de las semillas secas de guaje rojo, verde y otras leguminosas.

TABLE 2. Proximate analysis of the dry seeds of red guaje, green guaje and other legumes.

Semilla / Seed	Humedad/ Moisture (%)	Cenizas/ Ash (%)	Fibra cruda/ Crude fiber (%)	Carbohidratos/ Carbohydrates (%)	Lípidos/ Lipids (%)	Ácidos grasos/ Fatty acids (%)	Proteína cruda/Crude protein (%)	Referencia / References
Guaje verde/ Green guaje	2.07	4.88a ^c	10.07a	61.31a	2.11a	8.056	31.70a	Presente publicación/ This publication
Guaje rojo/ Red guaje	2.09	5.34b	10.55a	57.89b	3.65b	8.44	33.12a	Presente publicación/ This publication
Guaje verde/ Green Guaje	3.70	4.10	13.70	50.10	5.60	-	26.60	Sotelo (1997)
Frijol negro/ Black bean	10.40	3.70	18.37	61.60	1.60	14.69	22.70	Menchú y Méndez (2012)
Chícharo/ Pea	7.50	3.0	6.30	16.90	1.40	8.44	21.30	Moreiras <i>et al.</i> (2013)
Haba/ Broad bean	11.50	3.10	6.40	55.30	2.40	5.12	25.90	Gutiérrez y Matos (2011)
Frijol soya/ Soybean	8.54	4.87	9.30	30.16	19.90	7.44	36.50	Menchú y Méndez (2012)
Frijol rojo/ Red kidney bean	2.40	4.40	3.60	49.0	15.80	12.70	15.30	Audu y Aremu (2011)
Frijol/Common bean	-	4.10	24.40	67.30	1.70	-	23.70	Duarte-Martino <i>et al.</i> (2012)

Carbohidratos (%) = (100 - Total otros componentes). / Carbohydrates (%) = (100 - Total other components).

^aMedias con diferente letra en una misma columna son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$). / ^cMeans with a different letter in the same column are statistically different ($P \leq 0.05$).

(2006). Algunas plantas de esta familia contienen niveles bajos de carbohidratos digestibles y proporción alta de carbohidratos no digestibles (CND) como almidón resistente, fibra insoluble y oligosacáridos no digestibles (Henningson *et al.*, 2001). Los CND se asocian con una respuesta glucémica baja, niveles bajos de colesterol y decremento en los factores de riesgo de padecer cáncer de colon, lo que sugiere que el aumento en el consumo de leguminosas con niveles elevados de CND podría ayudar a reducir la incidencia de dicha enfermedad (Reynoso-Camacho *et al.*, 2006).

El contenido de lípidos en ambas especies de guaje fue superior al reportado para frijol, chícharo, haba, excepto frijol de soya, frijol rojo y al guaje verde señalado por Sotelo (1997) (Cuadro 2). Baltes (2007) reporta 2 % de grasa en el frijol de soya. Duarte-Martino *et al.* (2012) consideran que el contenido de lípidos en frijol es muy bajo (0.8-2.32 %) comparado con el de otros granos.

Las semillas de las leguminosas son ricas en proteínas y aminoácidos (Reynoso-Camacho *et al.*, 2006), aunque carecen o contienen concentraciones muy bajas de aminoácidos azufrados (Audu y Aremu, 2011; Duarte-Martino *et al.*, 2012) y triptófano (la metionina y el triptófano son aminoácidos esenciales indispensables en la dieta humana). Los niveles de proteínas encontrados en guaje rojo y verde superan a los observados en chícharo y en haba seca (Cuadro 2), pero son similares a los reportados en seis cultivares de frijol (15-35 %) cosechados en Brasil (Duarte-Martino *et al.*, 2012). Oakes y Skov (1967) reportaron un contenido inferior de proteína (14.0-16.2 %) en ramas y vainas de *Leucaena* sp. usadas como forraje para vacas y cabras, también fue menor a lo encontrado por Sotelo (1997) en semillas de la especie *L. leucocephala*. Debido a que se desconocen las características nutritivas de las proteínas presentes en guaje, se sugiere realizar estudios posteriores de la calidad de las mismas. La variación en la calidad nutricional de la proteína en las leguminosas, en particular del frijol, depende de factores genéticos, del perfil de aminoácidos esenciales, tiempo de almacenamiento, proceso de cocinado y de sustancias antinutricionales (Duarte-Martino *et al.*, 2012). La alteración de la calidad nutricional de la proteína en las semillas frescas o cocinadas de las especies de guaje se desconoce. Al respecto, Sotelo (1997) señala que, en la mayoría de los casos, el contenido de componentes nutricionales, en particular en las leguminosas silvestres, es similar en las variedades de la misma especie; la diferencia principal radica en el mayor contenido de los factores antinutricionales presentes.

La presencia de sustancias antinutricionales (taninos, lectinas, inhibidores de tripsina y ácido fítico) (Guzmán-Maldonado y Paredes-López, 1998) en leguminosas limitan la aceptabilidad de su consumo. Existen pocos reportes que señalan algunos de los beneficios biológicos de estos metabolitos en soya y lenteja (Reynoso-Camacho *et al.*, 2006); sin embargo, la presencia y contenido de estos fitoquímicos en guaje se desconoce. La presencia de sustancias antinu-

noso-Camacho *et al.*, 2006.), although they lack or contain very low concentrations of sulfur amino acids (Audu and Aremu, 2011; Duarte-Martino *et al.*, 2012) and tryptophan (methionine and tryptophan are essential amino acids vital to the human diet). Protein levels found in red and green guaje exceed those observed in pea and dry bean (Table 2), but are similar to those reported in six common bean cultivars (15-35 %) harvested in Brazil (Duarte-Martino *et al.*, 2012). Oakes and Skov (1967) reported lower protein content (14.0-16.2 %) in branches and pods of *Leucaena* sp. used as fodder for cattle and goats, and it was also lower than that found by Sotelo (1997) in *L. leucocephala* seeds. Since the nutritional characteristics of the proteins present in guaje are unknown, further studies in this regard are suggested. The variation in the nutritional quality of the protein in legumes, particularly common bean, depends on genetic factors, the profile of essential amino acids, storage time, the cooking process and antinutritional substances (Duarte-Martino *et al.*, 2012). The alteration of the nutritional quality of the protein in fresh or cooked seeds of guaje species is unknown. In this regard, Sotelo (1997) notes that, in most cases, the content of nutritional components, particularly in wild legumes, is similar in the varieties of the same species; the main difference lies in the higher content of the anti-nutritional factors present.

The presence of anti-nutritional substances (tannins, lectins, trypsin inhibitors and phytic acid) (Guzmán-Maldonado and Paredes-López, 1998) in legumes limit the acceptability of their consumption. There are a few reports that point out some of the biological benefits of these metabolites in soybean and lentil (Reynoso-Camacho *et al.*, 2006); however, the presence and content of these phytochemicals in guaje are unknown. The presence of antinutritional substances in legumes reduces the nutritional value of the protein, digestibility, mineral bioavailability and amino acid uptake (Duarte-Martino *et al.*, 2012). The anti-nutritional substances are sensitive to heat and processing (Reynoso-Camacho *et al.*, 2006; Duarte-Martino *et al.*, 2012); some of them and their hydrolysis products are beneficial at low concentrations since they favor the reduction of glucose and lipid levels in the blood. Phytic acid, protease inhibitors, saponins, polyphenols and lignans are associated with a decrease in various types of cancer (Duarte-Martino *et al.*, 2012). Some biological benefits have been reported in soybean and lentil (Reynoso-Camacho *et al.*, 2006), but in common bean there is little information in this regard (Reynoso-Camacho *et al.*, 2006). Sotelo (1997) notes the presence of trypsin inhibitors (6.8 TIH·g⁻¹ DW) and lectins (4.0 HAU·g⁻¹), and absence of saponins in *L. leucocephala* seeds. In the foliage of this species the presence of an amino acid (mimosine) toxic to livestock has been described (Brewbaker, 1980; MacDicken, 1988), but it is unknown in the seeds.

Phytochemical content

Figure 1 shows that there are significant differences ($P \leq 0.05$) in antioxidant concentrations between red and green guaje

tricionales en leguminosas reduce el valor nutricional de la proteína, digestibilidad, biodisponibilidad de minerales y la absorción de los aminoácidos (Duarte-Martino *et al.*, 2012). Las sustancias antinutricionales son sensibles al calor y procesamiento (Reynoso-Camacho *et al.*, 2006; Duarte-Martino *et al.*, 2012); algunas de ellas y sus productos de hidrólisis son benéficos a bajas concentraciones ya que favorecen la disminución de los niveles de glucosa y lípidos en la sangre. El ácido fítico, los inhibidores de proteasas, saponinas, polifenoles y lignanos están asociados con la disminución de varios tipos de cáncer (Duarte-Martino *et al.*, 2012). Algunos beneficios biológicos se han reportado en soya y lenteja (Reynoso-Camacho *et al.*, 2006), pero en frijol existe poca información al respecto (Reynoso-Camacho *et al.*, 2006). Sotelo (1997) señala la presencia de inhibidores de tripsina ($6.8 \text{ UIT} \cdot \text{g}^{-1} \text{ p.s.}$) y lectinas ($4.0 \text{ UAH} \cdot \text{g}^{-1}$), y ausencia de saponinas en semillas de *L. leucocephala*. En el follaje de esta especie se ha descrito la presencia de un aminoácido tóxico (mimosina) para el ganado (Brewbaker, 1980; MacDicken, 1988), pero en las semillas se desconoce.

Contenido de fitoquímicos

En la Figura 1 se observa que existen diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en las concentraciones de antioxidantes entre las semillas de guaje rojo y verde. Los niveles de compuestos fenólicos y flavonoides fueron superiores en guaje rojo; mientras que en guaje verde se encontró mayor contenido de taninos condensados (proantocianidinas). El mayor contenido de antocianinas en las semillas de guaje rojo en comparación con guaje verde explica la pigmentación de la testa.

Chanwitheesuk *et al.* (2005) analizaron semillas de guaje verde de Thailandia reportando una concentración menor de taninos (60.6 mg equivalentes de ácido tánico en $100 \text{ g}^{-1} \text{ p. s.}$), como de fenoles (405.0 mg equivalentes de pirocatecol en $100 \text{ g}^{-1} \text{ p. s.}$) a lo encontrado en el presente trabajo; estas diferencias podrían deberse al contenido de humedad en las muestras, a la metodología de análisis y al lugar de origen. En investigaciones de diferentes variedades de frijol cultivado en América y África (Cardador-Martínez *et al.*, 2002; Beninger y Hostfield, 2003; De Mejía *et al.*, 2003; Aparicio-Fernández *et al.*, 2005; Reynoso-Camacho *et al.*, 2006) se describe la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, antocianinas y taninos condensados (proantocianidinas). La presencia de antocianinas, así como el contenido de proantocianidinas, solamente se ha encontrado en la testa de frijoles negros y azul-violeta (Reynoso-Camacho *et al.*, 2006). Los mecanismos de acción de cada fitoquímico en frijol se desconoce, pero el efecto sinérgico de estos bioactivos lo convierten en un alimento con propiedades funcionales notables (Duarte-Martino *et al.*, 2012). Por lo anterior y con base en los contenidos fitoquímicos encontrados, las semillas de guaje rojo, principalmente, podrían considerarse también un alimento económico funcional.

Existen evidencias epidemiológicas que demuestran que la ingesta de alimentos ricos en fenólicos y flavonoides pro-

seeds. The levels of phenolic compounds and flavonoids were higher in red guaje, while a higher content of condensed tannins (proanthocyanidins) was found in green guaje. The higher anthocyanin content in red guaje seeds compared to green guaje ones explains the seed coat pigmentation.

Chanwitheesuk *et al.* (2005) analyzed seeds of green guaje from Thailand, reporting a lower concentration of tannins (60.6 mg tannic acid equivalents in $100 \text{ g}^{-1} \text{ DW}$), and phenols (405.0 mg pyrocatechol equivalents in $100 \text{ g}^{-1} \text{ DW}$) than that found in the present work; these differences could be due to the moisture content in the samples, the analysis methodology and the place of origin. In studies of different common bean varieties grown in the Americas and Africa (Cardador-Martínez *et al.*, 2002; Beninger and Hostfield, 2003; De Mejía *et al.*, 2003; Aparicio-Fernández *et al.*, 2005; Reynoso-Camacho *et al.*, 2006), the presence of phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins and condensed tannins (proanthocyanidins) is described. The presence of anthocyanins and proanthocyanidins has only been found in the seed coat of black and blue-violet common beans (Reynoso-Camacho *et al.*, 2006). The mechanisms of action of each phytochemical in common bean is unknown, but the synergistic effect of these bioactive components make it a

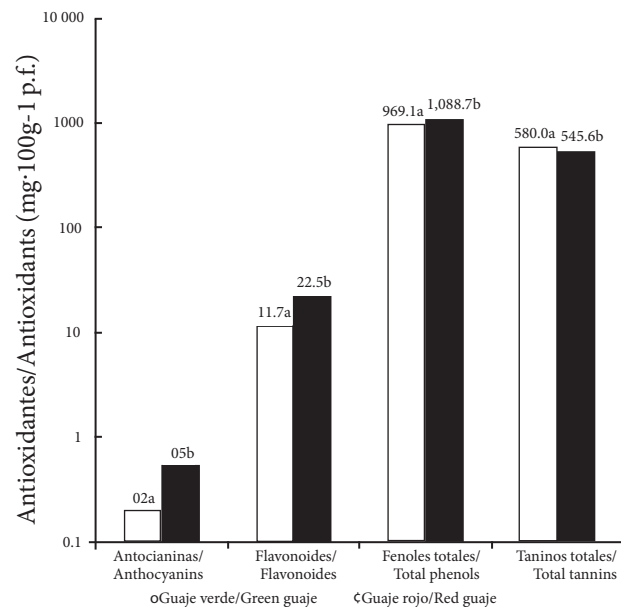


FIGURA 1. Componentes antioxidantes en las semillas de guaje rojo y verde: antocianinas (mg de antocianinas- $100 \text{ g}^{-1} \text{ p. f.}$), flavonoides (mg equivalentes de quercetina- $100 \text{ g}^{-1} \text{ p. f.}$), fenoles totales (mg equivalentes de ácido gálico- $100 \text{ g}^{-1} \text{ p. f.}$), taninos (mg equivalentes de catequina- $100 \text{ g}^{-1} \text{ p. f.}$). ¹Letras diferentes entre barras indican diferencia significativa (Tukey, $P \leq 0.05$).

FIGURE 1. Antioxidant components in red and green guaje seeds: anthocyanins (mg anthocyanins- $100 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$), flavonoids (mg quercetin equivalents- $100 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$), total phenols (mg gallic acid equivalents- $100 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$), tannins (mg catechin equivalents- $100 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$). ²Different letters between bars indicate significant difference (Tukey, $P \leq 0.05$).

tegen al organismo de enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Cartea *et al.*, 2011). Las antocianinas son un tipo de flavonoides presentes como pigmentos en algunos frutos, flores, hojas y en la testa de algunas semillas (Morales, 2011; Tsuda, 2012). Numerosos estudios sugieren que estos metabolitos tienen un rango amplio de propiedades promotoras de salud como antioxidantes (secuestradores de especies reactivas del oxígeno “radicales libres” producidos por el estrés oxidativo en el organismo afectando lipoproteínas, lípidos del plasma sanguíneo y otras biomoléculas) (Prior y Wu, 2006; Tsuda, 2012; Pojer *et al.*, 2013).

Cuantificación de la capacidad inhibidora de radicales libres

En el Cuadro 3 se presenta la actividad antioxidante determinada por tres métodos, los cuales demuestran que los extractos de las semillas de ambas especies de guaje poseen porcentaje elevado de inhibición de los radicales libres (ABTS⁺, DMPD[•] y DPPH[•]). En los tres métodos se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la actividad antioxidante de las dos especies de guaje.

El coeficiente de Pearson ($r = 0.5$) mostró una correlación positiva entre las antocianinas (0.82), fenoles (0.93) y la actividad antioxidante (método ABTS) en las semillas de guaje rojo; en contraste, la actividad antioxidante en guaje verde se correlacionó con los contenidos de flavonoides (0.86) y los compuestos fenólicos (0.59). El alto contenido de compuestos fenólicos encontrado en las semillas de guaje podría explicar la elevada actividad antioxidante, lo cual coincide con Reynoso-Camacho *et al.* (2006), quienes señalan una elevada correlación del contenido de fenólicos con la actividad antioxidante en frijol.

El presente estudio podría considerarse una contribución preliminar al conocimiento de la calidad nutricional y antioxidante, aún no documentada en diferentes especies de guaje, recurso consumido ancestralmente por diferentes pueblos mesoamericanos. Actualmente, el potencial del guaje es poco reconocido; sin embargo, aún forma parte de la identidad cultural y

food with notable functional properties (Duarte-Martino *et al.*, 2012). For this reason and based on the phytochemical contents found, mainly red guaje seeds could also be considered as a functional economic food.

There is epidemiological evidence that shows that eating foods rich in phenolics and flavonoids protects the body from cardiovascular and neurodegenerative diseases (Cartea *et al.*, 2011). Anthocyanins are a type of flavonoid present as pigments in some fruits, flowers, leaves and in the seed coat of some seeds (Morales, 2011; Tsuda, 2012). Numerous studies suggest that these metabolites have a wide range of health-promoting properties as antioxidants (scavengers of oxygen-derived “free radicals” produced by oxidative stress in the body, which affects lipoproteins, blood plasma lipids and other biomolecules) (Prior and Wu, 2006; Tsuda, 2012; Pojer *et al.*, 2013).

Quantification of the inhibitory capacity of free radicals

Table 3 presents the antioxidant activity determined by three methods, which show that the extracts of the seeds of both guaje species possess a high percentage inhibition of free radicals (ABTS⁺, DMPD[•] and DPPH[•]). In all three methods there were significant differences ($P < 0.05$) in the antioxidant activity of the two guaje species.

The Pearson coefficient ($r = 0.5$) showed a positive correlation between anthocyanins (0.82), phenols (0.93) and antioxidant activity (ABTS method) in red guaje seeds; by contrast, the antioxidant activity in green guaje was correlated with the contents of flavonoids (0.86) and phenolic compounds (0.59). The high content of phenolic compounds found in guaje seeds could explain the high antioxidant activity, which coincides with the findings of Reynoso-Camacho *et al.* (2006), who indicate a high correlation between phenolic content and antioxidant activity in common bean.

The present study is a preliminary contribution to the knowledge of the nutritional and antioxidant quality of guaje,

CUADRO 3. Determinación de la actividad antioxidante (AAO) por los métodos ABTS, DMPD y DPPH en los extractos vegetales de las semillas de guaje rojo y verde.

TABLE 3. Determination of antioxidant activity (AOA) by the ABTS, DMPD and DPPH methods in the plant extracts of green and red guaje seeds.

Leguminosa/ Legume	ABTS		DMPD		DPPH	
	AAO (mg ET·100 g ⁻¹ p. f)/ (mg TE·100 g ⁻¹ FW)	Inhibición (%)	AAO (mg EAG·100 g ⁻¹ p. f)/ (mg GAE·100 g ⁻¹ FW)	Inhibición (%)	AAO (mg EQ·100 g ⁻¹ p. f)/ (mg QE·100 g ⁻¹ FW)	Inhibición (%)
Guaje verde/ Greenguaje	565.77 ± 1.3a ^z	97.22 ± 0.2a	265.48 ± 0.7a	95.92 ± 0.2a	140.47 ± 0.08a	94.32 ± 0.04a
Guaje rojo/ Red guaje	570.76 ± 0.7b	98.11 ± 0.1b	267.54 ± 0.2b	96.63 ± 0.07b	135.27 ± 1.1b	91.7 ± 0.6 b

^zLetras diferentes entre filas indican diferencias significativas ($P < 0.05$). ± Desviación estándar de la media. mg ET: miligramos equivalentes de trolox, mg EAG: mg equivalentes de ácido gálico, mg EQ: mg equivalentes de quercetina. /

^zDifferent letters between rows indicate significant differences ($P < 0.05$). ± Standard deviation of the mean. mg TE: miligram trolox equivalents, mg GAE: mg gallic acid equivalents, mg QE: mg quercetin equivalents.

gastronómica de algunos estados de la república mexicana.

CONCLUSIONES

Las semillas de guaje rojo (*L. esculenta*) presentaron mayores niveles de N, Mg, Mn, P y Zn, así como de lípidos, que las de guaje verde (*L. leucocephala*). Las semillas de guaje rojo y verde presentaron niveles similares de proteína y fibra cruda; las dos especies de *Leucaena* tienen mayor contenido de fibra cruda que los reportados en frijol, sorgo, haba y frijol de soya. Por otra parte, las concentraciones de compuestos fenólicos, antocianinas y flavonoides fueron mayores en guaje rojo, mientras que guaje verde presentó niveles mayores de taninos condensados. El alto contenido de compuestos fenólicos en las semillas de guaje de ambas especies podría explicar la elevada actividad secuestradora de radicales libres. Por lo anterior, el guaje es una especie de consumo subvalorado de alto valor nutricional y funcional. Las semillas de guaje rojo podrían considerarse un alimento funcional por su calidad nutricional y el alto contenido de componentes antioxidantes.

LITERATURA CITADA

- ALCÁNTAR, G.; SANDOVAL, V. M. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal. Publicación especial 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A. C. Chapingo, Estado de México, México. 156 p.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1998. Official Methods of Analysis, 16th ed. William, S. Ed.. Published by the Association of Official Analytical Chemist. USA.
- APARICIO-FERNÁNDEZ, X.; YOUSEF, G. G.; LOARCA-PIÑA, G.; GONZÁLEZ DE MEJÍA, E.; LILA, M. A. 2005. Characterization of polyphenolics in the seed coat of Black Jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(11): 4615-4622. doi: 10.1021/jf047802o
- APATA, D. F.; ALOGHOBO, A. D. 1994. Biochemical evaluation of some Nigerian legume seeds. *Food Chemistry* 49: 333-338. doi: 10.1016/j.aoas.2013.07.010
- AUDU, S. S.; AREMU, M. O. 2011. Effect of processing on chemical composition of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flour. *Pakistan Journal of Nutrition* 10(11): 1069-1075. doi: 10.3923/pjn.2011.1069.1075
- BALTES, W. 2007. Química de los alimentos. Mexico, D.F. Editorial Acirbia Zaragoza. 476 p.
- BASURTO, P. F. 2011. Los quelites de México: especies de uso actual, pp. 23-45. In: Especies Vegetales, Poco Valoradas: Una Alternativa para la Seguridad Alimentaria. MERA, O. L. M.; CASTRO, L. D.; BYE, B. R. (eds.). UNAM. México, D. F.
- BENINGER, C. W.; HOSTFIELD, G. L. 2003. Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions, and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(27): 7879-7883. doi: 10.1021/jf0304324.
- BREWBAKER, J. L. 1980. Giant *Leucaena* (Koahaole) Energy Tree Farm. Honolulu, HI: Hawaii Natural Energy Institute. Hawaii. 90 p.
- a resource traditionally consumed by different Mesoamerican peoples. Currently, the potential of the gourd is little known; however, it nonetheless forms part of the cultural and gastronomic identity of some states of the Mexican Republic.

CONCLUSIONS

Red guaje (*L. esculenta*) seeds had higher levels of N, Mg, Mn, P, and Zn, and of lipids, than those of green guaje (*L. leucocephala*). Red and green guaje seeds had similar protein and crude fiber levels; the two *Leucaena* species have higher crude fiber content than those reported in common bean, sorghum, broad bean and soybean. On the other hand, the concentrations of phenolic compounds, anthocyanins and flavonoids were higher in red guaje, while green guaje had higher levels of condensed tannins. The high content of phenolic compounds in the guaje seeds of both species could explain the high free radical scavenging activity. Therefore, the guaje is an undervalued edible species with high nutritional and functional value. Red guaje seeds could be considered a functional food due to their nutritional quality and high content of antioxidant components.

End of English Version

- CARDADOR-MARTÍNEZ, A.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; LOARCA-PIÑA, G. 2002. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) against aflatoxin B1. *Food Additives and Contaminants* 19(1): 62-69. doi: 10.1080/02652030110062110
- CARDADOR-MARTÍNEZ, A.; JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, C.; SANDOVAL, G. 2011. Revalorization of cactus pear (*Opuntia* spp.) wastes as a source of antioxidants. *Ciencia e Tecnología de Alimentos* 31(3): 782-788. doi: 10.1590/S0101-20612011000300036
- CARTEA, M.E.; FRANCISCO, M.; SOENGAS, P.; VELASCO, P. 2011. Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. *Molecules* 16: 251-80. doi: 10.3390/molecules16010251
- CHANG, C.; YANG, M.; WEN, H.; CHERN, J. 2002. Estimation of total flavonoids content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal Food and Drug Analysis* 10(3): 176-182.
- CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAM, N. 2005. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food Chemistry* 92(3): 491-497. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.07.035
- CHATURVEDI, S.; SHARMA, P. K.; GARG, V. K.; BANSAL, M. 2011. Role of Nutraceuticals in health promotion. *International Journal of Pharm Tech Research* 3(1): 442-448. [http://sphinxsai.com/Vol.3No.1/pharm_jan-mar11/pdf/JM11\(PT=74\)%20pp%20442-448.pdf](http://sphinxsai.com/Vol.3No.1/pharm_jan-mar11/pdf/JM11(PT=74)%20pp%20442-448.pdf)
- CHEW, Y. L.; CHAN, E. W.L.; TAN, P. L.; LIM, Y. Y.; STANSLAS, J.; GOH, J. K. 2011. Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular

- Malaysia. BMC Complementary and Alternative Medicine 11(1):1-10. doi: 10.1186/1472-6882-11-12
- DE MEJÍA, E.; GUZMÁN-MALDONADO, S. H.; ACOSTA-GALLEGOS, J. A.; REYNOSO-CAMACHO, R.; RAMÍREZ-RODRIGUEZ, E.; PONS-HERNÁNDEZ, J. L.; GONZÁLEZ-CHAVIRA, M. M.; CASTELLANOS, J. Z.; NELLY, J. D. 2003. Effect of cultivar and growing location on the trypsin inhibitors, tannins and lectins of common beans (*Phaseolus Vulgaris* L.) grown in semiarid highlands of México. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(20):5962-5966. pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf030046m
- DUARTE-MARTINO, H. C.; BIGONHA, S. M.; DE MORAIS, C. L.; DE OLIVEIRA B. R. C.; BRUNORO C. N. M.; RAMÍREZ, C. L. L.; MACHADO, R. R. S. 2012. Nutritional and Bioactive Compounds of Bean: Benefits to Human Health, pp. 233-258. In: *Hispanic Foods: Chemistry and Bioactive Compounds* (ACS Symposium). TUNICK, M. H.; GONZÁLEZ DE MEJÍA, E. (eds.). American Chemical Society, USA. doi: 10.1021/bk-2012-1109
- ESPÍN, J. C.; GARCÍA-CONESA, M. T.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. 2007. Nutraceuticals Facts and fiction. *Phytochemistry* 68(22-24): 2986-3008. doi: 10.1016/j.maturitas.2013.05.006
- FOGLIANO, V.; VERDE, V.; RANDAZZO, G.; RITIENI, A. 1999. Method for Measuring Antioxidant Activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(3): 1035-1040. doi: 10.1021/jf980496s
- GIAMI, S. Y. 1993. Effect of processing on the proximate composition and functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata*) flour. *Food Chemistry* 47(2):153-158. doi: 10.1016/0308-8146(93)90237-A
- GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E. 2001 Unit. F1.2.1-13, Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-Visible spectroscopy. In: WROLSTAD, R.E. (ed.). *Current Protocols in Food Anal.Chem.* John Wiley & Sons: New York. USA. doi: 10.1002/0471142913.faf0102s00
- GRETHER, R. A.; MARTÍNEZ-BERNAL, A.; LUCKOW, M.; ZÁRATE, S. 2006. *Mimosaceae*. Tribu *Mimoseae*. In: *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. DÁVILA, A. P. D.; VILLASEÑOR, R. J. L.; MEDINA, L. R.; TÉLLEZ, V. O. (eds.). Fascículo 44. Instituto de Biología. Universidad Autónoma de México. México, D. F. http://www.ibiologia.unam.mx/barra/publicaciones/floras_tehuacan/F44.pdf
- GUTIÉRREZ, H. K. T.; MATOS, CH. R. A. 2011. Propiedades nutricionales y funcionales de la harina de habas. *Revista de la Universidad Peruana Unión* 1: 1-7.
- GUZMÁN-MALDONADO, S.H.; PAREDES-LÓPEZ, O. 1998. Functional products of plants indigeneous of Latin America: amaranth, quinoa, common beans and botanicals, pp. 293-328. In: *Functional Foods. Biochemical and Processing Aspects*. MAZZA, G. (ed.). Thechnomic Publishing Company. Pennsylvania, USA.
- HENNINGSON, A. M.; NYMAN, E. M.; BJORCK, I. M. 2001. Content of short-chain fatty acids in the hindgut of rats fed processed bean (*Phaseolus vulgaris*) flours varying in distribution and content of indigestible carbohydrates. *British Journal of Nutrition* 86(3): 379-89. doi: 10.1079/BJN2001423
- KAISOON, O.; SIRIAMORNPNUN, S.; WEERAPREEYAKUL, N.; MEESO, N. 2011. Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers from Thailand. *Journal of Functional Foods* 3(2): 88-99. doi: 10.1016/j.jff.2011.03.002
- KIM, D.O.; LEE, K.W.; LEE, H.J. Y LEE, C.Y. 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(13): 3713-3717. doi: 10.1021/jf020071c
- MACDICKEN, K. G. 1988. Nitrogen fixing trees for wastelands. RAPA Publication 1988/9. Bangkok: Food and Agriculture Organization of the United Nations, Regional Office for Asia and the Pacific. Bangkok, Thailandia. 104 p.
- MARTÍNEZ, M. 1994. Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México. 1247 p.
- MENCHÚ, M. T.; MÉNDEZ, H. 2012. Tabla de Composición de Alimentos de Centroamérica/INCAP/ 2da. Edición. Guatemala. 128 p.
- MORALES, A. R. 2011. Frutoterapia: El oro de mil colores. EDAF. Madrid, España. 314p.
- MOREIRAS, O.; CARBAJAL, A.; CABREBRA, L.; CUADRADO, C. 2013. Tablas de Composición de Alimentos. Editorial Pirámide. España. 140 p.
- OAKES, A.J.; SKOV, O. 1967. Yield trials of *Leucaena* in the U.S. Virgin Islands. *Journal of Agriculture University of Puerto Rico* 51: 176-181.
- PAMPLONA-ROGER, G. D. 2006. Encyclopedia of Foods and Their Healing Power: A Guide to Food Science and Diet Therapy. Editorial Safeliz. 447 p.
- PARROTA, J. A. 1992. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, *leucaena*, tantan. US Departament of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experimental Station. New Orleans, L.A. USA. 8 p.
- PIERART, Z. C.; ROZOWSKY, N. J. 2006. Papel de la nutrición en la prevención del cáncer gastrointestinal. *Revista Chilena de Nutrición* 33(1): 8-13. doi: 10.4067/S0717-75182006000100001
- POJER, E.; MATTIVI, F.; JOHNSON, D.; STOCKLEY, C. S.; 2013. The case for anthocyanin consumption to promote human health: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12: 483-508. doi: 0.1111/1541-4337.12024
- PRIOR, R. L.; WU, X. 2006. Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research*. 40: 1014-1028. doi: 10.1080/10715760600758522
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RIVE-EVANS, C. 1999. Antioxidant activity an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26(9/10): 1231-1237. doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3
- REYNOSO-CAMACHO, R.; RAMOS-GOMEZ, M.; LOARCA-PINA, G. 2006. Bioactive Components in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.), pp. 217-236. In: *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*; GUEVARA-GONZÁLEZ, R.; TORRES-PACHECO, I. (eds.). Research Signpost, Trivandrum, India.
- SALINAS-MORENO, Y.; PÉREZ-ALONSO, J. J.; VÁZQUEZ-CARRILLO, G.; ARAGÓN-CUEVAS, F.; VELÁZQUEZ-CAR-

- DELAS, G. A. 2012. Antocianinas y actividad antioxidante en maíces (*Zea mays* L.) de las razas chalqueño, elotes cónicos y bolita. *Agrociencia* 46(7): 693-706. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v46n7/v46n7a5.pdf>
- SAS Institute Inc. 2003. The SAS System for Windows Release 6.12. Cary, N. C. USA.
- SHETTI, A.; KELUSKAR, V.; AGGARWAL, A. 2009. Antioxidants enhancing oral and general health. *Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology* 21(1): 1-6. doi: 10.4103/0972-1363.57770
- SOTELO, A. 1997. Constituents of wild food plants, pp. 89-111. In: *Functionality of Food Phytochemicals*. JOHNS, T.; ROMEO, J. T. (eds.). Plenum Press, New York, USA.
- TACHAKITTIRUNGROD, S.; OKONOGI, S.; CHOWWANAPONPOHN, S. 2007. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chemistry* 103(2): 381-388. doi: 10.1016/j.foodchem
- TSUDA, T. 2012. Dietary anthocyanin-rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Molecular Nutrition and Food Research* 56: 159-70. doi: 10.1002/mnfr.201100526
- WATERMAN, P.G.; MOLE, S. 1994. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Methods in Ecology. Black well Scientific Publications. Oxford, UK. 238 p.
- ZÁRATE, S. 1987. Taxonomic identity of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, with a new combination. *Phylologia* 63(4): 304-306.
- ZÁRATE, S. 1999. Ethnobotany and domestication process of *Leucaena* in México. *Journal of Ethnobiology* 19(1): 1-23. <http://ethnobiology.org/sites/default/files/pdfs/JoE/19-1/Zarate.pdf>