



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE GUAYAQUIL

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS
EXTRACTOS ALCOHÓLICO Y ACUOSO DE LAS HOJAS DE *LEUCAENA
TRICHODES* (JACQ.) BENTH.**

Trabajo de titulación previo a la obtención del

Título de Ingeniera en Biotecnología

AUTORA: GIOMAR ALBÁN RANGEL

TUTORA: CARINA HIDALGO MARTÍNEZ, MSc.

Guayaquil - Ecuador

2023

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Yo, Giomar Albán Rangel con documento de identificación N° 1722163860 manifiesto que:

Soy la autora y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Guayaquil, 18 de agosto del año 2023

Atentamente,



Giomar Albán Rangel

C.I. 1722163860

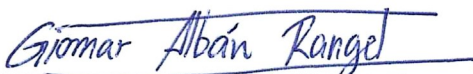
**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, Giomar Albán Rangel con documento de identificación No. 1722163860, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del Trabajo de Titulación, *Trabajos Experimentales*, intitulado: **TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICO Y ACUOSO DE LAS HOJAS DE *LEUCAENA TRICHODES* (JACQ.) BENTH.**, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 18 de agosto del año 2023

Atentamente,



Giomar Albán Rangel

C.I. 1722163860

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Carina Elizabeth Hidalgo Ramírez con documento de identificación N° 1722655519, docente de la Universidad Politécnica Salesiana. declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICO Y ACUOSO DE LAS HOJAS DE *LEUCAENA TRICHODES* (JACQ.) BENTH., realizado por Giomar Albán Rangel con documento de identificación N° 1722163860, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajos Experimentales, que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 23 de agosto del año 2023

Atentamente,



Carina Elizabeth Hidalgo Ramírez

C.I. 1722655519

DEDICATORIA

Con mucho amor a mis padres,

Que creyeron en mí desde el primer día y me han apoyado en cada paso que he dado.

Que me han motivado a seguir adelante y siempre soñar alto.

Que son y siempre serán mi más grande ejemplo a seguir.

A mi hermanita Camila, mi inspiración a ser mejor cada día.

A ella, que está por iniciar su etapa universitaria, le dedico la conclusión de la mía, para decirle que esta nueva etapa de tu vida será emocionante, donde aprenderás cosas nuevas que te apasionen cada día y verás al mundo de forma diferente, llegando a ser la gran profesional que algún día serás, y que compartiremos tu alegría con mucho cariño.

A ellos, a quienes amo profundamente,

Les dedico mi trabajo y mi futura vida profesional.

AGRADECIMIENTO

La experiencia de mi formación universitaria me ha llevado a conocer al mundo desde el punto de vista de la ciencia, y a los profesionales Ingenieros en Biotecnología como buscadores incansables de soluciones a los problemas y desafíos del mundo actual.

Este trabajo, que he realizado con esfuerzo y dedicación, ha sido posible gracias a Dios, que me guía a cada paso que doy.

A mi familia, por su amor inquebrantable, su apoyo incondicional y por ser la razón que me impulsa a ser cada día mejor.

A mi tutora de tesis, Ing. Carina Hidalgo, quien me brindó su guía y apoyo durante el desarrollo de este Trabajo de Titulación.

A mi profesora, Ing. Alejandra de la Cruz, que tuvo la apertura de enseñarme y apoyarme en mi proyecto.

Al Ing. Jaime Naranjo por su orientación brindada en el proceso de Titulación.

A las Auxiliares de laboratorio, Ing. Anggie Auz e Ing. Carla Zamora, cuya disposición constante para asesorar y brindar apoyo en mis prácticas fue esencial para la finalización de mi trabajo.

A todos mis docentes que fueron parte de mi formación profesional, que nos transmitieron sus conocimientos y su vocación hacia la carrera para convertirnos en buenos profesionales.

A mis compañeros, con los que conformamos la primera promoción de Ingeniería en Biotecnología en la Universidad Politécnica Salesiana – Sede Guayaquil, por todas las experiencias en estos cuatro años.

RESUMEN

La especie *Leucaena trichodes* (Jacq.) Benth perteneciente a la familia *Fabaceae* se encuentra presente en las regiones Costa y Sierra del Ecuador. En la presente investigación se determinó la elaboración de dos extractos a partir de las hojas de esta especie utilizando como solventes agua y etanol al 70% mediante la metodología de extracción por ultrasonido a una temperatura de 40°C por 30 minutos. Posterior a su respectiva filtración al vacío se realizó la determinación de presencia de metabolitos secundarios por medio de pruebas de tamizaje fitoquímico: Cloruro Férrico, prueba de espuma, Liebermann-Burchard, Wagner, Mayer, Dragendorff, Shinoda, Baljet y Fehling, obteniendo resultados cualitativos en el extracto etanólico indicando la presencia de triterpenos, esteroides, alcaloides cumarinas, azúcares reductores y compuestos fenólicos, entre ellos taninos, mientras que en el extracto acuoso se observó la presencia de taninos, saponinas, alcaloides y azúcares reductores.

Se determinó la actividad inhibitoria por la metodología de antibiograma por difusión con discos Kirby Bauer de los extractos acuoso y alcohólico en la bacteria Gram negativa *E. coli* ATCC 8739 , donde se obtuvieron porcentajes del extracto acuoso entre 36,13 y 37,50% en las concentraciones 15%, 25%, 50%, 75% y 100% mientras que el extracto etanólico, posterior a la eliminación del solvente por rotavapor solo presentó actividad en las concentraciones 75 % y 100% con un porcentaje de efecto inhibitorio de 30,54% en comparación a la actividad del control positivo trimetoprima-sulfametoxazol.

En el análisis realizado a la bacteria Gram positiva *S. aureus* ATCC 6538 en el extracto acuoso se obtuvieron porcentaje de efecto inhibitorio entre 25,57% y 27,77% en las cinco concentraciones analizadas, mientras que el extracto alcohólico presentó una actividad en el rango de 28,90% y 33,33% en comparación al control positivo.

Los valores obtenidos permitieron establecer que la actividad antimicrobiana es leve en comparación al control positivo, sin embargo, concuerda con el efecto inhibitorio de extractos a partir de las hojas de especies pertenecientes al mismo género y de la familia *Fabaceae* en general. Los resultados obtenidos, en conjunto con la presencia de los metabolitos secundarios estudiados fomentan el estudio de esta especie para futuras aplicaciones biotecnológicas.

Palabras clave: *Metabolitos secundarios, actividad inhibitoria, Leucaena, antibiograma, extracto vegetal.*

ABSTRACT

The species *Leucaena trichodes* (Jacq.) Benth belonging to the Fabaceae family is present in the Coast and Highland regions of Ecuador. In the present investigation, the elaboration of two extracts from the leaves of this species was determined using water and 70% ethanol as solvents through the ultrasound extraction methodology at a temperature of 40°C for 30 minutes. After their respective vacuum filtration, the presence of secondary metabolites was determined by phytochemical screening tests: Ferric Chloride, foam test, Liebermann-Burchard, Wagner, Mayer, Dragendorff, Shinoda, Baljet and Fehling, obtaining qualitative results in the ethanolic extract indicating the presence of triterpenes, steroids, coumarin alkaloids, reducing sugars and phenolic compounds, including tannins, while in the aqueous extract the presence of tannins, saponins, alkaloids and reducing sugars was observed.

The inhibitory activity was determined by the diffusion antibiogram methodology with Kirby Bauer disks of the aqueous and alcoholic extracts in the Gram-negative bacterium *E. coli* ATCC 8739, where percentages of the aqueous extract between 36.13 and 37.50% were obtained in concentrations 15%, 25%, 50%, 75% and 100% while the ethanolic extract, after the removal of the solvent by rotary evaporator, only presented activity in the 75% and 100% concentrations with a percentage of inhibitory effect of 30.54% compared to the activity of the positive control trimethoprim -sulfamethoxazole.

In the analysis carried out on the Gram-positive bacterium *S. aureus* ATCC 6538 in the aqueous extract, an inhibitory effect percentage between 25.57% and 27.77% was obtained in the five concentrations analyzed, while the alcoholic extract presented an activity in the range of 28.90% and 33.33% compared to the positive control.

The values obtained allowed us to establish that the antimicrobial activity is slight compared to the positive control; however, it agrees with the inhibitory effect of extracts from the leaves of species belonging to the same genus and from the Fabaceae family in general. The results obtained, together with the presence of the secondary metabolites studied, encourage the study of this species for future biotechnological applications.

Key words: *Secondary metabolites, inhibitory activity, Leucaena, antibiogram, plant extract.*

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I.....	1
ANTECEDENTES.....	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Planteamiento del problema.....	4
1.3 Delimitaciones.....	5
1.4 Pregunta de investigación.....	5
1.5 Objetivos.....	5
1.5.1 Objetivo General.....	5
1.5.2 Objetivos Específicos.....	5
1.6 Hipótesis.....	5
CAPÍTULO II.....	7
MARCO TEÓRICO.....	7
2.1 Familia Fabaceae.....	7
2.1.1 Generalidades.....	7
2.1.2 Distribución a nivel global.....	7
2.2 Género <i>Leucaena</i>	7
2.3 <i>Leucaena trichodes</i> (Jacq.) Benth.....	8
2.3.1 Distribución.....	9
2.4 Metabolitos Secundarios.....	10

2.4.1	Fenoles.....	10
2.4.2	Flavonoides.....	11
2.4.3	Saponinas.....	12
2.4.4	Triterpenos.....	13
2.4.5	Esteroides.....	14
2.4.6	Alcaloides.....	14
2.4.7	Cumarinas.....	15
2.5	Extractos vegetales.....	16
2.6	Obtención de extractos vegetales.....	16
2.6.1	Extracción por ultrasonido.....	17
2.7	Parámetros fisicoquímicos.....	19
2.8	Tamizaje fitoquímico.....	20
2.9	Antibiograma de difusión por disco.....	20
2.10	<i>Escherichia coli</i>	21
2.11	<i>Staphylococcus aureus</i>	22
CAPÍTULO III.....		23
MATERIALES Y MÉTODOS.....		23
3.1	Tipo y diseño de investigación.....	23
3.2	Población y muestra.....	23
3.3	Variables.....	23

3.3.1	Variable dependiente.....	24
3.3.2	Variable independiente.....	24
3.3.3	Variable interviniente.....	24
3.3.4	Variables extrañas.....	24
3.4	Recolección de datos.....	25
3.5	Protocolos.....	25
3.5.1	Estado del arte.....	25
3.5.2	Recolección de la especie <i>Leucaena trichodes</i>	26
3.5.3	Identificación de la especie.....	27
3.5.4	Limpieza y desinfección.....	28
3.5.5	Obtención del extracto.....	29
3.5.6	Tamizaje fitoquímico.....	31
3.5.6.1	Ensayo de Cloruro Férrico.....	31
3.5.6.2	Prueba de Shinoda.....	33
3.5.6.3	Ensayo de espuma.....	33
3.5.6.4	Ensayo de Wagner.....	34
3.5.6.5	Ensayo de Mayer.....	35
3.5.6.6	Ensayo de Dragendorff.....	36
3.5.6.7	Ensayo de Liebermann – Burchard.....	37
3.5.6.8	Ensayo de Baljet.....	38

3.5.6.9	Ensayo de Fehling.....	38
3.5.7	Determinación de los parámetros fisicoquímicos.....	39
3.5.8	Pruebas antimicrobianas.....	40
3.5.9	Análisis de resultados.....	42
CAPÍTULO IV.....		44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		44
4.1	Identificación de la especie.....	44
4.1.1	Descripción morfológica de las hojas de <i>L. trichodes</i>	44
4.1.2	Comparación de muestras herborizadas	45
4.1.3	Contenido de humedad de las hojas de <i>L. trichodes</i>	46
4.2	Determinación de los parámetros fisicoquímicos.....	47
4.3	Tamizaje fitoquímico.....	49
4.4	Actividad antimicrobiana.....	52
4.5	Análisis estadístico del porcentaje de efecto inhibitorio.....	59
CONCLUSIONES.....		62
RECOMENDACIONES.....		64
BIBLIOGRAFÍA.....		65
ANEXOS.....		86

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A. Localización geográfica de la especie recolectada <i>Leucaena trichodes</i> (Jacq.) Benth. Guayaquil – Ecuador.....	86
ANEXO B. Recolección de la especie <i>Leucaena trichodes</i> (Jacq.) Benth.....	87
ANEXO C. Comparación de muestra de <i>L. trichodes</i> obtenida en la investigación con muestras obtenidas del repositorio Naturalis Biodiversity Center.....	88
ANEXO D. Comparación de muestra de <i>L. trichodes</i> obtenida en la investigación con muestra obtenida del repositorio del Field Museum Botanical Collection.....	91
ANEXO E. Comparación de muestra de <i>L. trichodes</i> obtenida en la investigación con muestra recopilada en el Herbario de la Universidad de South Florida.....	92
ANEXO F. Comparación de muestra de <i>L. trichodes</i> obtenida en la investigación con muestras obtenidas del repositorio del Herbario de la Universidad de Florida.....	93
ANEXO G. Comparación de muestra de <i>L. trichodes</i> obtenida en la investigación con muestra obtenida del repositorio del Herbario Desert Botanical Garden.....	95
ANEXO H. Desinfección, secado, triturado y pulverizado de las hojas frescas de <i>Leucaena trichodes</i> (Jacq.) Benth.....	96
ANEXO I. Prueba preliminar de extractos con concentraciones 1:10 y 1:100.....	97
ANEXO J. Preparación de extractos acuoso y etanólico al 70% a partir de las hojas de <i>Leucaena trichodes</i> (Jacq.) Benth.....	98
ANEXO K. Determinación de parámetros fisicoquímicos.....	100
ANEXO L. Tamizaje fitoquímico.....	101

ANEXO M. Prueba de espuma.....	103
ANEXO N. Antibiograma por difusión con discos de los extractos alcohólico y acuoso de las hojas de <i>L. trichodes</i> en <i>S. aureus</i> ATCC 6538 y <i>E. coli</i> ATCC 8739.....	104
ANEXO Ñ. Análisis estadístico realizado en el programa IBM SPSS Statistics.....	109
ANEXO O. Análisis estadístico general realizado en el programa Statgraphics 19	112
ANEXO P. Análisis estadístico del efecto inhibitorio del extracto acuoso en el microorganismo <i>E. coli</i> ATCC 8739 realizado en el programa Statgraphics 19.....	117
ANEXO Q. Análisis estadístico del efecto inhibitorio del extracto etanólico en el microorganismo <i>E. coli</i> ATCC 8739 realizado en el programa Statgraphics 19.....	119
ANEXO R. Análisis estadístico del efecto inhibitorio del extracto acuoso en el microorganismo <i>S. aureus</i> ATCC 6538 realizado en el programa Statgraphics 19	121
ANEXO S. Análisis estadístico del efecto inhibitorio del extracto etanólico en el microorganismo <i>S. aureus</i> ATCC 6538 realizado en el programa Statgraphics 19.....	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de ácidos fenólicos.....	10
Figura 2. Estructura de los flavonoides (a) y antocianinas (b).....	11
Figura 3. Estructura de las saponinas.....	12
Figura 4. Ejemplos de estructuras tetracíclicas y pentacíclicas de triterpenos.....	13
Figura 5. Ejemplos de estructuras de esteroides.....	14
Figura 6. Ejemplos de alcaloides con su respectiva estructura.....	15
Figura 7. Estructura de las cumarinas.....	16
Figura 8. Gráfico de barras del porcentaje de efecto inhibitorio obtenido en las cuatro pruebas de antibiogramas de difusión por disco realizados en los extractos acuoso y etanólico en las bacterias <i>S. aureus</i> ATCC 6538 y <i>E. coli</i> ATCC 8739.....	61

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Métodos de obtención de extractos.....	17
Esquema 2. Proceso del ensayo de Cloruro Férrico en extractos alcohólico y acuoso...32	
Esquema 3. Protocolo para prueba de Shinoda en extractos acuosos y alcohólicos.....33	
Esquema 4. Protocolo para ensayo de espuma en extractos acuosos y alcohólicos.....34	
Esquema 5. Protocolo para ensayo de Wagner en extractos acuosos y alcohólicos.....35	
Esquema 6. Protocolo para ensayo de Mayer en extractos alcohólicos y acuosos.....36	
Esquema 7. Protocolo para ensayo de Dragendorff en extractos alcohólicos y acuosos..36	
Esquema 8. Protocolo para ensayo de Liebermann - Burchard en extractos alcohólicos.....37	
Esquema 9. Protocolo para ensayo de Baljet en extractos alcohólicos.....38	
Esquema 10. Protocolo para ensayo de Fehling en extractos alcohólicos y acuosos.....39	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Linaje taxonómico de <i>L. trichodes</i> (Jacq.) Benth.....	8
Tabla 2. Determinación de parámetros fisicoquímicos de los extractos etanólico (70%) y acuoso obtenidos de las hojas de <i>L. trichodes</i>	47
Tabla 3. Resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos EA y EE de las hojas de <i>L. trichodes</i>	49
Tabla 4. Diámetro de halo de inhibición de los extractos etanólico (EE) y acuoso (EA) de las hojas de <i>L. trichodes</i> en concentraciones 15, 25, 50, 75 y 100% en la bacteria <i>E. coli</i> ATCC 8739.....	53
Tabla 5. Diámetro de halo de inhibición de los extractos etanólico (EE) y acuoso (EA) de las hojas de <i>L. trichodes</i> en concentraciones 15, 25, 50, 75 y 100% en la bacteria <i>S. aureus</i> ATCC 6538.....	55

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Introducción

Las especies pertenecientes a la familia Leguminosae o Fabaceae comprenden casi 20,000 especies vegetales concentradas en 750 géneros (Llamas & Acedo, 2016). Las especies fabáceas se caracterizan por ser ampliamente diversas, con alta capacidad de resistencia a los cambios climáticos e importancia socioeconómica, al poseer un amplio rango de aplicaciones, como alimento de ganado, obtención de madera para leña, rituales religiosos y medicina tradicional (Jishtu & Goraya, 2020). En el ámbito de la agricultura sostenible, la familia Fabaceae es reconocida por sus propiedades de retención de nitrógeno en suelos áridos y semi áridos (Dubey et al., 2020).

El género *Leucaena* forma parte de la familia Fabaceae, subfamilia *Mimosaceae*, el cual constituye un conjunto de 24 especies vegetales, distribuidas desde la región sur de Estados Unidos, extendiéndose hasta Sudamérica, en la región norte de Perú (Abair et al., 2019).

El género *Leucaena* posee un amplio rango de metabolitos secundarios, como demuestra un estudio realizado a la especie *Leucaena leucocephala* en Malasia, a partir del análisis de extractos con solventes de diferente polaridad con los que fue posible determinar cualitativa el contenido de terpenos, saponinas y compuestos fenólicos, que influyen en la capacidad anticancerígena, diurética, antimicrobiana, antitumoral, antiezcémica, antiinflamatoria, hipocolesterolemia, insecticida, nematocida y pesticida de la especie, por lo que se impulsa la investigación sobre especies de este género para establecer de nuevas aplicaciones en las áreas biotecnológica, biomédica, farmacológica, industrial y agrícola (Zaky & Samling, 2016).

Otra de las propiedades que destaca en las especies de este género corresponde a su propiedad antioxidante, otorgada por la presencia de flavonoides, que permite controlar el estrés oxidativo en casos de pacientes con diabetes o en condiciones inflamatorias según estudios realizados en Nigeria, por lo que se recomienda dirigir la investigación a ese ámbito (Aderogba et al., 2010). Esta propiedad también se evaluó en un estudio realizado en Tailandia a la especie *L. leucocephala*, donde se determinó a partir del extracto etanólico de las semillas su capacidad antioxidante y antidiabética, por el contenido de flavonoides y fenoles que posee (Chowtivannakul et al., 2016).

Se han realizado estudios sobre su capacidad de inhibición en conjunto con otras especies, combinando extractos de *L. leucocephala* con *Aloe vera*, donde se determinó que la combinación de los extractos etanólicos inhibe el crecimiento de bacterias gram negativas como *E. coli* (Rahmadea et al., 2020a). Mientras que, un estudio realizado en México evaluó la actividad inhibitoria de los extractos de polaridad creciente de las semillas de *L. leucocephala* en cepas bacterianas, levaduriformes y hongos filamentosos, lo cual promueve la investigación a especies del género *Leucaena* para el desarrollo fitofarmacéutico (Mora et al., 2021).

Entre las aplicaciones a nivel industrial se encuentra la capacidad de inhibición de la corrosión del acero al ser sumergido en el mar, utilizando extracto de hojas de la especie *L. leucocephala* dado por la presencia de grupos funcionales de hidroxilo y carbonilo, disminuyendo la velocidad de corrosión anual (Ikhmal et al., 2019). También presenta propiedades coagulantes en el tratamiento de aguas residuales, siendo una alternativa renovable, sin consecuencias a la salud humana, a diferencia de los coagulantes de carácter inorgánico como el sulfato de aluminio o cloruro férrico (Kristianto et al., 2019).

En el sector bioenergético, se considera a la especie *L. leucocephala* como una alternativa en el desarrollo de biocombustibles, biorefinería, biogas e incluso etanol por la presencia de fenoles, glicerol, leucenol y glucósidos de flavonol, así como sus altos niveles de densidad energética, estableciéndose como fuente de energía renovable al ser capaz de desarrollarse en ambientes con deficiencia de nutrientes (Alemán-Ramirez et al., 2022).

En el ámbito biomédico destacan estudios donde se propone a *L. leucocephala* para el desarrollo de nanopartículas de óxido de cobre, donde se presentan actividad antimicrobiana, antifúngica y antibiótica por su habilidad catalítica (Aher et al., 2017), o la elaboración de nanopartículas de plata, utilizando solventes acuosos para la obtención del extracto de la especie, con propiedades antimicrobianas que se atribuyen al contenido de esteroides, fenoles, flavonoides, hidratos de carbono y aminoácidos que trabajan como agentes reductores que protegen las nanopartículas brindando estabilidad (Ghotekar et al., 2018).

Como indica el estudio de Deivasigamani (2018) el contenido de metabolitos secundarios en extractos elaborados a partir de diferentes especies puede utilizarse en el área farmacológica, los taninos con sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas y anticancerígenas, las saponinas para condiciones cardiacas, terpenoides con su actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, antiulcerosa, u antimalárica, por lo que tienen un alto potencial fitofarmacéutico.

En Ecuador, es posible encontrar especies del género *Leucaena* como *L. leucocephala* y *L. trichodes* (Aguirre, 2012). La especie *Leucaena trichodes* (Jacq.) Benth corresponde a una especie arbórea que se encuentra en las regiones costa y sierra del país, y se desarrolla en el bosque seco tropical (Naranjo et al., 2019).

Las investigaciones realizadas a fabáceas del mismo género, como *L. leucocephala* demuestran que especies del género *Leucaena* contienen un alto valor medicinal por su presencia de metabolitos secundarios (Satar & Abdul, 2023), por lo que esta investigación se centra en la evaluación de una especie nativa de Ecuador, *L. trichodes* con la finalidad de establecer si posee el potencial para ser aplicada en el desarrollo fitofarmacéutico.

1.2 Planteamiento del problema

Las especies pertenecientes al género *Leucaena* poseen una amplio rango de metabolitos secundarios, en los que se evidencia el contenido de saponinas, alcaloides, triterpenoides, compuestos fenólicos como flavonoides y taninos, que otorgan propiedades antibacterianas, antidiabéticas, antiinflamatorias y antioxidantes, lo cual promueve la investigación para desarrollar nuevas aplicaciones en el ámbito farmacológico, biotecnológico y biomédico (Septina et al., 2020).

En Ecuador, la especie *Leucaena trichodes* (Jacq.) Benth predomina en las provincias de Guayas, Loja y Manabí, en donde sus principales aplicaciones son de carácter tradicional como alimentación para ganado, utilización de madera para trabajos de carpintería, producción de leña, artesanías a partir de sus semillas, o en el ámbito agroforestal como especie fijadora de nitrógeno, sin embargo, carece de investigación dirigida hacia la innovación biotecnológica o el desarrollo farmacológico y biomédico (González, 2021).

La información proporcionada por estudios de la especie *L. trichodes* es limitada, sin embargo, se ha determinado que su composición química es similar a la de *L. leucocephala*, por lo que se propone a la especie *L. trichodes* como alternativa para posibles aplicaciones en el sector productivo e industrial (Sánchez et al., 2007).

1.3 Delimitaciones

Se realizará el estudio de la especie *Leucaena trichodes* (Jacq.) Benth., localizada en la ciudad de Guayaquil - Ecuador, en el kilómetro 19 de Vía a la Costa, donde se realizará la recolección, identificación, tamizaje fitoquímico y análisis del efecto inhibitorio a partir de los extractos EA (Extracto acuoso) y EE (Extracto etanólico) obtenidos a partir de sus hojas, con la finalidad de establecer la detección cualitativa de metabolitos secundarios con propiedades aplicables al ámbito biomédico y farmacológico, de tal forma que investigaciones biotecnológicas futuras permitirán desarrollar un aprovechamiento sustentable de la especie vegetal en el bosque seco tropical.

1.4 Pregunta de investigación

Los extractos alcohólico y acuoso de las hojas de la especie *Leucaena trichodes* (Jacq.) Benth. presentan metabolitos secundarios que otorguen propiedades antimicrobianas con potencial para su aplicación en el ámbito biotecnológico y biomédico?

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo General

Realizar un estudio fitoquímico y de actividad antimicrobiana en los extractos alcohólico y acuoso de las hojas de *Leucaena trichodes* (Jacq.) Benth.

1.5.2 Objetivos Específicos

- Determinar la presencia de metabolitos secundarios mediante tamizaje fitoquímico en los extractos alcohólico y acuoso de las hojas de *L. trichodes*.

- Cuantificar la actividad antimicrobiana en los extractos alcohólico y acuoso de las hojas de *L. trichodes* a través del método de antibiograma por difusión con discos.

1.6 Hipótesis

La presencia de metabolitos secundarios en los extractos alcohólico y acuoso de las hojas de la especie *Leucaena trichodes* (Jacq.) Benth. otorga propiedades antimicrobianas con potencial para su aplicación en el ámbito biotecnológico y biomédico.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Familia Fabaceae

2.1.1 Generalidades

La Familia *Fabaceae* representa la segunda familia de plantas con mayor importancia económica, después de la familia *Poaceae*, siendo esencial en el desarrollo de la sustentabilidad alimenticia por la presencia de proteína vegetal en su composición y calidad nutricional, el ámbito agrícola por su capacidad de fijación de nitrógeno mediante actividad simbiótica con microorganismos fijadores de nitrógeno (Hasanuzzaman et al., 2020). La diversidad en la morfología de sus especies posee un amplio rango desde hierbas enanas a árboles de gran tamaño provenientes de bosques tropicales (Ahmad et al., 2016).

2.1.2 Distribución a nivel global

Actualmente, las especies de la familia *Fabaceae* se encuentran de forma natural o introducida a nivel mundial a excepción de los polos, siendo de principal consumo alimenticio en el Medio Oriente, Asia y Latinoamérica, a diferencia de en Europa y Norteamérica donde son utilizadas primordialmente por su uso medicinal (Usman et al., 2022).

2.2 Género Leucaena

El género *Leucaena* es parte de la familia *Fabaceae* y posee en su clasificación 24 especies que poseen una gran adaptabilidad a condiciones ambientales, a excepción de las temperaturas bajas y suelos áridos, además de poseer buenas características agronómicas, un nivel de tolerancia a la plaga de los psílidos y aplicaciones tradicionales como producción de leña, madera, sombra abono verde, forraje de animales y alimento (Dalzell, 2019).

2.3 *Leucaena trichodes* (Jacq.) Benth

Corresponde a una especie de la clase *Magnoliopsida*, familia Fabaceae, como se indica en la Tabla 1 del linaje taxonómico de la especie.

Tabla 1

Linaje taxonómico de L. trichodes (Jacq.) Benth.

Linaje taxonómico	
Organismo	Organismos celulares
Superreino	Eucariota
Reino	Viridiplantae
Filo	Estreptophyta
Subfilo	Estreptofilina
Clado	Embriófita
Clado	Traqueophyta
Clado	Euphyllophyta
Clado	Espermatofita
Clase	Magnoliopsida
Clado	Mesangiospermae
Clado	Eudicotiledóneas
Clado	Gunneridae

Clado	Pentapetalae
Clado	Rósidos
Clado	Fabids
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Subfamilia	Caesalpinioideae
Clado	Clado mimosoide
Tribu	Mimoseae
Género	Leucaena
Especie	<i>Leucaena trichodes</i> (Jacq.) Benth.

Nota. Información obtenida de (NCBI, 2023).

2.3.1 Distribución

La especie *L. trichodes* es nativa de Ecuador, Colombia Venezuela, Perú, Haití y República Dominicana (POWO, 2023).

En Ecuador es posible encontrar esta especie en las regiones Costa y Sierra, en donde las condiciones en la región Sierra, en este caso en la provincia de Loja condiciones de temperatura anual de 24,5°C, una altitud entre 400 a 1000 msnm y precipitaciones anuales de 600mm en los meses de enero a abril (Septina et al., 2020). En la región Costa, en la cual predomina la distribución de esta especie en Ecuador, se desarrolla en las condiciones del bosque seco tropical corresponden a una precipitación media anual de 1,135mm, temperaturas de 25 a 27°C (Vera et al., 2021).

2.4 Metabolitos Secundarios

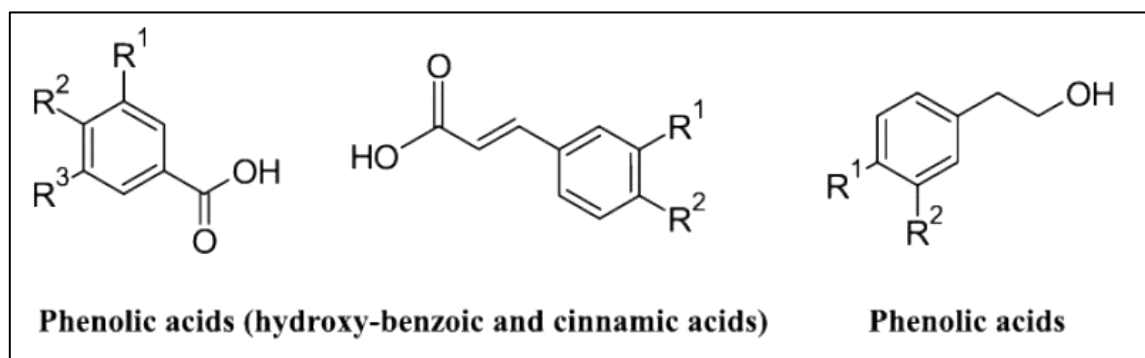
2.4.1 Fenoles

Los compuestos fenólicos corresponden a metabolitos secundarios con un alto potencial farmacológico debido a sus propiedades que actúan en la prevención de enfermedades neurodegenerativas como en el caso del Parkinson y el Alzheimer, además de mejorar o prevenir patologías de carácter neurológico como la pérdida de memoria, desorden de estrés postraumático y daño cerebral isquémico (Veiga et al., 2020).

Estos compuestos destacan por su actividad antibacteriana, anticancerígena, antiinflamatoria y antioxidante, además de promover el sistema inmune, por lo que se fomenta su investigación y aplicaciones en el ámbito farmacológico (Tungmunnithum et al., 2018).

Figura 1

Estructura de ácidos fenólicos.



Nota. Obtenido de (Mutha et al., 2021).

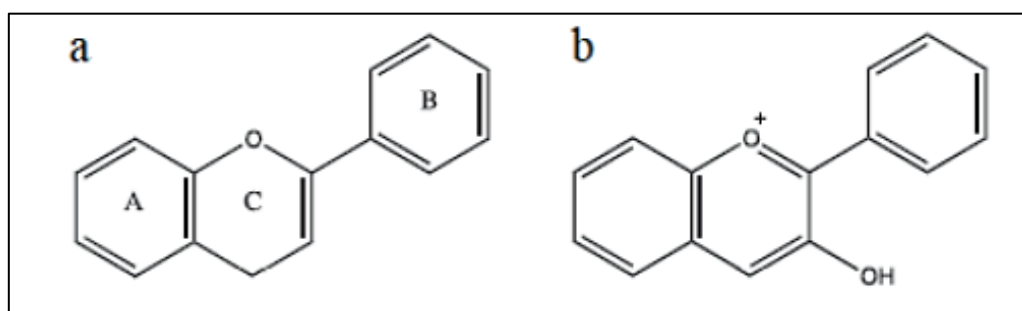
2.4.2 Flavonoides

Los flavonoides corresponden al grupo más extenso de compuestos fenólicos naturales, que se encuentran principalmente como glucósidos producidos en diferentes secciones de las especies vegetales, y destacan por sus actividades antimicrobianas, antioxidantes, antiulcerosos, antiartéuticos, antiangiogénicos, además de prevenir enfermedades cardiovasculares (Sulaiman & Balachandran, 2012).

Los flavonoides se encuentran en la mayoría en las células o superficies de algunos órganos de tejidos vegetales, lo cual permite su contribución a la coloración del vegetal y de sus propiedades, las cuales pueden ser aplicadas en el campo farmacológico, como en el caso de su capacidad antidiabética, al inhibir la absorción de glucosa en el intestino, además de su quimiopreención al influir en la prevención de la oxidación, promover el inicio de la muerte celular y detener del ciclo celular (Mutha et al., 2021).

Figura 2

Estructura de los flavonoides (a) y antocianinas (b).



Nota. Obtenido de (Santos et al., 2021)

Entre las principales funciones de los flavonoides en las especies vegetales se encuentra la capacidad de absorción UV, lo cual las protege contra la radiación, evitan la propagación de

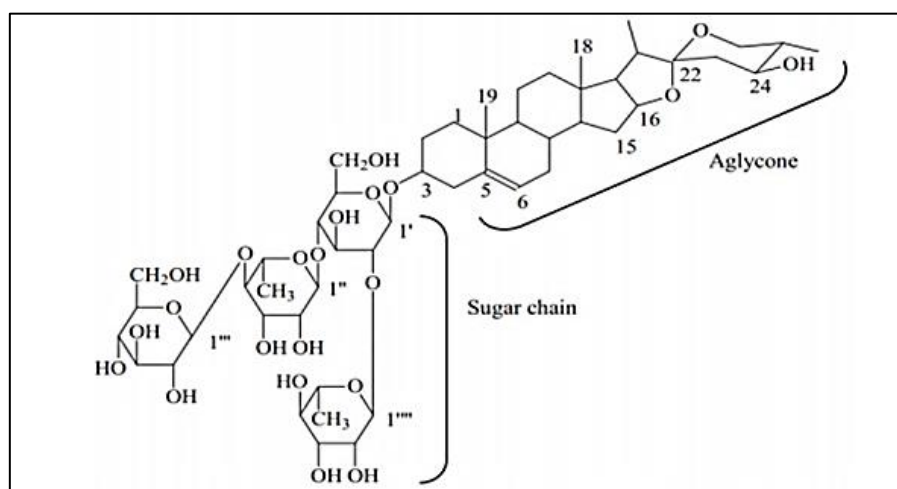
patógenos mediante la producción de isoflavonoles, otorgan color y fragancia a los frutos y fores, fomentando la llegada de polinizadores, por lo que influye en la propagación de la especie y finalmente, es capaz de intervenir en la fijación de nitrógeno al estimular la generación de esporas, así como la quimioatracción de microorganismos rizobios, los cuales en simbiosis con la especie vegetal llevarán a cabo este proceso (Roy et al., 2022).

2.4.3 Saponinas

Las saponinas se dividen en dos subgrupos representados por glucósidos triterpenoides y esteroides, los cuales se diferencian por el número de unidades de azúcar presentes en posiciones específicas, y que poseen propiedades antitumorales, antioxidantes, antitumorales, antidiabéticas y neuroprotectoras, además de reducir el riesgo de enfermedades crónicas degenerativas como la osteoporosis y reducir niveles de colesterol, presión sanguínea (Nguyen et al., 2020).

Figura 3

Estructura de las saponinas.



Nota. Obtenido de (Nguyen et al., 2020).

Los extractos de especies vegetales que poseen saponinas son utilizados en el ámbito farmacológico por sus propiedades antimicrobianas, antibacterianas, antifúngicas, antivirales, por lo que se busca sintetizar fármacos para su intervención como alternativa para tratar enfermedades vasculares y metabólicas (Sharma et al., 2021).

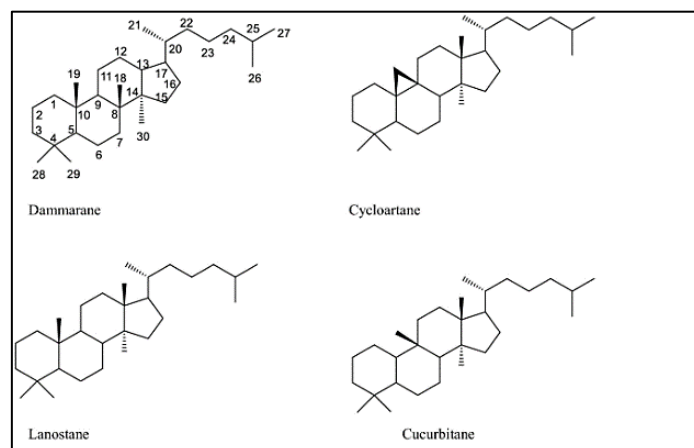
2.4.4 Triterpenos

Los triterpenos corresponden a una división de las saponinas, los cuales destacan por su actividad antiviral, antioxidante, antiplasmodial, antihipeertensivo, anticarcinogénico, antialérgico, hepatoprotector y con capacidad citotóxica frente a líneas celulares cancerígenas (Biswas & Dwivedi, 2019).

Destaca por su capacidad antimicrobiana, por lo que su aprovechamiento a partir de extractos vegetales podría considerarse un aporte a los ámbitos farmacológico y biomédico (Chimshirova et al., 2022).

Figura 4

Ejemplos de estructuras tetracíclicas y pentacíclicas de triterpenos



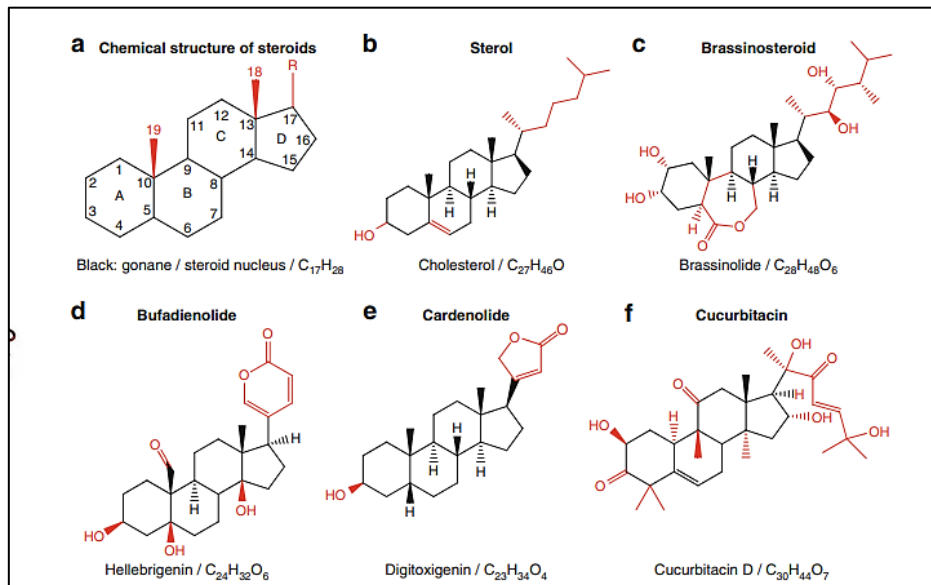
Nota. Obtenido de (Renda et al., 2022).

2.4.5 Esteroides

Los esteroides corresponden a compuestos bioactivos derivados de los terpenoides, los cuales destacan por sus propiedades inmunosupresivas, antimicrobianas y antitumorales, (Tong, 2013).

Figura 5

Ejemplos de estructuras de esteroides



Nota. Obtenido de (Tong, 2013).

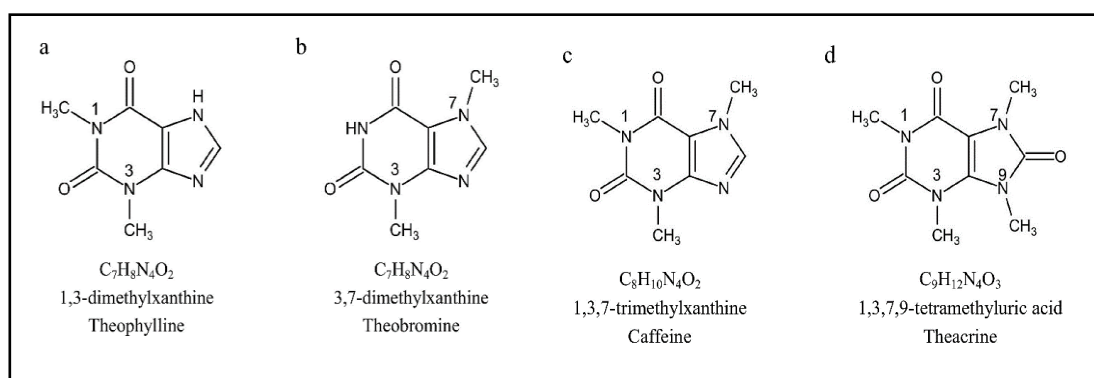
2.4.6 Alcaloides

En las especies vegetales, los alcaloides generan una protección contra los herbívoros, a su vez que evitan que la planta se infecte con alguna cepa bacteriana o fúngica que intente infestar al organismo, y son este tipo de propiedades las que incentivan la investigación de este metabolito secundario en el ámbito de la medicina, toxicología, veterinaria y biotecnología (Adamski et al., 2020).

Los alcaloides poseen propiedades antihipertensivas, sedantes, antiinflamatorias, antidepresivas, antidrogadictas, además de prevenir la arritmia, la trombosis y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y Parkinson, por lo cual se busca potenciar el uso de alcaloides en el ámbito farmacológico (Qin et al., 2021).

Figura 6

Ejemplos de alcaloides con su respectiva estructura.



Nota. Obtenido de (Zhang et al., 2022).

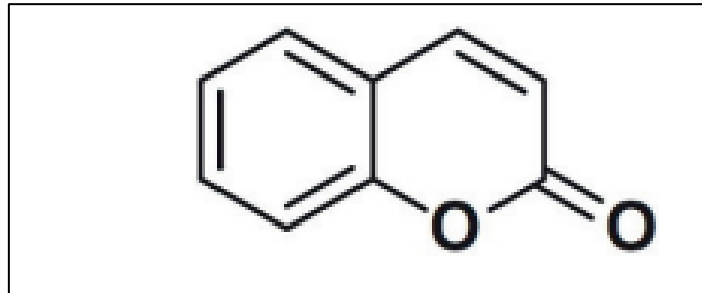
2.4.7 Cumarinas

Las cumarinas son metabolitos secundarios con un amplio rango de propiedades, tales como antimicrobiana, neuroprotectora, anticonvulsionante, anticancerígeno, antiinflamatorio, anticoagulante, antiviral, y utilizado en tratamientos como esclerosis múltiple, por lo que se recomienda su investigación para la formulación de nuevos fitofármacos y alternativas de tratamiento (Jebir & Mustafa, 2021).

Las cumarinas también presentan características antihipertensivas, antiolesterol y se recomiendan en tratamientos para infecciones y desorden intestinal (Santos et al., 2021).

Figura 7

Estructura de las cumarinas.



Nota. Obtenido de (Santos et al., 2021).

2.5 Extractos vegetales

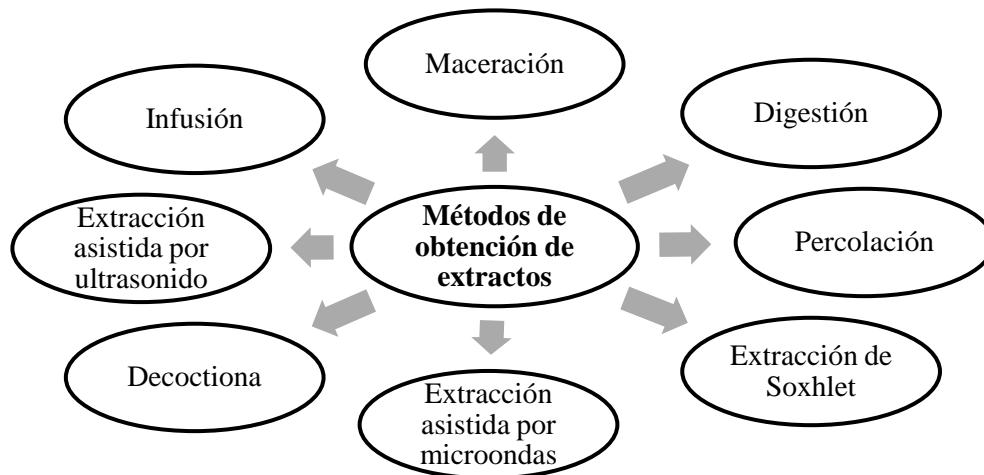
Los extractos corresponden a preparaciones en estado sólido, líquido o concentrados que se elaboran en base a material vegetal seco, que se caracterizan por la presencia de metabolitos secundarios que otorgan propiedades de defensa a la especie vegetal y son estudiados en el ámbito biotecnológico por sus propiedades farmacológicas, que varían según factores como la concentración de la especie seleccionada, la calidad de la muestra obtenida y su metodología de extracción (Serpa, 2021).

2.6 Obtención de extractos vegetales

La preparación de extractos de especies vegetales se realiza cuando poseen metabolitos secundarios con propiedades aplicables de en los ámbitos farmacológicos, biomédicos, cosméticos e industriales (Benítez et al., 2020). Pueden utilizarse solventes polares, donde se incluye agua o alcoholes como el etanol; los solventes polares intermedios como el diclorometano y los no polares como el cloroformo (Abubakar & Haque, 2020).

Esquema 1

Métodos de obtención de extractos



Nota. Información obtenida de (Abubakar & Haque, 2020).

2.6.1 Extracción por ultrasonido

La metodología de ultrasonido consiste en una técnica sencilla, de bajo costo que es capaz de reducir el tiempo de obtención, así como también el disolvente utilizado, lo cual permite incrementar el rendimiento de las extracciones obtenidas a través de la cavitación acústica que produce en el mismo, de forma que permite que el disolvente actúe en la muestra de forma más concentrada (Hernández et al., 2020).

Son las condiciones de extracción presentes en la técnica del baño ultrasónico, como la frecuencia utilizada, la capacidad de sonificación así como la distribución de ondas que permiten que mejore el la calidad de la extracción y su contenido extraído de los metabolitos que contiene la muestra, además que reduce la degradación de fenoles en las muestras vegetales, por lo que se recomienda el ultrasonido para la preparación de extractos en el campo alimenticio, nutracéutico y de salud (Benavides et al., 2020).

Las ondas producidas generan una ruptura mecánica que libera el contenido de las células, lo que permite que se disuelva el solvente en las membranas de las células y un incremento en su transferencia de masa, produciendo resultados más eficaces (Rojas et al., 2019).

Estudios comparativos entre las diferentes metodologías de extracción han determinado que las extracciones realizadas con ultrasonido son unas de las más eficientes en comparación a las técnicas tradicionales para la obtención de metabolitos secundarios en menos de tiempo gracias a sus vibraciones de alta densidad, además de ser más accesible que otras metodologías como la asistencia por microondas, que posee un costo mayor y equipos más complejos, por lo que se recomienda su uso en laboratorio así como a nivel industrial como en el sector alimentario (Azuola & Vargas, 2007).

En investigaciones realizadas sobre el contenido de metabolitos secundarios en extractos con solventes metanólicos realizados a partir de la hoja de curry de Malasia, *M. koeniggi*, donde se concluyó luego de realizar pruebas a diferentes condiciones, que las extracciones obtenidas por ultrasonido a 55,9°C fueron las ideales para cuantificar posteriormente sus metabolitos secundarios (Ghasemzadeh et al., 2014).

En otro estudio dirigido a la determinación de flavonoides utilizando extractos etanólicos obtenidos de las hojas de *Celastrus hindsii* se utilizó la de ultrasonido a una temperatura de 40° por 29 minutos, obteniendo resultados óptimos en la evaluación cualitativa de metabolitos secundarios y en la actividad antioxidante y propiedades anticancerígenas (Pham et al., 2020).

En una investigación relacionada a la determinación de fenoles de extractos vegetales de calabaza *Cucurbita moschata*, y de durazno o *Prunus pérsica*, se determinó que las mejores

condiciones ideales para llevar a cabo la extracción corresponden a una temperatura específica, durante el proceso de ultrasonido, de 41,39°C, por 27,49 minutos (Altemimi et al., 2016).

En la metodología de ultrasonido se debe tener en cuenta la temperatura a utilizar, debido a que la eficacia de extracción incrementa a cuando la temperatura aumenta de 15°C a 45°C, sin embargo, una vez que supera los 45°C comienza a reducir su rendimiento y se puede generar una volatilización de los compuestos a estudiar, así como del solvente utilizado (Esclapez et al., 2011).

En un artículo realizado en extractos de espinaca *Spinacia oleracea* para la detección del contenido de alcaloides, compuestos fenólicos, saponinas y terpenos, se llegó a la conclusión que las mejores condiciones de extracción son a una frecuencia de ultrasonido de 37kHz a una temperatura de 40°C por 30 minutos (Altemimi et al., 2015).

2.7 Parámetros fisicoquímicos

Para proceder con la medición fisicoquímica de los extractos, se requiere realizar la cuantificación de pH para conocer la intensidad de acidez o alcalinidad de los extractos, que consiste en la medición de la actividad que poseen los iones de H, la cual depende de las cantidades relativa de hidrógeno adsorbido y de iones metálicos (Tak & Kakde, 2017).

Se realizó una prueba de densidad, que comprende donde se contrastan valores de masa y su respectivo volumen (Raviolo et al., 2022). Se utilizará un picnómetro para la determinación de la densidad en los EE y EA de las hojas de *L. trichodes*.

Se determinó el porcentaje de humedad a partir de una muestra obtenida de la especie de estudio que consistía en hojas frescas, con las que se realizaron los extractos con la finalidad de observar si estas se encuentran dentro de los parámetros normales para hojas, que se encuentra

en el rango entre 20 y 75%, además de analizar otros parámetros como el aroma, el cual se considera *sui generis* si es propio de la especie, color y aspecto de los extractos obtenidos (Hurtado et al., 2015).

2.8 Tamizaje fitoquímico

Corresponde a un estudio cualitativo que permite detectar metabolitos secundarios de una extracto (Camba et al., 2022). Las pruebas a realizar son: prueba de Wagner para determinar alcaloides, ensayo de Shinoda para flavonoides, Cloruro férrico para compuestos fenólicos y la prueba de espuma para saponinas (Soto, 2015).

2.9 Antibiograma de difusión por disco

La metodología utilizada para evaluar la actividad antimicrobiana de compuestos, conocida como antibiograma de difusión por discos o prueba de Kirby Bauer desempeña un papel fundamental en el contexto clínico, debido a que permite realizar una evaluación de la resistencia o sensibilidad exhibida por los microorganismos frente a tratamientos específicos (Truong et al., 2021).

Esta metodología es utilizada en el ámbito investigativo para conocer la capacidad inhibitoria de extractos naturales de origen vegetal y aceites esenciales, mediante la utilización de discos de sensibilidad permitiendo la difusión del componente a analizar (Abril, 2023).

La prueba de difusión por disco, también conocida como ensayo de Kirby Bauer se basa en utilizar discos de papel filtro de 6mm en donde se impregna una concentración específica del compuesto antimicrobiano, el cual se coloca en una placa del agar Mueller Hinton con la bacteria inoculada, de forma que al colocarse en la estufa, se llevará a cabo de forma simultánea el crecimiento del microorganismo en el agar y la difusión del componente antimicrobiano a

partir de los discos en el agar circundante, por lo cual posterior a un tiempo mínimo de 10 horas será posible observar la formación de un círculo delimitado alrededor del disco con ausencia de crecimiento, lo cual según el diámetro del halo se indicará que el microorganismo posee sensibilidad o resistencia al mismo (Hudzicki, 2009).

Para llevar a cabo este estudio se seleccionaron dos microorganismos patógenos frecuentes en infecciones: *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Ambas especies microbianas han sido establecidas como dos de las causas principales de infecciones invasivas registradas en hospitales, representando un problema de salud que va desde infecciones comunes a casos graves de bacteremia, que se desarrolla en mayor proporción en adultos mayores de 65 años (Poolman & Anderson, 2018). Debido a la constante aumento de resistencia en antibióticos a estas bacterias, es importante buscar nuevas alternativas que permitan su inhibición (Molton et al., 2013).

Las cepas ATCC utilizadas en este estudio se han aplicado en estudios previos de actividad antibacteriana a partir de sustancias orgánicas con potencial inhibitorio como en el caso de los extractos naturales (Kalpana et al., 2013). Mediante la metodología de difusión por discos Kirby Bauer, las cepas utilizadas han permitido determinar la capacidad de inhibición de extractos acuosos y etanólicos a 70% a partir de hojas de especies pertenecientes a diferentes familias (Pirvu et al., 2014), por lo que se las consideró para este estudio.

2.10 *Escherichia coli*

Este microorganismo pertenece a la familia Enterobacteriaceae y corresponde a la una bacteria Gram negativa predominante en el tracto gastrointestinal, la cual mantiene una relación mutualista con su huésped, sin embargo, es clasificado también como uno de los patógenos más

comunes que producen un amplio rango de enfermedades al ser un microorganismo versátil capaz de desarrollarse en condiciones anaerobias y aerobias (Allocati et al., 2013).

Entre las complicaciones en el ámbito médico que otorga este microorganismo se encuentran enfermedades gastrointestinales, infecciones en el tracto urinario, sepsis y meningitis, y su metodología de patogenicidad se basa en la adherencia a receptores específicos de otras células, colonización en tejidos y mucosas, daño a células y evasión de defensas del cuerpo, y a pesar que los antibióticos son los principales fármacos para tratar infecciones de tipo bacteriano, estos microorganismos generan resistencia a los mismos, por lo que se fomenta el uso de componentes provenientes de una fuente natural como los extractos de origen vegetal y el aceite esencial que pueden ser obtenidos a partir de diferentes partes de una especie vegetal para obtener su actividad farmacológica (Aminzare et al., 2017).

2.11 *Staphylococcus aureus*

Este microorganismo corresponde a una bacteria Gram positiva capaz de generar diversas enfermedades por metodología supurativa y no supurativa, en donde se encuentran infecciones dérmicas osteoarticulares, además de otros casos como septicemia, endocarditis infecciosa, neumonía e infecciones al sistema nervioso central (Ondusko & Nolt, 2018).

Al ser una bacteria patógena que genera un nivel de mortalidad elevado, se buscan alternativas para tratar de mitigar la enfermedad en las que la bacteria no demuestre resistencias múltiples a antibióticos, lo cual los vuelve ineficaces, por lo que se induce al desarrollo de productos naturales con propiedades antimicrobianas que permitirían mediante las propiedades otorgadas por sus metabolitos secundarios, convertirse en agentes efectivos para el tratamiento contra estos microorganismos (Li et al., 2019).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Tipo y diseño de investigación

El enfoque utilizado en este estudio se clasifica como una investigación de tipo descriptivo y correlacional, de forma que se analiza la de forma cualitativa los metabolitos secundarios presentes en la especie de estudio, *Leucaena trichodes* (Jacq.) Benth. a su vez se determinan los parámetros fisicoquímicos de los extractos obtenidos, y estos resultados se relacionan con la capacidad que poseen los extractos de reflejar actividad inhibitoria de crecimiento frente a las bacterias *E. coli* y *S. aureus*, para establecer si los metabolitos secundarios presentes poseen propiedades antimicrobianas que permitan establecer un alto potencial de aplicaciones a nivel biotecnológico y biomédico de los extractos estudiados.

3.2 Población y muestra

La población de esta investigación se encuentra en el Campus María Auxiliadora de la Universidad Politécnica Salesiana, Km 19 de Vía a la Costa, en la ciudad de Guayaquil – Ecuador, en las coordenadas 2°11'47.4"S 80°02'36.1"W. En el sitio de recolección se encuentra la especie de estudio *Leucaena trichodes* (Jacq.) Benth. de la cual se realizará la obtención de las muestras correspondientes para su identificación y análisis fitoquímico y antimicrobiano.

3.3 Variables

Las variables son de tipo cualitativo en el análisis de tamizaje fitoquímico y cuantitativo en los resultados de los parámetros fisicoquímicos de los extractos y en los resultados de la

actividad antimicrobiana donde obtienen los valores de diámetro del halo de inhibición y su porcentaje de efecto inhibitorio.

3.3.1 Variable dependiente

Las variables dependientes de este estudio corresponden a la actividad antimicrobiana, la cual evalúa la capacidad de los extractos alcohólico y acuoso de las hojas de la especie *L. trichodes* de inhibir el crecimiento de microorganismos y el contenido fitoquímico de los extractos analizados.

3.3.2 Variable independiente

La variable independiente corresponde al tipo de extracto, la cual se encuentra constituida por dos clases extracto alcohólico y extracto acuoso, de los cuales se espera contrastar los resultados.

3.3.3 Variable interviniente

La variable interviniente corresponde al tipo de microorganismos utilizados en la prueba, debido a que dependiendo del microorganismo utilizado se puede obtener una mayor o menor susceptibilidad a los extractos.

3.3.4 Variables extrañas

Las variables extrañas corresponden a las condiciones ambientales presentes durante el cultivo y recolección de las hojas de *L. trichodes*, las cuales no son posibles de controlar ni son el enfoque principal del estudio, sin embargo, su presencia puede tener influencia en el estudio realizado.

3.4 Recolección de datos

La recolección de los datos presentes en este estudio son la combinación de técnicas y herramientas que inician desde el estado del arte en el que se consultó información bibliográfica proveniente de artículos científicos, publicaciones del área de estudio, libros, información obtenida de repositorios de herbarios a nivel internacional, bases de datos e investigaciones previas. También se recolectaron datos que corresponden al resultado de la parte experimental realizada in situ en la obtención de muestras de las hojas de la especie y en el laboratorio durante los análisis fitoquímico y antimicrobiana, registrados con cámara fotográfica, bitácora para registrar resultados obtenidos y el uso de un ordenador para la redacción del trabajo final de grado.

3.5 Protocolos

Se ejecutó la sección experimental de este estudio mediante la aplicación un conjunto de metodologías y protocolos en base a la revisión bibliográfica exhaustiva realizada, que se encuentran detallados en el Capítulo III, donde se encuentran las bases utilizadas para establecer la metodología de recolección, secado y pulverización de la especie, obtención de extractos, determinación de parámetros fisicoquímicos, estudio fitoquímico y evaluación de la actividad inhibitoria.

3.5.1 Estado del arte

En esta estudio se realizó un minucioso proceso de revisión bibliográfica de la familia *Fabaceae* y el género *Leucaena*, con el objetivo de conocer sobre sus metabolitos secundarios principales y sus aplicaciones dirigidas al sector productivo, agroindustrial, biomédico y biotecnológico. Esta revisión bibliográfica permitió identificar los principales compuestos

bioactivos que poseen estas especies y su potencial en base a las propiedades que otorgan a la especie.

Se realizó un estudio bibliográfico sobre la actividad antimicrobiana que poseen las especies del género *Leucaena*, y las aplicaciones en el ámbito biomédico y agroindustrial, donde se busca conseguir la inhibición de microorganismos a través de fuentes naturales que no generen un impacto negativo en la salud humana o a nivel ambiental. También se indagó en la literatura sobre la especie *L. trichodes*, su presencia en Ecuador, las condiciones ambientales en las que se presenta y estudios previos sobre su composición.

3.5.2 Recolección de la especie *Leucaena trichodes*

Se realizó la recolección cuidadosa de la especie en su hábitat natural, correspondiente al sitio de recolección: Campus María Auxiliadora de la Universidad Politécnica Salesiana, Km 19 de Vía a la Costa, en la ciudad de Guayaquil – Ecuador, en las coordenadas 2°11'47.4"S 80°02'36.1"W.

Durante esta fase se realizaron dos formas de recolecciones esenciales para esta investigación: En primer lugar, se realizaron recolecciones de ocho muestras, en las cuales se podían visualizar las características morfológicas de sus hojas, organización estructural de los folíolos y la presencia de inflorescencias, y se procedió a herborizar cada una de las muestras, con la finalidad de estudiar sus estructuras y realizar una comparación bibliográfica con muestras presentes en repositorios digitales de Herbarios a nivel internacional para realizar una identificación adecuada de la especie. En segundo lugar, se obtuvieron muestras de las hojas de la especie estudiada, destinadas a la obtención de extractos alcohólico y acuoso para su posterior estudio fitoquímico y antimicrobiano.

3.5.3 Identificación de la especie

Se procedió a la preparación del material vegetal recolectado para su identificación, mediante la técnica de prensado fue posible preservar la estructura y disposición de los foliolos presentes en las muestras recolectadas. La herborización de las muestras permitió que se realice una observación detallada de sus estructuras, donde se realizó una descripción morfológica de las mismas utilizando como referencia la información proporcionada por el libro “*Botánica, morfología, taxonomía y fitogeografía*” donde se especifican los aspectos correspondientes de las hojas de una especie vegetal para la respectiva descripción (Troiani et al., 2017).

Posterior a la selección de las ocho muestras herborizadas se procedió a una rigurosa revisión bibliográfica, donde se obtuvieron a partir de la recopilación de datos ocho muestras provenientes de repositorios digitales de herbarios a nivel internacional. El propósito principal de esta revisión fue observar, comparar e identificar a la especie *L. trichodes*, evaluando las estructuras de las muestras a nivel morfológico y la organización de los foliolos entre muestras recolectadas en este estudio con la información de los bancos de datos. Este proceso de validación se realizó para determinar identidad taxonómica de la especie recolectada y observada, en relación con la información recopilada en los repositorios de herbarios a nivel global.

Para complementar la identificación, se realizaron pruebas por triplicado de contenido de humedad a partir de muestras de 1 gramo de hojas frescas de la especie estudiada utilizando la balanza de humedad MB23 Moisture Analyser de la marca OHAUS, con la finalidad de conocer si clasifican dentro de la categoría normal del porcentaje de humedad para hojas frescas de 20 a 75% (Hurtado et al., 2015), y si los resultados de esta investigación poseen concordancia con la revisión bibliográfica realizada a estudios de la especie del mismo género, *Leucaena*

leucocephala que posee un contenido de humedad de 74,3%, lo cual se considera calidad propia del género *Leucaena* (Yige et al., 2012).

3.5.4 Limpieza y desinfección

La limpieza de las hojas frescas obtenidas en el sitio de recolección se realizó a partir de una limpieza inicial con agua destilada para la eliminación de partículas o contaminantes que se encuentren en las hojas, después se realizó una desinfección con hipoclorito de sodio al 5% por tres minutos. Una vez finalizado el proceso se realizaron dos enjuagues adicionales con agua destilada para asegurar la eliminación de agentes desinfectantes.

Para calcular la proporción entre hipoclorito de sodio al 5% del desinfectante a utilizar con el agua destilada a utilizar para la desinfección de las hojas de *L. trichodes* se utilizó la fórmula de dilución de soluciones:

$$V_1 C_1 = V_2 C_2$$

$$C_2 = 200 \text{ ppm (para desinfección de material vegetal)}$$

$$V_2 = 1 \text{ Lt (Volumen de la solución a preparar)}$$

$$C_1 = 50000 \text{ ppm (5\% de hipoclorito de sodio)}$$

$$V_1 = (C_2 * V_2) / C_1$$

$$V_1 = (200 * 1) / 50000$$

$$V_1 = 1 / 250$$

$$V_1 = 4 \text{ ml}$$

Por lo que se concluyó utilizar 4 mililitros de Hipoclorito de sodio al 5% en 996 mililitros de agua destilada. Posterior a la etapa de limpieza y desinfección se realizó el secado de las hojas, el cual primero consistió en secar a las hojas a la intemperie con luz indirecta por 7 días y luego secarlas en una estufa a 30°C por 72 horas (Zaky et al., 2016). En esta etapa se aseguró un secado completo y uniforme de las hojas.

Una vez obtenido el material vegetal seco, se utilizó una licuadora para el triturado y pulverización, resultando en una muestra pulverizada y homogénea de las hojas secas de *L. trichodes*, con su desinfección correspondiente para asegurar el nivel de calidad de los análisis fitoquímicos y antimicrobianos.

3.5.5 Obtención del extracto

Se obtuvieron 70g de hojas pulverizadas proveniente de la especie *L. trichodes*, con lo cual se trabajaría para la elaboración de los extractos EE y EA.

Se llevaron a cabo pruebas preliminares para determinar la concentración adecuada a utilizar. Se realizaron ensayos con concentraciones de 1:100 y 10:100 g/v. La preparación de ensayos de prueba consistió en preparación de 0,1 gramo de material vegetal en 10 mililitros de etanol al 70% y 10 mililitros de agua destilada, y otros dos extractos de 1 gramo de material vegetal en 10 mililitros de etanol al 70% y 10 mililitros de agua destilada. Se utilizó como metodología de extracción el uso del equipo de sonificación Gnatius Lavadora BioFree 6L a una temperatura de 40°C por 30 minutos, en base a los protocolos revisados de forma bibliográfica.

Se realizó en las pruebas preliminares de los extractos una prueba de tamizaje fitoquímico para determinar fenoles mediante el ensayo de cloruro férrico con la finalidad de conocer si la tonalidad intensa de los extractos de mayor concentración afectaría en la

interpretación de resultados. Los extractos analizados, EE y EA de mayor concentración tenían una tonalidad más elevada que los de menor concentración, sin embargo, al agregar 1ml de agua destilada fue posible visualizar el cambio de coloración del ensayo, confirmando así la viabilidad de emplear los extractos de mayor concentración, de 10:100 g/v para todos los estudios respectivos.

Una vez confirmada la concentración gramos/volumen entre el material vegetal pulverizado y el solvente a utilizar se procedió a la preparación de extractos para el estudio fitoquímico y antibacteriano.

Para el extracto acuoso, en base a la relación 1:10 g/v se utilizó 25 gramos de hojas pulverizadas en 250ml de agua destilada, posterior a su esterilización. El extracto se sometió a un proceso de extracción por ultrasonido utilizando el equipo de sonificación Gnatu Lavadora BioFree 6L a una temperatura 40°C durante 30 minutos. Una vez que finalizó el proceso de ultrasonido, se realizó un filtrado al vacío utilizando como materiales papel filtro 40, matraz de filtración, embudo Büchner y bomba de vacío. Una vez finalizado el proceso de filtración el extracto fue trasvasado a un frasco ámbar para preservarlo adecuadamente.

Para el extracto alcohólico, se utilizaron 25 gramos de material vegetal pulverizado en 250ml de etanol al 70%. Se aplicó la metodología de extracción de ultrasonido en las mismas condiciones de temperatura y tiempo que el extracto acuoso, se realizó el filtrado al vacío y se conservó en un frasco ámbar. Para realizar la prueba antimicrobiana en el extracto alcohólico, este tuvo que pasar por una etapa adicional de eliminación del solvente alcohólico con la finalidad de que no altere la actividad antimicrobiana de la especie analizada, por lo que se utilizó un Rotavapor Hei-VAP Expert en las condiciones necesarias para eliminar el solvente

etanólico, lo cual corresponde a una presión de 175 mbar y una temperatura de 40°C, (IDEAM, 2020).

3.5.6 Tamizaje fitoquímico

Se realizarán ensayos fitoquímicos para detectar de forma cualitativa los metabolitos secundarios de un extracto vegetal. En los extractos obtenidos a partir de las hojas de *Leucaena trichodes* (Jacq.) Benth. con el solvente de etanol al 70% se realizaron el test de Espuma, Cloruro Férrico, Wagner, Shinoda, Liebermann Burchard y Baljet, mientras que, en el extracto acuoso se realizaron los ensayos de Espuma, Cloruro Férrico, Wagner y Shinoda.

3.5.6.1 Ensayo de Cloruro Férrico

El ensayo de cloruro férrico se realiza en extractos vegetales para evaluar de forma cualitativa los metabolitos secundarios: fenoles y taninos que se encuentran presentes en el extracto mediante la aplicación de tricloruro férrico al 5% disuelto en suero fisiológico, obteniendo un rango de tonalidades que indican los componentes presentes en los extractos acuosos y alcohólicos (Collaguazo & Márquez, 2022).

Los posibles resultados a obtener en un ensayo de cloruro férrico corresponden a una tonalidad rojiza, indicando presencia de fenoles, una tonalidad azulada, que indicando presencia de taninos pirogalotánicos, sintetizados a partir del ácido gálico, y una tonalidad verde intenso, que determina la presencia de taninos pirocatecólicos (Coy et al., 2014).

La composición de los compuestos fenólicos consiste en una combinación entre azúcar con fenol, lo que forma un complejo de hierro de tonalidad púrpura o verde intenso, generando la oxidación del fenol mientras que Fe^{2+} se reduce a Fe^{3+} (Granja, 2019).

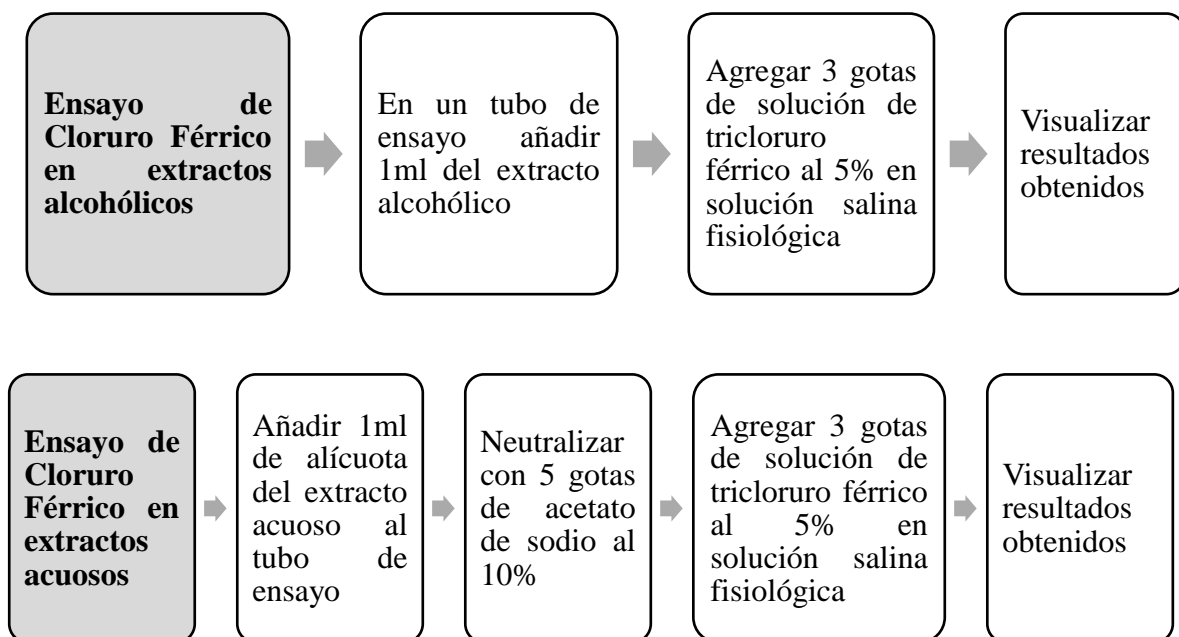
En el caso extractos con solventes acuosos se identifican taninos mientras que los extractos alcohólicos pueden determinarse los fenoles y taninos, utilizando los reactivos a utilizar, que comprenden el tricloruro férrico al 5%, la solución salina fisiológica, que consiste en cloruro de sodio al 0,9% disuelto en agua y el acetato de sodio al 10% que permite neutralizar el extracto acuoso previo al ensayo (Ramírez & Ruiz, 2021).

En ciertos protocolos se realizaron diluciones de 2ml de extracto en 4ml de agua destilada, repartidos en cuatro tubos de ensayo, por lo que se puede considerar realizar diluciones para contrastar resultados (García, 2019).

En caso de que el extracto sea acuoso, se determinarán los taninos, mientras que en el extracto etanólico se determinarán fenoles y taninos (Bermejo et al., 2014).

Esquema 2

Proceso de la prueba de cloruro férrico en los extractos alcohólico y acuoso.



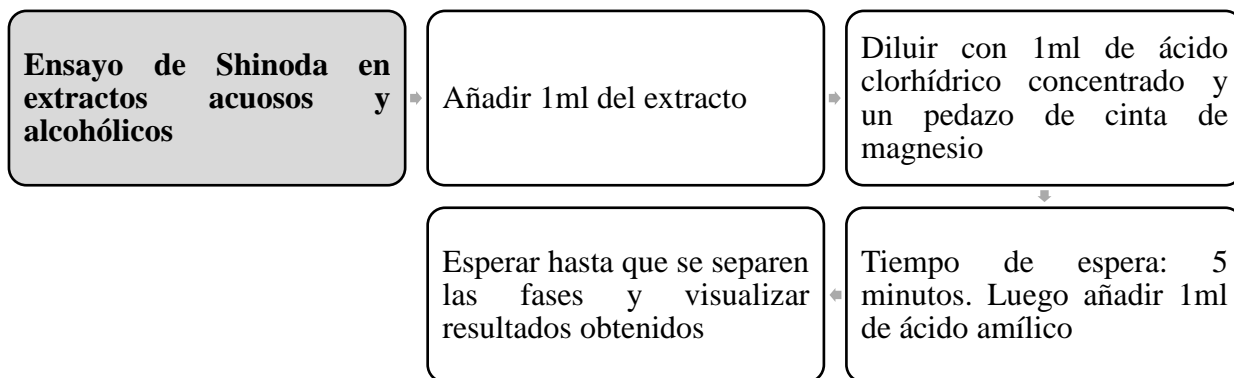
Nota. Información obtenida de (Coy et al., 2014) y (Granja, 2019).

3.5.6.2 Prueba de Shinoda

La prueba de Shinoda permite la identificación de flavonoides en extractos vegetales, obteniendo como resultado una tonalidad amarilla, naranja, rojiza, violeta o rosa en caso de ser positivo (Mencias & Salazar, 2018). La intensidad de la tonalidad depende del nivel de hidroxilación del flavonoide, por ejemplo, los flavonoles dan como resultado tonalidades más profundas que las flavonas, en el que influye la transformación reductora de la flavona en cloruro de antocianina. En el caso de los 3-glucósidos de flavonol, así como los dihidroflavonoles poseen tonalidades de rojo intenso o magenta en extractos alcohólicos (Krishnaswamy, 2003).

Esquema 3

Protocolo para la prueba de Shinoda en extractos alcohólico y acuoso.



Nota. Información obtenida de (Agustín & Anchundia, 2018)

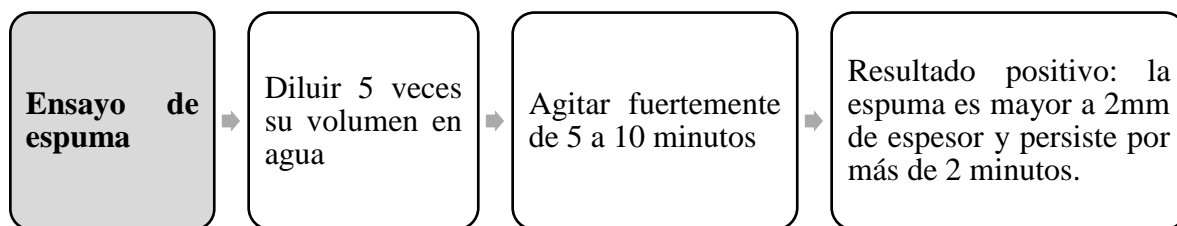
3.5.6.3 Ensayo de espuma

El ensayo de espuma corresponde a un método físico que se realiza en extractos para identificar si hay saponinas presentes, los cuales corresponden a soluciones acuosas presentes en especies vegetales, que en caso de ser agitadas se forma una espuma estable, por lo que se

realiza el test para calificar de forma cualitativa la generación de espuma y su persistencia durante un tiempo determinado (Foy et al., 2005).

Esquema 4

Protocolo para ensayo de espuma en extractos acuosos y alcohólicos.



Nota. Información obtenida de (Bermejo et al., 2014)

3.5.6.4 Ensayo de Wagner

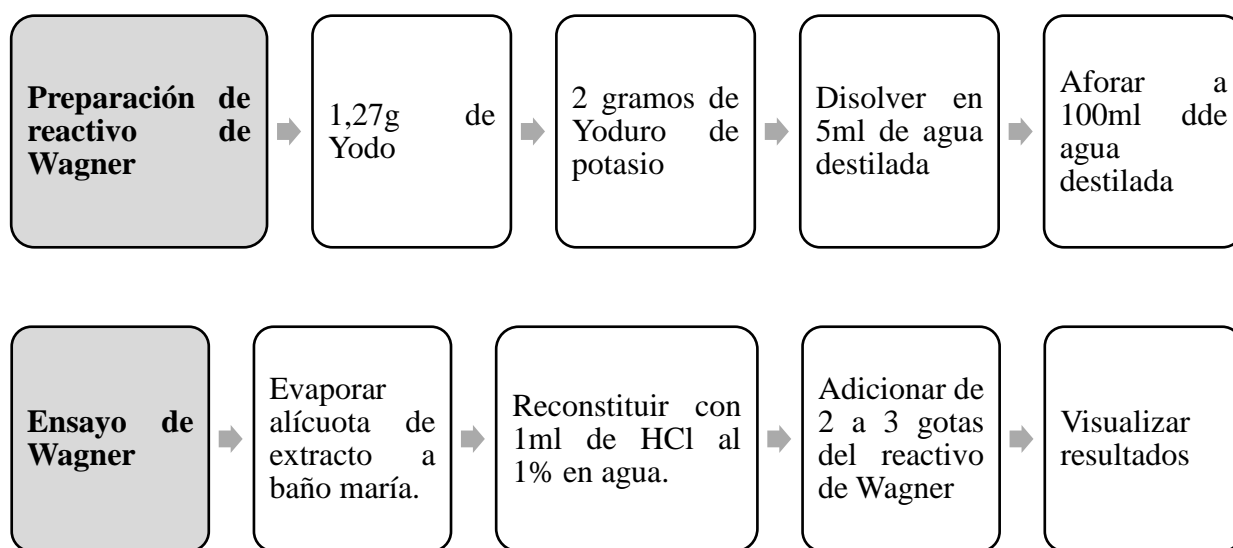
La prueba de Wagner determina los alcaloides presentes mediante una prueba cualitativa, en donde se determina la opalescencia (+), turbidez definida (++) y precipitado (+++) de la muestra al encontrarse en contacto con el reactivo de Wagner, adquiriendo una tonalidad marrón (Parrales & Villamar, 2021).

La prueba se basa en un intercambio del anión voluminoso del reactivo, reemplazando así a los aniones pequeños provenientes de las sales de este metabolito, y se realiza mediante la evaporación del solvente en baño maría o rotavapor, posteriormente se añade 1ml de ácido clorhídrico 1% v/v para reconstituir y se observa si se generó una precipitación marrón, finalmente se añaden las 3 gotas del reactivo de Wagner (Flor & Mosquera, 2017).

En otros protocolos no es necesario el baño maría, sino que se añaden dos gotas de reactivo a 2ml de extracto y esperar una tonalidad rojiza que indica la presencia de alcaloides (Dahanayake et al., 2019).

Esquema 5

Protocolo para ensayo de Wagner en extractos acuosos y alcohólicos.



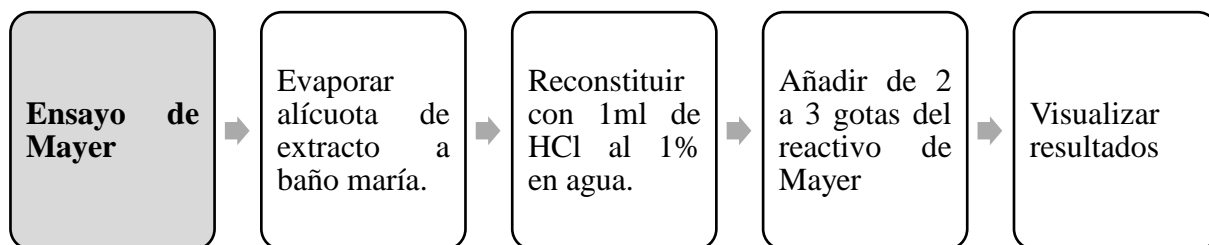
Nota. Información obtenida de (Jha et al., 2012) y (Parrales & Villamar, 2021)

3.5.6.5 Ensayo de Mayer

El ensayo de Mayer corresponde a una prueba cualitativa que determina los alcaloides presentes en un extracto, al generarse una precipitación blanca, marrón o amarilla (Maigoda et al., 2022). Esta reacción puede valorarse como positiva en tres niveles: en presencia de opalescencia leve (+), turbidez definida (++) o un precipitado abundante (+++) lo cual depende del nivel de concentración que presente el extracto del metabolito a estudiar, que son los alcaloides (San Román, 2014).

Esquema 6

Protocolo para ensayo de Mayer en extractos alcohólicos y acuosos.



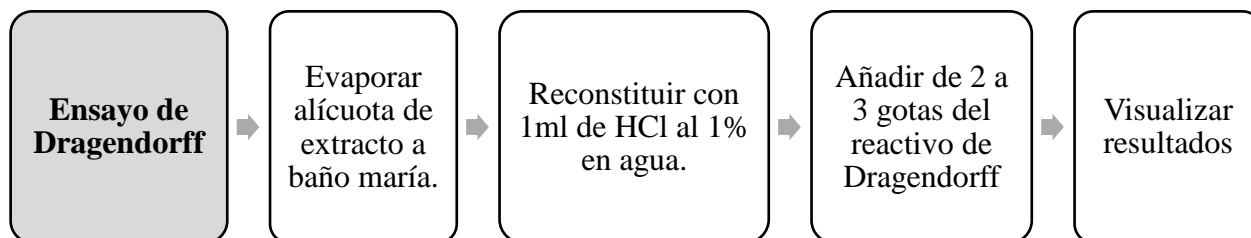
Nota. Información obtenida de (Ricaurte et al., 2021).

3.5.6.6 Ensayo de Dragendorff

El ensayo de Dragendorff posee la misma función que las pruebas de Wagner y Mayer que se basa en la detección de alcaloides mediante pruebas cualitativas, en donde se clasifica el resultado en caso de opalescencia (+), turbidez definida (++) y precipitado (+++) (Illescas & Lovato, 2020). El precipitado que presenta esta prueba puede ser naranja, a diferencia de la prueba de Mayer que posee un precipitado crema o Wagner que presenta un precipitado marrón (Ricaurte et al., 2021).

Esquema 7

Protocolo para ensayo de Dragendorff en extractos alcohólicos y acuosos.



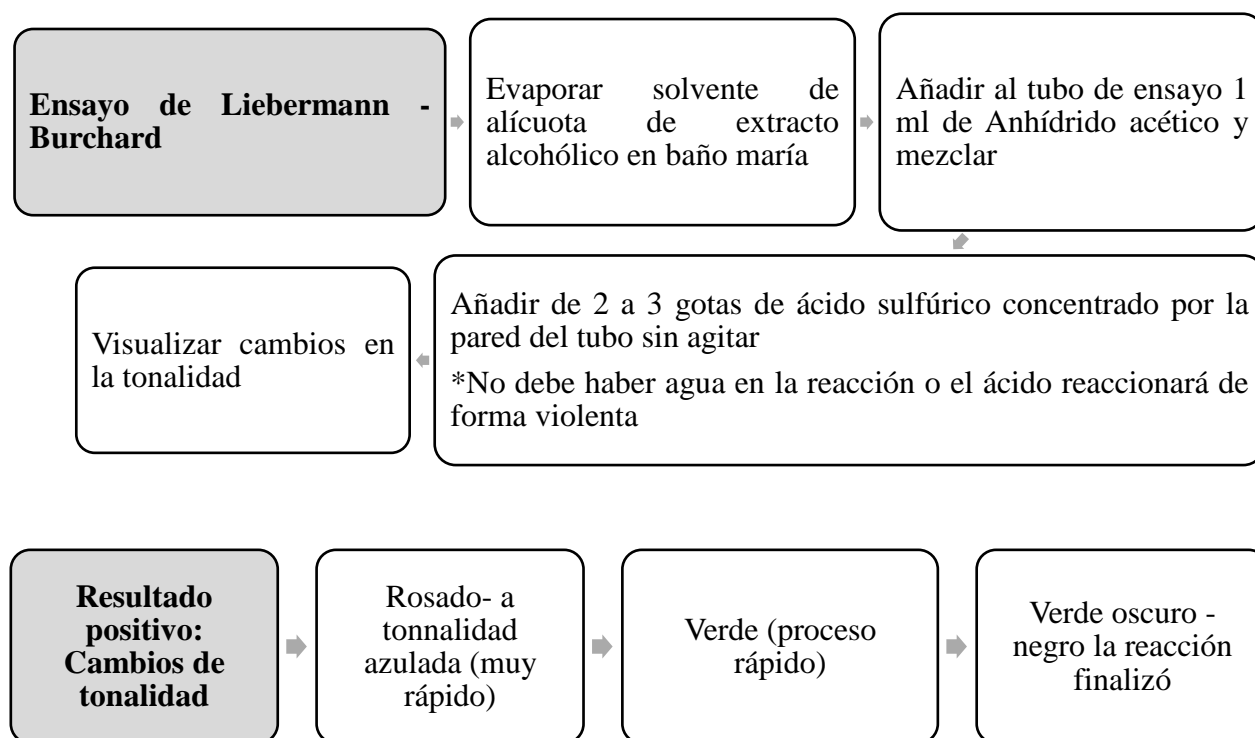
Nota. Información obtenida de (Illescas & Lovato, 2020).

3.5.6.7 Ensayo de Liebermann – Burchard

Este ensayo se encuentra orientado a la determinación de triterpenos y esteroides en extractos alcohólicos, el cual, en caso de no haber utilizado el solvente cloroformo, debe realizarse en baño maría la evaporación del solvente de la alícuota, y redisolverse al adicionar 1ml de cloroformo. Posteriormente se añade 1ml de anhídrido acético y se realiza un mezclado suave, y se añaden de 2 a 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado, en este caso sin agitación sin agitar, y se deben observar alteraciones en la tonalidad en escala, siendo las tonalidades azul a verde indicadores de estructuras esteroidales, mientras que las estructuras triterpénicas presentan tonalidades rojo, rosa o púrpura (Bermejo et al., 2014).

Esquema 8

Protocolo para ensayo de Liebermann - Burchard en extractos alcohólicos.



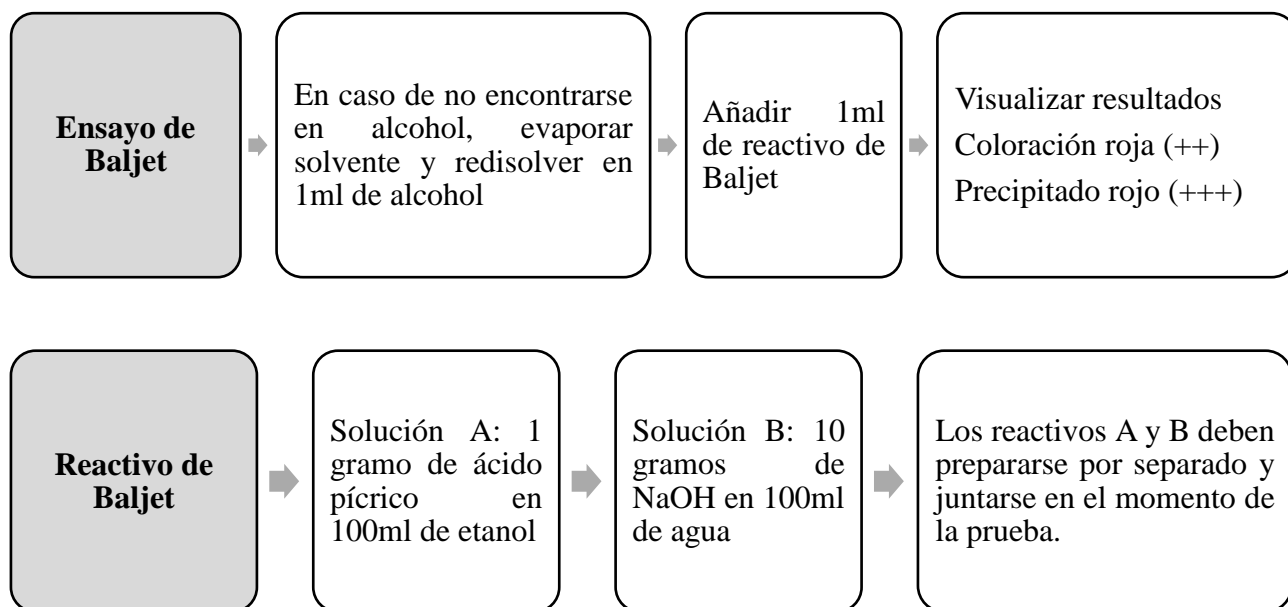
Nota. Información obtenida de (Bermejo et al., 2014).

3.5.6.8 Ensayo de Baljet

Este ensayo permite conocer si existen agrupamientos lactónicos presentes como en el caso de las coumarinas. Se realiza una evaluación de resultados entre la coloración(+) y precipitado (++) (Bermejo et al., 2014).

Esquema 9

Protocolo para ensayo de Baljet en extractos alcohólicos.



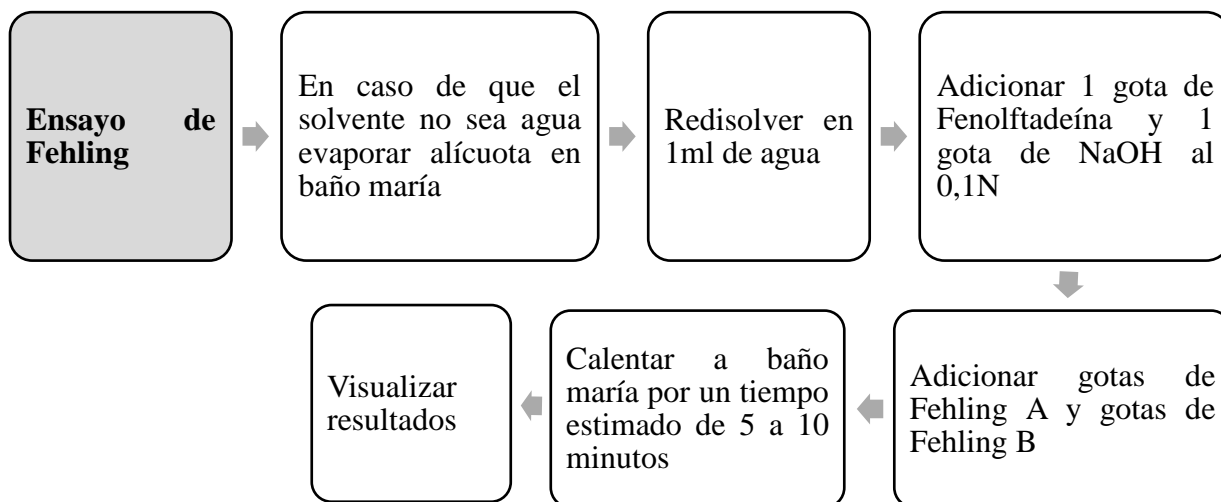
Nota. Información obtenida de (Bermejo et al., 2014) y (N. Guerrero, 2014).

3.5.6.9 Ensayo de Fehling

La prueba de Fehling corresponde a un ensayo cualitativo que permite conocer la presencia e monosacáridos, así como de algunos disacáridos, por ejemplo maltosa, que destacan por poseer un grupo hidroxilo anomérico, el cual le permite llevar a cabo la reacción como reductores, y se determina su presencia en el extracto analizado si se obtiene un cambio de tonalidad naranja o rojiza con precipitado (Guerrero, 2023).

Esquema 10

Protocolo para ensayo de Fehling en extractos alcohólicos y acuosos.



Nota. Información obtenida de (Santamaría, 2019) y (Bermejo et al., 2014).

3.5.7 Determinación de los parámetros fisicoquímicos

Se realizó el cálculo de densidad relativa de los extractos mediante el uso de un picnómetro con un volumen de 25,33 cm³, el cual se obtiene a la resta el peso del picnómetro que contiene el extracto a analizar con el peso del picnómetro vacío y dividiendo este resultado para el volumen del picnómetro, de esta forma es posible obtener la densidad relativa en las unidades de gramos sobre centímetros cúbicos (Widayanti et al., 2023).

$$\rho = \frac{\text{peso del picnómetro con el extracto (g)} - \text{peso del picnómetro vacío (g)}}{\text{volumen del picnómetro (cm}^3\text{)}}$$

Fórmula obtenida de (Widayanti et al., 2023).

Se analizó la tonalidad, aroma y aspecto de los extractos con la finalidad de determinar sus características organolépticas. También se evaluará el pH, el cual influye en la estabilidad

de la sustancia de estudio, su conservación a largo plazo y la conservación de sus propiedades durante el tiempo determinado (Rivas & Tomalá, 2018). Se utilizó un Medidor portátil de pH/ORP/mV HQ1110 con electrodo de pH de gel, con la finalidad de conocer si los extractos obtenidos poseen una naturaleza ácida, neutra o básica.

Se determinaron en grados Brix el equipo MA871 Milwaukee digital Refractometer 0 a 85 grados Brix. Los grados Brix corresponden a la medida de sólidos solubles presentes en una especie vegetal, que permite conocer su viabilidad en los procesos fermentativos en los que se involucran microorganismos (Gutiérrez et al., 2017). Su medida equivale al porcentaje de sacarosa, sin embargo, también suele incluir en su medición el conjunto de presencia de sacarosa, fructosa, vitaminas, aminoácidos, proteínas entre otros sólidos que se encuentren en una muestra vegetal, como en el caso de los extractos, donde una muestra de alta calidad posee un nivel elevado de grados Brix, que actúa como protección en contra de plagas de insectos, los cuales se ven afectados frente a la fermentación del azúcar en su organismo (Harrill, 1998),

3.5.8 Pruebas antimicrobianas

Se realizaron pruebas de inhibición por triplicado utilizando la metodología de antibiograma por difusión de discos Kirby Bauer a los extractos EE y EA obtenidos mediante la metodología de ultrasonido con el propósito de determinar el potencial de los extractos en el ámbito fitofarmacéutico por su actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos comunes en infecciones cutáneas y heridas.

Para llevar a cabo este estudio se seleccionaron dos microorganismos patógenos frecuentes en infecciones: *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Ambas especies microbianas han sido establecidas como dos de las causas principales de infecciones invasivas registradas en hospitales, representando un problema de salud que va desde

infecciones comunes a casos graves de bacteremia, que se desarrolla en mayor proporción en adultos mayores de 65 años (Poolman & Anderson, 2018). Debido a la constante aumento de resistencia en antibióticos a estas bacterias, es importante buscar nuevas alternativas que permitan su inhibición (Molton et al., 2013).

Se realizó la preparación de los inóculos respectivos de cada microorganismo y se verificó su nivel de absorbancia utilizando como referencia la escala McFarland 0,5% a 625nm, obteniendo como nivel de absorbancia valores entre 0,08% y 0,1% (Izquierdo & Ramirez, 2019). El medio de cultivo a utilizar será Mueller Hinton en cajas Petri de 150mm .

Se procedió a estriar con hisopos estériles los inóculos preparados en las cajas Petri respectivas y se colocaron siete discos de sensibilidad en cada placa de cultivo. La disposición de los discos utilizados en el agar solidificado de Mueller Hinton correspondió a cinco discos que contenían 25 µl de los extractos analizados en las concentraciones de 15, 25, 50, 75 y 100%. Los dos discos restantes incluían los controles del estudio: un control positivo, en el cual se utilizó trimetoprima-sulfametoxazol y un control negativo de agua destilada (Alam et al., 2020). Posterior a realizar el examen correspondiente se guardarán las cajas Petri con los discos de sensibilidad en l incubadora por 24 horas para visualizar los resultados, que corresponderán a la generación de halos de inhibición de cada disco.

En los ensayos de actividad biológica por la técnica de antibiograma existe una amplia gama de interpretación de resultados según lo obtenido en esta prueba cualitativa, en los que los halos de inhibición difieren en algunos casos en cuanto a su forma, tonalidad, nivel de delimitación en los bordes del halo, contraste alto o bajo en la claridad del agar, doble halo, incluso la posibilidad de presencia de colonias en los halos (Royer et al., 2020).

Posterior al análisis de resultados de los antibiogramas de difusión con discos se realizará el cálculo correspondiente al porcentaje efecto inhibitorio de cada una de las concentraciones utilizadas en el estudio mediante la fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Diámetro del halo de inhibición de disco con extracto (mm)}}{\text{Diámetro del halo de inhibición del control positivo (mm)}} * 100$$

Fórmula obtenida de (Díaz et al., 2017).

Para que una bacteria Gram negativa se considere resistente a un antibiótico, esta debe ser menor o igual a 10mm de diámetro de inhibición, lo cual representa un 41,66% de efecto inhibitorio, mientras que, para considerar que el microorganismo es sensible se requiere de un valor mayor o igual a 16mm de diámetro de inhibición, o un 66,66% de efecto inhibitorio (Junod et al., 2013). Estos análisis se realizaron en base al diámetro obtenido del control positivo, que representa un 100% de efecto inhibitorio en este estudio.

En el análisis presentado en la bacteria Gram Positiva *S. aureus*, se considera sensibilidad a un porcentaje mayor o igual a 59,8%, mientras que se establece resistencia bacteriana con un porcentaje menor o igual al 40,8% basados en el antibiótico utilizado como control positivo (Cabrera et al., 2018).

3.5.9 Análisis de resultados

Se revisarán los resultados del estudio fitoquímico y de la actividad inhibitoria obtenidos a partir de los extractos EE y EA de la especie *Leucaena trichodes* (Jacq.) Benth, con la finalidad de determinar si la especie estudiada es relevante para la investigación y desarrollo de aplicaciones a nivel biotecnológico, biomédico y farmacológico.

Se analizarán los resultados presentados en tablas con los valores obtenidos en base a los cálculos estadísticos y los gráficos del porcentaje de efecto inhibitorio en los programas

estadísticos: IBM SPSS Statistics, Statgraphics 19 – X64 y Microsoft Excel. Se llevarán a cabo análisis descriptivos, prueba de normalidad para conocer si se pueden aplicar pruebas paramétricas como T student y ANOVA simple, además de graficar en diferentes formatos estadísticos los resultados presentados en el porcentaje de efecto inhibitorio.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Identificación de la especie

Se realizó el prensado de ocho muestras de la especie de estudio, *Leucaena trichodes* (Jacq.) Benth. recolectadas en el Campus María Auxiliadora de la Universidad Politécnica Salesiana, Km 19 de Vía a la Costa, en la ciudad de Guayaquil – Ecuador, con coordenadas: 2°11'47.4"S 80°02'36.1"W, las cuales se herborizaron con la finalidad de realizar una descripción morfológica de sus hojas y la identificación de la especie a partir de una revisión bibliográfica exhaustiva de los repositorios de Herbarios internacionales para comparar sus estructuras morfológicas y verificar que la especie de estudio es *Leucaena trichodes* (Jacq.) Benth.

4.1.1 Descripción morfológica de las hojas de *L. trichodes*

En base a las muestras obtenidas fue posible realizar una descripción morfológica de sus hojas siguiendo los parámetros botánicos correspondientes al libro “*Botánica, morfología, taxonomía y fitogeografía*” (Troiani et al., 2017). Se observa en las hojas de *Leucaena trichodes* (Jacq.) Benth. una organización de hojas opositoparipinnadas, las cuales corresponden a una organización de los folíolos en pares a lo largo del raquis, los cuales terminan en un par de folíolos.

La bibliografía revisada perteneciente a los autores Troiani et al (2017) permitió determinar la forma de la lámina de los folíolos o su contorno, correspondiente a una forma ovada con un ápice y base obtusos, el margen de los folíolos es entero. Su tipo de indumento es glabro, es decir que no posee tricomas que cubran la superficie de la hoja, su nervadura es

pinnatinervia, lo cual corresponde a la presencia de un nervio medio principal en el área central del peciolo, del cual se derivan nervios secundarios.

4.1.2 Comparación de muestras herborizadas

A partir de las muestras herborizadas se realizó una comparación bibliográfica con muestras presentes en bases de datos de Herbarios con la finalidad de observar las estructuras morfológicas que permitirían determinar la especie a estudiar. Se determinó que la distribución opositoparipinnada de los foliolos presentes en la muestra obtenida en este estudio concordaba con la organización foliar de los ejemplares obtenidos en la colección de datos (**Anexo C** y **Anexo D**) de los registros conservados en el repositorio de Naturalis Biodiversity Center con una especie proveniente de Perú, provincia de Tumbes (Naturalis Biodiversity Center, 1989) y dos muestras provenientes de Ecuador, provincia de Loja (Naturalis Biodiversity Center, 1997), mientras que en el repositorio digital de la colección Botánica de Field Museum se analizó bibliográficamente una muestra proveniente de Ecuador, provincia de Loja registrada en el (Field Museum Botanical Collection, 1997).

Para determinar si la forma de las hojas era correspondiente a la especie de estudio *Leucaena trichodes* (Jacq.) Benth. se realizaron comparaciones con muestras obtenidas de la fuente digital del Herbario de la Universidad de South Florida (USF), en la cual se conservan registros de su recolección realizada en Ecuador en el año 1980 en la provincia de Manabí (USF, 1980) y dos muestras recopiladas del repositorio del Herbario de la Universidad de Florida. Ambas recolecciones se realizaron en el año 2016 en República Dominicana, provincia de Azua (FLAS, 2016). La comparación entre las muestras obtenidas y herborizadas en esta investigación con el material revisado de forma bibliográfica (**Anexo E** y **Anexo F**) permitió establecer que la morfología de las hojas, con una forma ovada, ápice y base de forma obtusa

además de un margen entero, incluyendo la presencia de inflorescencias indica que se trata de la especie revisada.

Para la comparación de la nervadura de las hojas se contrastó una de las muestras recolectadas en esta investigación con la fotografía de una muestra preservada en el repositorio digital del Herbario Desert Botanical Garden (**Anexo G**) proveniente de República Dominicana, provincia de Azua (DES, 2016), en donde se corroboró que las muestras contrastadas poseen una nervadura pinnatinervia, con su nervio principal en la sección central y ramificaciones secundarias de los nervios que se derivan de la misma, aportando información en conjunto con las otras muestras estudiadas que permite identificar a la especie de estudio *Leucaena trichodes* (Jacq.) Benth.

4.1.3 Contenido de humedad de las hojas de *L. trichodes*

Para la identificación de la especie también se consideró un punto de vista fisiológico, por lo que se determinó el contenido de humedad utilizando muestras de las hojas de *Leucaena trichodes* utilizando una balanza de humedad MB23 Moisture Analyser de la marca OHAUS. Se analizaron tres muestras de 1 gramo cada una, en la que encontraban hojas frescas de la especie estudiada, por lo que se obtuvieron los siguientes resultados en una temperatura de 105°C: 76,2%, 73,3% y 75,2%.

Se realizó un promedio de los resultados obtenidos, que corresponde a 74,9% humedad. Este se encuentra dentro del rango normal de humedad para hojas frescas de 20% a 75%, según indica la bibliografía estudiada (Hurtado et al., 2015).

Al contrastar los resultados con estudios realizados a una especie del mismo género, *Leucaena leucocephala*, se puede observar que existe una relación en su contenido de humedad,

al indicar que la humedad de las hojas de *L. leucocephala* representada en porcentaje corresponde a 74,3%, que posee una diferencia de 0,6% con el resultado obtenido en esta investigación, demostrando así que el género *Leucaena* posee una alta capacidad de mantener su equilibrio hídrico en sus hojas, lo cual es un aspecto positivo que les permite presentar una mayor resistencia en las sequías, continuando por un tiempo más extenso con la fisiología normal de la planta cuando esta se encuentra en situaciones de estrés (Yige et al., 2012). Este aspecto también corrobora la identificación propia de la especie al ser una cualidad propia del género *Leucaena*.

4.2 Determinación de los parámetros fisicoquímicos

Se realizaron análisis a los dos extractos obtenidos en la investigación, como se indica en la Tabla 2, con la finalidad de conocer los parámetros de pH, grados Brix, densidad, tonalidad, aroma y aspecto.

Tabla 2

Determinación de parámetros fisicoquímicos de los extractos etanólico (70%) y acuoso obtenidos de las hojas de L. trichodes.

Parámetros fisicoquímicos	Extracto etanólico al 70%	Extracto acuoso
pH	6,72	7,06
Grados Brix	18,3 grados Brix	2,5 grados brix
Densidad	0,90 g/cm ³	1 g/cm ³
Tonalidad	Verde oscuro	Naranja

Aroma	<i>Sui generis</i>	<i>Sui generis</i>
Consistencia	Líquido	Líquido
Aspecto	Opaco	Opaco

Elaborado por (Albán, 2023)

El aroma de los extractos se consideró fresco y herbáceo, propio de la especie de estudio, por lo que se describió como *sui generis*. En ambos extractos poseen una consistencia líquida, consistencia opaca y su tonalidad corresponde a verde oscuro en el EE al 70% y naranja en el EA de las hojas de *L. trichodes*. El pH obtenido en los este estudio corresponde a un pH de 6,72 en el extracto etanólico al 70% y un pH de 7,06 en el extracto acuoso. Ambos corresponden a un rango de pH neutro.

Los grados Brix obtenidos en este estudio corresponden a 18,3 grados Brix en el extracto etanólico y 2,5 grados Brix en el extracto acuoso, por lo cual el extracto etanólico al 70% presenta una mayor probabilidad de conservación frente a plagas en comparación al extracto acuoso.

Se calculó la densidad relativa de los extractos, así como de los solventes utilizados. Se determinó que la densidad entre los extractos y sus solventes respectivo eran iguales, obteniendo como resultado en la densidad del EA de las hojas de *L. trichodes* y su solvente respectivo, agua destilada estéril, un valor de 1g/cm^3 , mientras que en el extracto etanólico al 70% de las hojas de *L. trichodes* se observó un aumento de $0,02\text{ g/cm}^3$, en comparación al resultado de densidad en EE con su solvente de etanol al 70%.

A continuación, se detallan los cálculos efectuados para la densidad de los extractos obtenidos de *L. trichodes* y sus respectivos solventes.

Densidad relativa a 20°C del EA de las hojas *L. trichodes*:

$$\rho = \frac{49,10g - 23,74g}{25,33 \text{ cm}^3} = 1,0012 \frac{g}{\text{cm}^3} = 1,00 \frac{g}{\text{cm}^3}$$

Densidad relativa a 20°C del EE al 70% de las hojas de *L. trichodes*:

$$\rho = \frac{46,50g - 23,74g}{25,33 \text{ cm}^3} = 0,8985 \frac{g}{\text{cm}^3} = 0,90 \frac{g}{\text{cm}^3}$$

Densidad relativa a 20°C de agua destilada estéril (Solvente de extracto acuoso)

$$\rho = \frac{48,92g - 23,74g}{25,33 \text{ cm}^3} = 0,9940 \frac{g}{\text{cm}^3} = 1,00 \frac{g}{\text{cm}^3}$$

Densidad relativa a 20°C de etanol al 70%

$$\rho = \frac{45,90g - 23,74g}{25,33 \text{ cm}^3} = 0,8749 \frac{g}{\text{cm}^3} = 0,88 \frac{g}{\text{cm}^3}$$

Cálculos realizados por (Albán, 2023).

4.3 Tamizaje fitoquímico

Se realizaron pruebas de tamizaje fitoquímico en el EA para analizar si se encuentran presentes taninos, saponinas, alcaloides, flavonoides y azúcares reductores, mientras que al extracto etanólico al 70% se adicionaron las pruebas para determinar fenoles, triterpenos, esteroides y cumarinas, como se indica en la tabla 3.

Tabla 3

Resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos EA y EE de las hojas de *L. trichodes*.

Tamizaje fitoquímico	Metabolito a analizar	(EE) Extracto etanólico al 70%	(EA) Extracto acuoso
Cloruro Férrico	Fenoles y taninos (EE) Taninos (EA)	+++	+++
Prueba de espuma	Saponinas	-	+
Liebermann - Burchard	Triterpenos, esteroides	++	
Wagner	Alcaloides	++	+++
Mayer	Alcaloides	+	+++
Dragendorff	Alcaloides	+	+++
Shinoda	Flavonoides	-	+
Baljet	Lactonas (Cumarinas)	+	
Fehling	Azúcares reductores	+	+

Nota. La simbología indica; Extracto etanólico al 70% (EE), Extracto acuoso (EA), presencia (+), presencia moderada (++) , presencia abundante (+++) y ausencia (-). La tonalidad gris de los casilleros indica que la prueba no se realizó al no ser indicada para el tipo de solvente utilizado.

Tabla realizada por: (Albán, 2023).

En los resultados de tamizaje fitoquímico se puede determinar la presencia de metabolitos secundarios, los cuales poseen un nivel aceptable de concordancia con los estudios de la especie del mismo género, *Leucaena leucocephala*, que reflejan los mismos resultados en el contenido de saponinas, que solo se reflejaba en el extracto acuoso, sin embargo, la especie de estudio en este trabajo, *L. trichodes* si presentó un resultado positivo en el test de cloruro férrico en ambos extractos, indicando la presencia de compuestos fenólicos, a diferencia de *L. leucocephala* que indicaba un resultado negativo para el extracto acuoso de sus hojas (Deivasigamani, 2018).

Un estudio realizado en Indonesia confirmó que la especie perteneciente al mismo género *Leucaena*, *L. leucocephala* contiene los metabolitos secundarios: alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos, cumarinas y triterpenoides, recomendando su uso para la formulación de nuevos fármacos para el manejo de enfermedades (Septina et al., 2020), por lo cual, al evaluar los resultados de este estudio se puede determinar que la especie *L. trichodes* posee un potencial similar a *L. Leucocephala* por las propiedades que aportan sus metabolitos secundarios en los extractos acuoso y alcohólico, lo que le permite promover la investigación de nuevas aplicaciones a nivel biotecnológico y biomédico.

4.4 Actividad antimicrobiana

Se realizó un antibiograma de difusión por discos para analizar la actividad de inhibición de crecimiento de microorganismos otorgado por los extractos EE y EA de las hojas de *L. trichodes*. El extracto etanólico al 70% fue previamente concentrado en el Rotavapor Hei-VAP Expert en las condiciones necesarias para eliminar el solvente etanólico, 175 mbar y 40°C, (IDEAM, 2020).

Se analizaron cinco concentraciones de cada extracto: 15, 25, 50, 75 y 100% en agar Mueller Hinton, utilizando como control positivo trimetoprima-sulfametoxazol en discos de sensibilidad con y como control negativo agua destilada.

En esta investigación se visualizó en los resultados la generación de halos de inhibición, de un contraste medio en el que se aprecia mayor claridad del agar en comparación al lugar de crecimiento y en algunos casos una ligera presencia de doble inhibición, donde se observa un cambio de tonalidad más intenso en el halo exterior, mientras que el halo interior presenta mayor claridad. En el caso de los discos de control positivo, todos funcionaron adecuadamente, obteniendo un halo de inhibición claro sin presencia de colonias.

Los resultados de la actividad inhibitoria del EE y EA frente a la bacteria *E. coli* ATCC 8739, se reflejan en la Tabla 4 a continuación, donde se observa que el EA obtuvo una mayor actividad que el EE. Sin embargo, los datos analizados no representan una actividad antimicrobiana significativa en comparación a la actividad del control positivo, donde se consideró que la sensibilidad bacteriana se encuentra establecida a partir de un halo de inhibición mayor a 16mm (Junod et al., 2013). Los controles positivo y negativo obtuvieron sus resultados correspondientes de forma que se corroboran los resultados de los extractos analizados.

Las pruebas fueron realizadas por triplicado y a partir de esos resultados se obtuvo un promedio de cada concentración. El extracto etanólico no presentó actividad alguna en las concentraciones de 15, 25 y 50%, a diferencia del extracto acuoso si presentó actividad en todas las concentraciones estudiadas. Los promedios de los diámetros obtenidos en las pruebas por triplicado (a, b, c) realizados en el extracto acuoso varían entre los 8,67mm y 9 mm, mientras que en el extracto etanólico el promedio de los valores obtenidos se mantiene en 7,33 para las dos concentraciones más altas (100% y 75%).

Los porcentajes del efecto inhibitorio del antibiograma en *E. coli* ATCC 8739 se encuentran en un rango de 25,57% a 27,77% en el EA y de 30,54 en el EE.

Tabla 4

Diámetro de halo de inhibición de los extractos etanólico (EE) y acuoso (EA) de las hojas de L. trichodes en concentraciones 15, 25, 50, 75 y 100% en la bacteria E. coli ATCC 8739.

Diámetro de halo de inhibición (mm) en <i>E. coli</i> ATCC 8739							
Extractos	Discos	Concentración del extracto	a	b	c	Promedio (mm)	Porcentaje de efecto inhibitorio
Extracto acuoso (EA) de las hojas de <i>L. trichodes</i>	1	100%	8	10	9	9	37,50%
	2	75%	8	10	8	8,67	36,13%
	3	50%	9	9	9	9	37,50%
	4	25%	9	9	8	8,67	36,13%
	5	15%	9	8	8	8,33	34,71%
	+	Control positivo	24	24	24	24	100%

	-	Control negativo	0	0	0	0	0%
Extracto etanólico (EE) de las hojas de <i>L. trichodes</i>	1	100%	8	7	7	7,33	30,54%
	2	75%	8	7	7	7,33	30,54%
	3	50%	0	0	0	0	0%
	4	25%	0	0	0	0	0%
	5	15%	0	0	0	0	0%
	+	Control positivo	24	24	24	24	100%
	-	Control negativo	0	0	0	0	0 %

Elaborado por: (Albán, 2023).

El análisis realizado a partir de *S. aureus* ATCC 6538 con el EA, como se indica en la tabla 5 presentó valores de diámetro que varían entre 8 y 7 de forma descendente, lo cual indica que, a medida que disminuye la concentración del extracto, también decrece su actividad biológica. Su capacidad inhibitoria es menor en comparación al análisis realizado en la bacteria Gram Negativa, indicando que posee una mejor actividad inhibitoria en *E. coli* que en *S. aureus*.

EE presentó mejores resultados que la bacteria *S. aureus* en su actividad inhibitoria, con valores de diámetro entre 10 y 8 mm, En este caso todos los discos presentaron actividad mínima, donde se determinó que la concentración de los extractos analizados disminuía de forma directamente proporcional a su actividad. Sin embargo, la actividad biológica presentada no es suficiente para considerar que las bacterias presentan sensibilidad a los extractos como se expresa , por lo que se clasifica a la bacteria *S. aureus* como resistente a los extractos analizados.

Los porcentajes del efecto inhibitorio del antibiograma en *S. aureus* ATCC 6538 se encuentran en un rango de 36,13% a 37,50% en EA, mientras que a partir de los análisis realizados en el EE se obtuvo un rango de 28,90% a 33,33%.

Tabla 5

Diámetro de halo de inhibición de los extractos etanólico (EE) y acuoso (EA) de las hojas de L. trichodes en concentraciones 15, 25, 50, 75 y 100% en la bacteria S. aureus ATCC 6538.

Diámetro de halo de inhibición (mm) en <i>S. aureus</i> ATCC 6538							
Extractos	Discos	Concentración del extracto	a	b	c	Promedio (mm)	Porcentaje de efecto inhibitorio
Extracto acuoso (EA) de las hojas de <i>L. trichodes</i>	1	100%	8	8	8	8	26,67%
	2	75%	9	8	7	8	26,67%
	3	50%	10	8	7	8,33	27,77%
	4	25%	9	7	7	7,67	25,57%
	5	15%	8	7	7	7,33	24,43%
	+	Control positivo	30	30	30	30	100%
	-	Control negativo	0	0	0	0	0%
Extracto etanólico (EE) de las hojas de <i>L. trichodes</i>	1	100%	10	10	10	10	33,33%
	2	75%	10	10	9	9,67	32,23%
	3	50%	10	10	8	9,33	31,10%
	4	25%	10	9	8	9	30,00%
	5	15%	9	9	8	8,67	28,90%
	+	Control positivo	30	30	32	30,67	100%

	-	Control negativo	0	0	0	0	0%
--	---	------------------	---	---	---	---	----

Elaborado por: (Albán, 2023).

Los datos obtenidos a partir de la metodología aplicada de antibiograma por difusión con discos determinaron que la bacteria Gram negativa *E. coli* ATCC 8739 analizada presenta resistencia al extracto etanólico posterior a la eliminación del solvente a rotavapor, del cual solo presentó actividad mínima en las concentraciones al 100% y 75%, con un diámetro de inhibición de 7,33mm, mientras que en el extracto acuoso se obtuvieron valores del diámetro de halo de inhibición de 8,67 a 9,00 mm en las concentraciones de 15%, 25%, 50%, 75% y 100%.

En el caso del antibiograma realizado con *S. aureus* ATCC 6538, el extracto acuoso posee un rango de diámetro de halo de inhibición de 7,67 a 8,33 mm en las concentraciones de 15%, 25%, 50%, 75% y 100%, mientras que el extracto etanólico al 70%, se los diámetros de inhibición obtenidos son de 8,67 a 10mm en las concentraciones 15%, 25%, 50%, 75% y 100%.

Los valores registrados en esta investigación sobre la capacidad de inhibición de crecimiento de microorganismos entre los extractos EE y EA de las hojas de *Leucaena trichodes* se encuentran por debajo del umbral mínimo establecido por parte del antibiótico trimetoprima-sulfametoxazol de 16mm de diámetro, por lo cual se establece los extractos generan resistencia bacteriana en el contexto establecido por el control positivo utilizado. Sin embargo, el parámetro otorgado por el control positivo es elevado debido a que se trata de un medicamento antibacteriano de origen sintético, por lo cual, al contrastar la actividad inhibitoria de un extracto natural con los parámetros del control, se obtiene una actividad biológica limitada, pero no es un indicativo de que su actividad no sea efectiva.

A través de una investigación bibliográfica detallada se pudo determinar que una amplia variedad de especies de la familia Fabaceae posee una actividad antimicrobiana moderada, destacando la actividad de fabáceas como *Bryoria kockiana*, *Caesalpinia pulcherrima*, *Calliandra tergemina* y *Peltophorum pterocarpum*, que presentaron una actividad en los extractos a partir de sus hojas con halos que variaban entre 7,8 mm y 13 mm de actividad antimicrobianas frente a bacterias Gram positivas (Chew et al., 2011), por lo que puede considerarse que los extractos acuoso y etanólico en este estudio presentaron una actividad biológica moderada en comparación a otros extractos naturales de especies pertenecientes al género *Leucaena*, así como de la familia Fabaceae en general, por lo que se considera que los extractos obtenidos de *L. trichodes* poseen actividad antibacteriana moderada.

Se realizó un análisis de la literatura en especies pertenecientes a otra clasificación, como en el caso de *Jatropha curcas*, especie de la familia *Euphorbiaceae*, de la cual se realizaron estudios de su actividad biológica a partir de su fruto mediante la obtención de su extracto utilizando como solvente metanol, donde se determinó que su resultado inhibitorio en un rango de diámetros que varía entre 8 y 13 mm se considera un rango aceptable al tratarse de una fuente natural de componentes bioactivos (Saosoong & Ruangviriyachai, 2016), por lo cual es posible considerar a la especie de esta investigación, *L. trichodes* con actividad antimicrobiana moderada.

La actividad antimicrobiana género *Leucaena* se encuentra caracterizada por la presencia de compuestos fenólicos (Mohammed et al., 2015), también al contenido de los metabolitos: saponinas, flavonoides, alcaloides, esteroides y terpenoides (Omuketi et al., 2020), por lo que se puede establecer que ambos extractos demostraron una actividad antibacteriana moderada debido a la presencia de estos metabolitos, siendo más destacado el

extracto acuoso debido a la presencia adicional de flavonoides, que corresponden a una subclase de los compuestos fenólicos.

Los resultados del efecto inhibitorio de los extractos de *L. trichodes* posee relación con otros estudios que fueron investigados de forma bibliográfica, lo cual indica que es concordante con la actividad presente en extractos de otras especies del género *Leucaena* y de la familia Fabaceae en general, demostrando su efecto inhibitorio en rangos similares de diámetro de inhibición, por lo que se fomenta el estudio de sus propiedades antimicrobianas con la finalidad de potenciar su capacidad antimicrobiana y aplicarlo en el desarrollo de fitofármacos (Chew et al., 2011).

La preparación de extractos elaborados a partir de las hojas de *L. trichodes* se realizó utilizando la metodología de extracción por ultrasonido, sin embargo, es posible aplicar otras metodologías tales como maceración, e incluso el tipo de solvente, como metanol, acetona y cloroformo, los cuales podrían otorgar un efecto inhibitorio a mayor nivel según indican estudios realizados en la especie *L. leucocephala*, en donde la utilización de metanol como solvente permite una actividad superior al 50% de porcentaje efecto inhibitorio en comparación al control utilizado: gentamicina (Chaurasia & Sharma, 2015).

Otra alternativa que permitiría potenciar las propiedades antimicrobianas de los extractos elaborados a partir de las hojas de *L. trichodes* corresponde a la combinación con extractos naturales de otras especies, que generarían una interacción sinérgica aumentando la actividad antimicrobiana. En un estudio realizado en el año 2020, se demostró que la interacción entre *L. leucocephala* con *Aloe vera* revela un mayor porcentaje inhibitorio en el crecimiento bacteriano, por lo que se fomenta la combinación de componentes naturales para mejorar la actividad antimicrobiana y potenciar futuras aplicaciones (Rahmadea et al., 2020b).

4.5 Análisis estadístico del porcentaje de efecto inhibitorio

Los programas IBM SPSS Statistics, Statgraphics 19 – X64 y Microsoft Excel fueron utilizados para analizar los porcentajes de inhibición obtenidos a partir de las pruebas de antibiograma realizadas.

En base a los análisis descriptivos obtenidos en IBM SPSS Statistics (**Anexo Ñ**), se identificó que el extracto acuoso en la prueba realizada al microorganismo *E. coli* ATCC 8739 obtuvo un menor rango estadístico (2,79), lo cual indica que los porcentajes de inhibición de las cinco concentraciones analizadas son más cercanos entre sí en comparación a los otros extractos. Además, este extracto obtuvo el menor error estándar, desviación estándar y varianza, siendo indicadores de su efectividad. En contraste, el extracto etanólico en la prueba realizada al mismo microorganismo, mostró un mayor error estándar al no poseer capacidad de inhibición en las concentraciones más bajas.

Se realizó una prueba de Shapiro-Wilk aplicada al presentarse un número de valores analizados son menores a 30 ($n < 30$), determinando una significancia mayor a 0,05, por lo que se consideran datos con distribución normal y permitiendo el uso de pruebas paramétricas. La prueba T student se aplicó a los datos de efecto inhibitorio, obteniendo el valor de significancia menor a 0,01, el cual rechaza la hipótesis nula y acepta la hipótesis alternativa de la presencia de una actividad inhibitoria moderada, lo cual coincide con los resultados presentes del antibiograma.

Se realizó el programa Statgraphics 19 – X64 un ANOVA simple (**Anexo O**), en donde la relación F (7,53971), representando la variación dada entre los grupos sobre la variación presente dentro de cada grupos, del cual se obtuvo un valor P (0,0023) inferior a 0,5 que determina que se identificó una diferencia en la media de efecto inhibitorio entre los niveles de

extractos. Los resultados del valor P inferiores a 0,05 se han determinado también en estudios previos, como en el caso de la investigación realizada en especies de la familia Fabaceae, donde se obtuvo en base a su actividad antimicrobiana un análisis estadístico con un valor de $P < 0,05$ (Chew et al., 2011), corroborando los resultados en el análisis estadístico de este estudio.

Las pruebas de comparación múltiple Tukey y LSD también se realizaron. En Tukey se determinaron la presencia de diferencias significativas a nivel estadístico entre determinados pares de medias, mientras que la prueba LSD mostró diferencias estadísticamente significativas en tres pares.

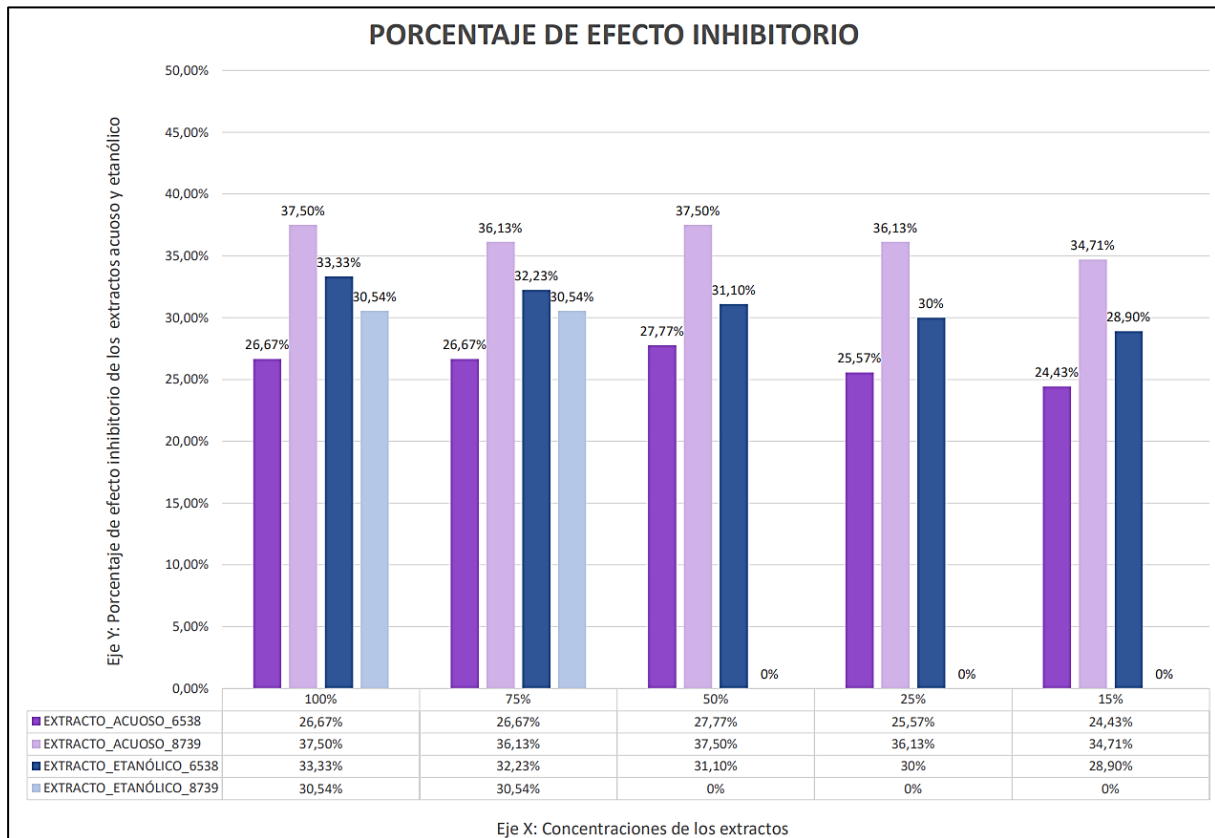
Finalmente se realizaron las pruebas T de forma individual a las cuatro pruebas de efecto inhibitorio (de **Anexo P** a **Anexo S**), rechazando la hipótesis nula en todos a excepción del extracto etanólico E. coli ATCC 8739, que no presentó inhibición en las concentraciones 15%, 25% y 50%. Sin embargo, al contrastar los datos de forma general en la prueba T student, como se realizó en el programa SPSS, se puede apreciar que el resultado de valor de significancia general es menor a 0,01, por lo que se puede indicar que los extractos sí poseen actividad antibacteriana.

La representación gráfica de los resultados estadísticos se realizó a través de histogramas, gráficos de caja y bigotes, cuantiles, probabilidad normal, simetría y densidad suavizada.

Posterior a los análisis estadísticos realizados se estableció un gráfico general en donde se represente del porcentaje de efecto inhibitorio contrastado con las concentraciones de los extractos en un gráfico de barras en Microsoft Excel, como se demuestra a continuación en la Figura 8.

Figura 8

Gráfico de barras del porcentaje de efecto inhibitorio obtenido en las cuatro pruebas de antibiogramas de difusión por disco realizados en los extractos acuoso y etanólico en las bacterias *S. aureus* ATCC 6538 y *E. coli* ATCC 8739



Elaborado por: (Albán, 2023).

La figura 8 permite complementar los análisis realizados en los programas IBM SPSS Statistics y Statgraphics 19 – X64, donde se determinó que el extracto acuoso obtuvo el mejor rendimiento en su porcentaje de inhibición en *E. coli* ATCC 8739, Por otro lado, el extracto etanólico obtuvo su mejor porcentaje inhibitorio en la *S. aureus* ATCC 6538. El uso de varios programas estadísticos permitió corroborar los resultados obtenidos.

CONCLUSIONES

- El tamizaje fitoquímico realizado a los extractos obtenidos a partir de las hojas de *L. trichodes* permitió determinar de forma cualitativa en EE la presencia de alcaloides, cumarinas, azúcares reductores y compuestos fenólicos como los taninos. Por otro lado, en EA se determinó la presencia de taninos, saponinas, alcaloides, flavonoides y azúcares reductores.
- Los extractos alcohólico (EE) y acuoso (EA) presentaron una actividad antimicrobiana moderada, que se respaldó con la información bibliográfica revisada de la capacidad inhibitoria de especies pertenecientes al género *Leucaena*, así como la familia Fabaceae en general. EA obtuvo un porcentaje de inhibición mayor en la bacteria *E. coli* ATCC 8739, y EE obtuvo un porcentaje de inhibición mayor en la bacteria *S. aureus* ATCC 6538. El extracto que otorgó mejores resultados contra ambos microorganismos fue EA.
- La presencia de metabolitos secundarios en EA y EE obtenidos a partir de las hojas de la especie *Leucaena trichodes* (Jacq.) Benth, así como su propiedad antimicrobiana moderada otorgan a la especie un gran potencial de aplicaciones a nivel biotecnológico y biomédico.
- Las comparaciones realizadas en cuanto a la estructura, distribución y morfología de las hojas de la especie recolectada en esta investigación con las muestras conservadas en repositorios en herbarios a nivel internacional permitieron determinar que la especie de estudio es *Leucaena trichodes* (Jacq.) Benth.
- La preparación de los extractos a partir de las hojas de *L. trichodes* con los solventes etanol al 70% y agua destilada por la metodología de extracción por ultrasonido permitió obtener resultados positivos en el tamizaje fitoquímico, así como un porcentaje

moderado de actividad inhibitoria en la bacteria Gram positiva, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* ATCC 8739.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda experimentar en la elaboración de los extractos a partir de las hojas de *L. trichodes* utilizando otras metodologías de extracción, como la maceración o extracción asistida por microondas además de realizar variaciones en los parámetros de temperatura y el tiempo en la extracción por ultrasonido, de forma que sea posible contrastar resultados en la determinación cualitativa de metabolitos secundarios y la actividad antimicrobiana.
- Utilizar solventes de menor polaridad para la preparación de los extractos realizados a partir de las hojas de *L. trichodes*. El uso de solventes de polaridad media, como el cloroformo, podrían utilizarse para conocer si existe un incremento en la capacidad antimicrobiana de los extractos obtenidos, así como en la presencia de metabolitos secundarios.
- Aplicar análisis cuantitativos como la Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) con la finalidad de identificar los compuestos bioactivos que posee y obtener un mayor rango de datos, lo que permitirá evaluar de forma precisa su potencial en futuras aplicaciones.
- Investigar las posibles aplicaciones que poseen los extractos de las hojas de *L. trichodes* en base a la investigación realizada y estudios previos a especies del género *Leucaena*, que permitirán el aprovechamiento de la especie en el desarrollo de fitofármacos, entre otras aplicaciones de carácter biomédico y biotecnológico.

BIBLIOGRAFÍA

- Abair, A., Hughes, C. E., & Bailey, C. D. (2019). The evolutionary history of *Leucaena*: Recent research, new genomic resources and future directions. *Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales*, 7(2), 65–73. [https://doi.org/10.17138/tgft\(7\)65-73](https://doi.org/10.17138/tgft(7)65-73)
- Abril, C. (2023). *Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de pino sobre el crecimiento de comunidades bacterianas resistentes a antibióticos aisladas de los ríos de la ciudad de Quito* [Universidad Internacional SEK].
<https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/4992/1/Abril%20Rincon%20Carol%20Viviana.pdf>
- Abubakar, A., & Haque, M. (2020). Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, 12(1), 1. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19
- Adamski, Z., Blythe, L. L., Milella, L., & Bufo, S. A. (2020). Biological Activities of Alkaloids: From Toxicology to Pharmacology. *Toxins*, 12(4), 210.
<https://doi.org/10.3390/toxins12040210>
- Aderogba, M. A., McGaw, L. J., Bezabih, B. T., & Abegaz, B. M. (2010). Antioxidant activity and cytotoxicity study of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de wit leaf extract constituents. *Nigerian Journal of Natural Products and Medicine*, 13(1).
<https://doi.org/10.4314/njnpm.v13i1.61612>
- Aguirre, Z. (2012). *Especies Forestales de los Bosques secos del Ecuador* (O. Jadán, M. Añazco, & K. Cueva, Eds.).
http://enf.ambiente.gob.ec/web_enf/documentos/especiesForestalesBosqueSeco.pdf

Agustín, A., & Anchundia, P. (2018). “ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO Y FITOQUÍMICO, PRELIMINAR DEL RIZOMA DE LA (*Smilax china*)” [Universidad de Guayaquil].

<http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/33632/1/BCIEQ-T->

[0306%20De%20la%20A%20Ruiz%20Armando%20Agust%20c3%20adn%203b%20Pilligua%20Anchundia%20Jean%20Carlos.pdf](http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/33632/1/BCIEQ-T-0306%20De%20la%20A%20Ruiz%20Armando%20Agust%20c3%20adn%203b%20Pilligua%20Anchundia%20Jean%20Carlos.pdf)

Aher et al. (2017). Biosynthesis of copper oxide nanoparticles using leaves extract of

Leucaena leucocephala L. and their promising upshot against the selected

human pathogens. *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology*, 7(1), 776–786.

https://ijmcm.tonekabon.iau.ir/article_531739_3a92c603e937adb4361f1b278552b34c.pdf

Ahmad, F., Anwar, F., & Hira, S. (2016). REVIEW ON MEDICINAL IMPORTANCE OF FABACEAE FAMILY. *Pharmacology Online*, 3, 151–156.

https://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2016/vol3/PhOL_2016_3_A023_47_Ahmad.pdf

Alam, M., M Alandis, N., Sharmin, E., Ahmad, N., Husain, F. M., & Khan, A. (2020).

Mechanically Strong, Hydrophobic, Antimicrobial, and Corrosion Protective

Polyesteramide Nanocomposite Coatings from *Leucaena leucocephala* Oil: A

Sustainable Resource. *ACS Omega*, 5(47), 30383–30394.

<https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03333>

Alemán-Ramirez, J. L., Okoye, P. U., Torres-Arellano, S., Mejía-Lopez, M., & Sebastian, P.

J. (2022). A review on bioenergetic applications of *Leucaena leucocephala*. *Industrial*

Crops and Products, 182, 114847. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114847>

Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M., & Di Ilio, C. (2013). Escherichia coli in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), 6235–6254. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>

Altemimi, A., Choudhary, R., Watson, D., & Lightfoot, D. (2015). Effects of ultrasonic treatments on the polyphenol and antioxidant content of spinach extracts. *Ultrasonics Sonochemistry*, 24, 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.10.023>

Altemimi, A., Watson, Dennis., Choudhary, R., Dasari, M. R., & Lightfoot, D. A. (2016). Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Peaches and Pumpkins. *PLOS ONE*, 11(2), e0148758. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148758>

Aminzare, M., Abbasi, Z., Amiri, E., Amiri, E., Raeisi, M., Mousavi, N., & Hassanzadaza, H. (2017). *Colibacillosis Phytotherapy: An Overview on the most important world medicinal plants effective on Escherichia coli*. 9(5), 629–636. <https://deliverypdf.ssrn.com/delivery.php?ID=519021121111024080021084084090005026004062027018026066117023111007113125075091064067043099051062060010113069002084016090111121039071017081004077100064101119008064070040042049031079095126025081020114013070000009029105080127018006093109021119104067089064&EXT=pdf&INDEX=TRUE>

Azuola, R., & Vargas, P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnología En Marcha*, 20(4).

Benavides, R., Revelo, Y., Arango, O., & Osorio, O. (2020). Extracción asistida con ultrasonido de compuestos fenólicos de dos variedades de papas (*Solanum phureja*) nativas andinas y evaluación de su actividad antioxidante. *Información Tecnológica*, 31(5), 43–50. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642020000500043>

- Benítez, R., Sarria, R., Gallo, J., Pérez, N., Álvarez, J., & Giraldo, C. (2020). Obtención y rendimiento del extracto etanólico de dos plantas medicinales. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 15(1), 31–40. <https://doi.org/10.18359/rfcb.3597>
- Bermejo, A., Pereira, S., Cintra, L., & Morales, G. (2014). Determinación de parámetros químico- físico de las tinturas al 20% obtenidas de las hojas, tallos y frutos de *Melia azedarach* L (Pursiana) . *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 13(5).
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2014000500004#:~:text=un%20precipitado%20rojo.-,Ensayo%20de%20Espuma,fuertemente%20durante%205%2D10%20min.
- Biswas, T., & Dwivedi, U. N. (2019). Plant triterpenoid saponins: biosynthesis, in vitro production, and pharmacological relevance. *Protoplasma*, 256(6), 1463–1486.
<https://doi.org/10.1007/s00709-019-01411-0>
- Cabrera, E., Díaz, L., Fernández, T., Días, S., Carrasco, A., García, Y., Gama, Y., & Ortiz, G. (2018). Susceptibilidad antimicrobiana de aislados bacterianos en pacientes hospitalizados y comunitarios . *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 70(2).
http://scielo.sld.cu/pdf/mtr/v70n2/a03_210.pdf
- Camba, W., Petroche, D., Cortez, L., & Mariscal, W. (2022). Tamizaje fitoquímico, fenoles totales y actividad antioxidante de *citrus aurantium*. *RECIAMUC*, 6(3), 470–479.
[https://doi.org/10.26820/reciamuc/6.\(3\).julio.2022.470-479](https://doi.org/10.26820/reciamuc/6.(3).julio.2022.470-479)
- Chaurasia, S., & Sharma, P. (2015). Evaluation of Antibacterial and Antimutagenic Potential of *Acokanthera oppositifolia* and *Leucaena leucocephala*. *American Journal of Pharmacy and Health Research*, 3(1). https://www.researchgate.net/profile/Savita-Chaurasia/publication/273015147_Evaluation_of_Antibacterial_and_Antimutagenic_Pot

ential_of_Acokanthera_oppositifolia_and_Leucaena_leucocephala/links/54f575db0cf2ba615066182e/Evaluation-of-Antibacterial-and-Antimutagenic-Potential-of-Acokanthera-oppositifolia-and-Leucaena-leucocephala.pdf

- Chew, Y. L., Ling Chan, E. W., 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), 12. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-12>
- Chimshirova, R., Popova, M., Chakir, A., Valcheva, V., Dimitrov, S., Trusheva, B., Romane, A., & Bankova, V. (2022). Antimicrobial Triterpenoids and Ingot Diterpenes from Propolis of Semi-Arid Region of Morocco. *Molecules*, *27*(7), 2206. <https://doi.org/10.3390/molecules27072206>
- Chowtivannakul, P., Srichaikul, B., & Talubmook, C. (2016). Antidiabetic and antioxidant activities of seed extract from *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. *Agriculture and Natural Resources*, *50*(5), 357–361. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2016.06.007>
- Collaguazo, D., & Márquez, A. (2022). *ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO Y FITOQUÍMICO DE CUATRO ESPECIES VEGETALES REFERIDAS PARA EL TRATAMIENTO DE MASTITIS EN LA PRÁCTICA ANCESTRAL DE LA COMUNIDAD DE PAQUIESTANCIA, CANTÓN CAYAMBE* [Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/22977/1/TTQ804.pdf>
- Coy, C., Parra, J., & Cuca, L. (2014). Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *raputia heptaphylla* (rutaceae). *ELEMENTOS*, *4*(4). <https://doi.org/10.15765/e.v4i4.513>

- Dahanayake, J. M., Perera, P. K., Galappatty, P., Melshandi Perera, H. D. S., & Arawwawala, L. D. A. M. (2019). Comparative Phytochemical Analysis and Antioxidant Activities of Tamalakyadi Decoction with Its Modified Dosage Forms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019, 1–9.
<https://doi.org/10.1155/2019/6037137>
- Dalzell, S. (2019). Leucaena cultivars – current releases and future opportunities. *Tropical Grasslands-Forrajcs Tropicales*, 7(2), 56–64. [https://doi.org/10.17138/tgft\(7\)56-64](https://doi.org/10.17138/tgft(7)56-64)
- Deivasigamani, R. (2018). Phytochemical analysis of *Leucaena leucocephala* on various extracts. *The Journal of Phytopharmacology*, 7(6), 480–482.
https://www.phytopharmajournal.com/Vol7_Issue6_05.pdf
- DES. (2016). *Leucaena trichodes* Benth. Catalog #: DES00086344 Desert Botanical Garden Herbarium (DES). *Desert Botanical Garden Herbarium (DES)*.
- Díaz, M., Lugo, Y., Fonte, L., Castro, I., López, O., & Montejo, I. (2017). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos frescos de hojas de *Morus alba* L. *Evaluación de La Actividad Antimicrobiana de Extractos Frescos de Hojas de Morus Alba L.*, 40(1), 43–48. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=s0864-03942017000100006&script=sci_arttext
- Dubey, A., Kumar, A., & Khan, M. L. (2020). Role of Biostimulants for Enhancing Abiotic Stress Tolerance in Fabaceae Plants. In M. Hasanuzzaman, S. Araújo, & S. Singh (Eds.), *The Plant Family Fabaceae* (pp. 223–236). Springer Singapore.
https://doi.org/10.1007/978-981-15-4752-2_8

- Esclapez, M. D., García-Pérez, J. V., Mulet, A., & Cárcel, J. A. (2011). Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. *Food Engineering Reviews*, 3(2), 108–120.
<https://doi.org/10.1007/s12393-011-9036-6>
- Field Museum Botanical Collection. (1997, March 8). *LEUCAENA TRICHODES (JACQ.) BENTH*. The Field Museum's Online Botanical Collections Database.
<https://plantidtools.fieldmuseum.org/es/rrc/catalogue/289295>
- FLAS. (2016a). *Leucaena trichodes Benth.* Catalog #: 270257 University of Florida Herbarium (FLAS). *University of Florida Herbarium (FLAS)*.
<https://swbiodiversity.org/seinet/collections/individual/index.php?occid=28219326>
- FLAS. (2016b, November 14). *Leucaena trichodes Benth.* Catalog #: 270258 University of Florida Herbarium (FLAS). University of Florida Herbarium (FLAS).
<https://swbiodiversity.org/seinet/collections/individual/index.php?occid=28219327>
- Flor, H., & Mosquera, T. (2017). *Estandarización fitoquímica de extractos hidroalcohólicos de Ishpingo, Ocotea quixos (Lam.) Koste* [Universidad Politécnica Salesiana].
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/14166/1/UPS-QT11566.pdf>
- Foy, E., Mac, D., Cuyos, M., & Dueñas, R. (2005). EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE SAPONINAS EN *Agaricus bisporus*. *Biotempo*, 5, 31–36.
- García, L. (2019). *Actividad de extractos de vaina acaciella angustissima (Fabaceae) contra Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae)* [UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTTARO]. <https://ri-ng.uaq.mx/bitstream/123456789/1496/1/CN-0039-Luis%20Eduardo%20Garc%c3%ada%20Vanegas.pdf>

Ghasemzadeh, A., Jaafar, H., Karimi, E., & Rahmat, A. (2014). Optimization of ultrasound-assisted extraction of flavonoid compounds and their pharmaceutical activity from curry leaf (*Murraya koenigii* L.) using response surface methodology. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 318. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-318>

Ghotekar et al. (2018). Phytofabrication of fluorescent silver nanoparticles from *Leucaena leucocephala* L. leaves and their biological activities. *Journal of Water and Environment Technology*, 3(2), 95–105.
https://www.researchgate.net/publication/328730713_Phytofabrication_of_fluorescent_silver_nanoparticles_from_Leucaena_leucocephala_L_leaves_and_their_biological_activities/link/5bdfa79692851c6b27a79292/download

González, E. (2021). *Adaptabilidad y crecimiento inicial de cuatro especies forestales nativas establecidas en áreas degradadas del Sitio Quimís, cantón Jipijapa* [CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL, UNIVERSIDAD ESTATAL DEL SUR DE MANABÍ].
<http://repositorio.unesum.edu.ec/bitstream/53000/3217/1/CD%20PROYECTO%20DE%20INVESTIGACION%20DIOMEDES%20GONZALEZ.pdf>

Granja, C. (2019). *Síntesis de nanopartículas de plata utilizando como agente reductor los flavonoides, polifenoles y azúcares reductores presentes en el extracto acuoso de las hojas de *Baccharis latifolia* (Chilca)* Granja Moreno, Sandra [PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR].
<http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/16027/TESIS%20FINAL%20CAMILA%20GRANJA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Guerrero, J. (2023). *Análisis fitoquímico de plantas medicinales utilizadas en la medicina tradicional mexicana*. <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/retrieve/f9b2efae-8aa1-4f65-9f98-271f959977e5/250957.pdf>
- Guerrero, N. (2014). *CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ORYCTANTHUS SPICATUS (LORANTHACEAE)*. [Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/7084/1/UPS-QT05854.pdf>
- Gutiérrez, J., Reyes, H., & Castañeda, J. (2017). Análisis fisicoquímico de las hojas de eucalipto camaldulensis y su hidrolizado, como sustrato en la producción de xilitol. *Entre Ciencia e Ingeniería*, 11(22), 76–83. <http://www.scielo.org.co/pdf/ecei/v11n22/1909-8367-ecei-11-22-00076.pdf>
- Harrill, R. (1998). *USING A REFRACTOMETER TO TEST THE QUALITY OF FRUITS & VEGETABLES*. PINEKNOLL PUBLISHING. <https://www.biostim.com.au/pdf/Bbook.pdf>
- Hasanuzzaman, M., Araújo, S., & Singh, S. (2020). *The Plant Family Fabaceae* (M. Hasanuzzaman, S. Araújo, & S. S. Gill, Eds.; 1st ed.). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-4752-2>
- Hernández, S., Quiroz, C., Ramírez, M., Ronquill, E., & Aguilar, M. (2020). Optimización del proceso de extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de Justicia spicigera Schldl. mediante la metodología de superficie de respuesta. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 23. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.246>

- Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *American Society for Microbiology*, 1–15. <https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Kirby-Bauer-Disk-DiffusionSusceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf>
- Hurtado, P., Jurado, B., Ramos, E., & Calixto, M. (2015). Evaluación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico estandarizado de hojas de Juglans Neotropica Diels (nogal peruano). *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 81(3). http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2015000300010&script=sci_arttext&tlng=en
- IDEAM. (2020). *INSTRUCTIVO DE MANEJO DEL ROTAEVAPORADOR Hei-VAP EXPERT*. <http://sgi.ideam.gov.co/documents/412030/35488871/M-S-LC-I069+INSTRUCTIVO+DE+MANEJO+DEL+ROTAEVAPORADOR+Hei-VAP+EXPERT+v2.pdf/9c7d3b46-5822-4a7d-8a84-64c79dcc34bb?version=1.0>
- Ikhmal et al. (2019). Corrosion inhibition of mild steel in seawater through green approach using Leucaena leucocephala leaves extract. *The International Journal of Corrosion and Scale Inhibition*, 8(3), 628–643. https://www.researchgate.net/profile/Wan-Ikhmal/publication/335202917_Corrosion_inhibition_of_mild_steel_in_seawater_through_green_approach_using_Leucaena_leucocephala_leaves_extract/links/5d56712a92851cb74c6fad3e/Corrosion-inhibition-of-mild-steel-in-seawater-through-green-approach-using-Leucaena-leucocephala-leaves-extract.pdf
- Illescas, A., & Lovato, C. (2020). “*ESTUDIO DEL PERFIL FITOQUÍMICO Y POSIBLES APLICACIONES DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS, ETÉREO Y ACUOSO DEL SUNFO (Clinopodium nubigenum (Kunth) Kuntze)*” [Universidad Técnica de Cotopaxi]. <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/6998/1/PC-000970.pdf>

- Izquierdo, M., & Ramirez, L. (2019). *Determinación del efecto del tipo de sustrato y tipo de fuente de carbono, en la cinética de crecimiento del hongo Aspergillus Oryzae en medio sólido* [Universidad Nacional del Centro de Perú].
https://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12894/5309/T010_46992315_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Jebir, R., & Mustafa, Y. (2021). Natural Coumarin-Lead Compounds: A Review of Their Medicinal Potentials. *Department of Pharmaceutical Chemistry, 18*(2).
<https://www.iasj.net/iasj/download/b47504fd919040cb>
- Jha, D., Panda, L., Lavanya, P., Ramaiah, S., & Anbarasu, A. (2012). Detection and Confirmation of Alkaloids in Leaves of Justicia adhatoda and Bioinformatics Approach to Elicit Its Anti-tuberculosis Activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology, 168*(5), 980–990. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9834-1>
- Jishtu, V., & Goraya, G. S. (2020). Leguminosae (nom. alt. Fabaceae)—Its Diversity, Use and Role in Environmental Conservation in the Harsh Environs of the Cold Deserts of North-West India. In M. Hasanuzzaman, S. Araújo, & S. Singh (Eds.), *The Plant Family Fabaceae* (Springer Singapore, pp. 261–285). Springer Singapore.
https://doi.org/10.1007/978-981-15-4752-2_10
- Junod, T., López-Martin, J., & Gädicke, P. (2013). Estudio de susceptibilidad antimicrobiana de Salmonella enterica en muestras de origen animal y alimentario. *Revista Médica de Chile, 141*(3), 298–304. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872013000300003>
- Kalpana, S., Dhananjaha, K., Ravikumar, K., & Mallesha, H. (2013). Antibacterial activity of Sechium edule (Jacq.) Swartz against gram negative food borne bacteria . *Advances in Applied Science Research, 4*(2), 259–261. <https://www.researchgate.net/profile/Kalpana->

Kaushik-

2/publication/311738950_Antibacterial_activity_of_Sechium_edule_Jacq_Swartz_against_gram_negative_food_borne_bacteria/links/5858dfb308ae64cb3d4880d0/Antibacterial-activity-of-Sechium-edule-Jacq-Swartz-against-gram-negative-food-borne-bacteria.pdf

Krishnaswamy, N. (2003). *Chemistry of Natural Products - A Laboratory Handbook* (1st ed., Vol. 1). Universities Press.

<https://books.google.com.ec/books?id=pfRQQnVQ78C&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>

Kristianto et al. (2019). Eliminación de la solución acuosa roja del Congo utilizando extracto de semilla de *Leucaena leucocephala* como coagulante natural. *Ciencia Aplicada Del Agua*, 88. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13201-019-0972-2>

Li, J., Liu, D., Tian, X., Koseki, S., Chen, S., Ye, X., & Ding, T. (2019). Novel antibacterial modalities against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* derived from plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(sup1), S153–S161.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1541865>

Llamas, F., & Acedo, C. (2016). Las leguminosas (Leguminosae o Fabaceae): una síntesis de las clasificaciones, taxonomía y filogenia de la familia a lo largo del tiempo.

Ambiociencias, 14, 5–10.

<https://centros.unileon.es/biologia/files/2013/05/AmbioCiencias.pdf#page=7>

Maigoda, T., Judiono, J., Purkon, D. B., Haerussana, A., & Mulyo, G. (2022). Evaluation of *Peronema canescens* Leaves Extract: Fourier Transform Infrared Analysis, Total Phenolic and Flavonoid Content, Antioxidant Capacity, and Radical Scavenger Activity.

Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences, 10(A), 117–124.

<https://doi.org/10.3889/oamjms.2022.8221>

Mencias, H., & Salazar, T. (2018). “*ESTUDIO FITOQUÍMICO, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ESPECIES DE ORQUÍDEAS DE LOS GÉNEROS EPIDENDRUM, ONCIDIUM Y CAUCAEA*” [Universidad Politécnica Salesiana].

<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15932/1/UPS-QT13094.pdf>

Mohammed, R., Souda, S., Taie, H., E.Moharam, M., & Shaker, K. (2015). Antioxidant, antimicrobial activities of flavonoids glycoside from *Leucaena leucocephala* leaves.

Journal of Applied Pharmaceutical Science, 138–147.

<https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50623>

Molton, J. S., Tambyah, P. A., Ang, B. S. P., Ling, M. L., & Fisher, D. A. (2013). The Global Spread of Healthcare-Associated Multidrug-Resistant Bacteria: A Perspective From Asia. *Clinical Infectious Diseases*, 56(9), 1310–1318. <https://doi.org/10.1093/cid/cit020>

Mora, A., Serrano, R., Lira, R., Jiménez, M., & Hernández, T. (2021). Evaluación de la actividad antimicrobiana de semillas de *Leucaena esculenta* y *Leucaena leucocephala* recolectadas en Tlayacapan, Morelos, México. *Polibotánica*, 0(52).

<https://doi.org/10.18387/polibotanica.52.12>

Mutha, R., Tatiya, A., & Surana, S. (2021). Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: an overview. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25.

<https://fjps.springeropen.com/articles/10.1186/s43094-020-00161-8>

Naranjo, J., Barcos, M., Sornoza, L., & Pino, A. (2019). *Los gigantes del Bosque Seco* (ESPOL).

- Naturalis Biodiversity Center. (1989, January 21). *Leucaena trichodes* (Jacq.) Benth. *Catalog* #: U.1315165 *Catalog* #: U.1315165. Naturalis Biodiversity Center .
<https://herbariovaa.org/collections/individual/index.php?occid=4723983>
- Naturalis Biodiversity Center. (1997a, March 8). *Leucaena trichodes* (Jacq.) Benth. *Catalog* #: L.3895782. Naturalis Biodiversity Center.
- Naturalis Biodiversity Center. (1997b, March 8). *Leucaena trichodes* (Jacq.) Benth. *Catalog* #: U.1315167. Naturalis Biodiversity Center.
<https://herbariovaa.org/collections/individual/index.php?occid=4723981>
- NCBI. (2023). *Leucaena trichodes* Taxonomy. NCBI Taxonomy Browser.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=190761>
- Nguyen, L. T., Farcas, A. C., Socaci, S. A., Tofana, M., Diaconeasa, Z. M., Pop, O. L., & Salanta, L. C. (2020). An Overview of Saponins – A Bioactive Group. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Food Science and Technology*, 77(1), 25. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-fst:2019.0036>
- Ondusko, D. S., & Nolt, D. (2018). Staphylococcus aureus. *Pediatrics In Review*, 39(6), 287–298. <https://doi.org/10.1542/pir.2017-0224>
- Parrales, A., & Villamar, J. (2021). *ESTUDIO DE LOS ALCALOIDES PRESENTE EN EL BEJUCO DE LA SARAGOZA (Aristolochia elegans)*. [Universidad de Guayaquil].
<http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/58925/1/BCIEQ-T-%200708%20Parrales%20Alay%20Anthony%20Wladimir%3b%20Villamar%20Pibaqu%20Janice%20Andreina.pdf>

- Pham, D., Nguyen, H., Nguyen, T.-H., Ho, H.-L., Trinh, T.-K., Riyaphan, J., & Weng, C.-F. (2020). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Flavonoids from *Celastrus hindsii* Leaves Using Response Surface Methodology and Evaluation of Their Antioxidant and Antitumor Activities. *BioMed Research International*, 2020, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2020/3497107>
- Pirvu, L., Hlevca, C., Nicu, I., & Bubueanu, C. (2014). Comparative studies on analytical, antioxidant, and antimicrobial activities of a series of vegetal extracts prepared from eight plant species growing in Romania. *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, 27(5), 346–356. <https://doi.org/10.1556/JPC.27.2014.5.4>
- Poolman, J. T., & Anderson, A. S. (2018). *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: leading bacterial pathogens of healthcare associated infections and bacteremia in older-age populations. *Expert Review of Vaccines*, 17(7), 607–618. <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1488590>
- POWO. (2023). *Leucaena trichodes (Jacq.) Benth.* Royal Botanic Gardens - Plants of the World Online. <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:502757-1>
- Qin, N., Lu, X., Liu, Y., Qiao, Y., Qu, W., Feng, F., & Sun, H. (2021). Recent research progress of *Uncaria* spp. based on alkaloids: phytochemistry, pharmacology and structural chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 210, 112960. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112960>
- Rahmadea et al. (2020a). COMBINATION TEST OF CHINESE LEAF EXTRACT (*Leucaena leucocephala* folium) AND ALOE VERA INHIBITING GROWTH *Escherichia coli*. *Indonesian Jpurnal of Medical Laboratory Science and Technology*, 2(2), 50–100. <https://journal2.unusa.ac.id/index.php/IJMLST/article/view/1577>

- Rahmadea et al. (2020b). COMBINATION TEST OF CHINESE LEAF EXTRACT (Leucaena leucocephala folium) AND ALOE VERA INHIBITING GROWTH Escherichia coli. *Indonesian Jpurnal of Medical Laboratory Science and Technology*, 2(2), 50–100. <https://journal2.unusa.ac.id/index.php/IJMLST/article/view/1577>
- Ramírez, K., & Ruiz, M. (2021). *Estudio químico y actividad antioxidante de las hojas y corteza del tallo de Carapa guianensis* [Universidad de Guayaquil]. <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/54249/1/BCIEQ-T-200639%20Ram%c3%adrez%20Perguachi%20Kevin%20Jonathan%3b%20Ruiz%20Moreano%20Mayra%20Johanna.pdf>
- Raviolo, A., Carabelli, P., & Ekkert, T. (2022). Aprendizaje del concepto de densidad: la comprensión de las relaciones entre las variables. *Latin American Physics Education Network*, 16(2). <https://rid.unrn.edu.ar/bitstream/20.500.12049/9270/1/Raviolo%2c%20Carabelli%20y%20Ekkert%202023%20Densidad.pdf>
- Renda, G., Gökkaya, İ., & Şöhretoğlu, D. (2022). Immunomodulatory properties of triterpenes. *Phytochemistry Reviews*, 21(2), 537–563. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09785-x>
- Ricaurte, P., Angulo, J., Papanicolau, J., & Arboleda, L. (2021). Determinación de la presencia de flavonoides en el extracto de las hojas de frutipan (artocarpus altilis) responsables del proceso de cicatrización de heridas. *Pro Sciences: Revista de Producción, Ciencias e Investigación*, 5(38), 37–47. <https://doi.org/10.29018/issn.2588-1000vol5iss38.2021pp37-47>

Rivas, Y., & Tomalá, Y. (2018). *ESTABILIDAD DE BETANINA EN EXTRACTO ACUOSO Y ETANÓLICO EN CÁSCARAS DE PITAHAJA ROJA (Hylocereus undatus Haw)*

[Universidad Politécnica Salesiana].

[http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/28415/1/BCIEQ-T-](http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/28415/1/BCIEQ-T-0273%20Rivas%20Serrano%20Yaritz%20del%20Pilar%3b%20Tomal%3a%20Pih)

[0273%20Rivas%20Serrano%20Yaritz%20del%20Pilar%3b%20Tomal%3a%20Pih](http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/28415/1/BCIEQ-T-0273%20Rivas%20Serrano%20Yaritz%20del%20Pilar%3b%20Tomal%3a%20Pih)
[uave%20Yuly%20Lisseth.pdf](http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/28415/1/BCIEQ-T-0273%20Rivas%20Serrano%20Yaritz%20del%20Pilar%3b%20Tomal%3a%20Pih)

Rojas, T., Fuentes, M., Contreras, E., Gómez, S., & Muñoz, M. (2019). Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la cáscara de sanky (*Corryocactus brevistylus*). *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 85(2).

[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2019000200012&script=sci_arttext&tlng=pt)

[634X2019000200012&script=sci_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2019000200012&script=sci_arttext&tlng=pt)

Roy, A., Khan, A., Ahmad, I., Alghamdi, S., Rajab, B. S., Babalghith, A. O., Alshahrani, M. Y., Islam, S., & Islam, Md. R. (2022). Flavonoids a Bioactive Compound from Medicinal Plants and Its Therapeutic Applications. *BioMed Research International*, 2022, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2022/5445291>

Royer, G., Adamek, J., Adamek, J., Blanche, L., Bezzarga, A., Boniface-Chang, G., Brunner, A., Curel, C., Dulac-Arnold, G., Malou, N., Nordon, C., Runge, V., Samson, F., Sebastian, E., Soukieh, D., Vert, J.-P., Ambroise, C., & Madoui, M.-A. (2020). The first AI-based mobile application for antibiotic resistance testing. *BioRxiv*, 24–25.

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.07.23.216929v2>

San Román, D. (2014). *DESARROLLO DE UN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA DETECCIÓN DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS (PAs) EN MIELES Y POLEN DE PLANTAS MELÍFERAS DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN [CIATEJ]*.

<https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/66/1/Daniel%20Armando%20San%20Rom%C3%A1n%20Avila.pdf>

Sánchez, A., González, J., & Faria, J. (2007). Evolución comparada de la composición química con la edad al corte en las especies *Leucaena leucocephala* y *L. trichodes*. *Zootecnia Tropical*, 25(3).

https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692007000300016

Santamaría, E. (2019). *PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN FARMACIA CLÍNICA Y HOSPITALARIA* [Universidad Regional Autónoma de los Andes].

<https://dspace.uniandes.edu.ec/bitstream/123456789/10052/1/PIUAMFCH002-2019.pdf>

Santos, M. O. S., Nunes, V. J. S. F., Magalhães, B. E. A. de, Santos Júnior, A. de F., & Santana, D. de A. (2021). BIOATIVOS FENÓLICOS EM CHÁ DE HIBISCO (*HIBISCUS SADBARIFFA* L): AVALIAÇÃO QUIMIOMÉTRICA DOS FATORES DE EXTRAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DO PREPARO. In *Ciência e Tecnologia de Alimentos: pesquisa e práticas contemporâneas* (pp. 125–140). Editora Científica Digital. <https://doi.org/10.37885/210504835>

Saosoong, K., & Ruangviriyachai, C. (2016). Antimicrobial Activity and Chemical Constituents of the Extract from *Jatropha curcas* Fruit. *Oriental Journal of Chemistry*, 32(2), 1163–1169. <https://doi.org/10.13005/ojc/320242>

Satar, A., & Abdul, T. (2023). Phytochemical Screening of Petroleum Ether Fractions by GC/MS and Isolation of Lupeol from Two Different Parts of Iraqi *Leucaena leucocephala*. (Conference Paper)#. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences (P-ISSN 1683*

- 3597 E-ISSN 2521 - 3512), 31(Suppl.), 62–74.

<https://doi.org/10.31351/vol31issSupl.pp62-74>

Septina, E., Desni, R., & Rivai, H. (2020). Overview of Traditional Use, Phytochemical, and Pharmacological Activities of Chinese Petai (*Leucaena leucocephala*). *Journal of Pharmaceutical Sciences and Medicine (IJPSM)*, 5(12), 1–10.

<https://ijpsm.com/Publish/Dec2020/V5I1201.pdf>

Serpa, L. (2021). *Encapsulación de extractos vegetales en liposomas y sistemas derivados*. Universidad de Cartagena.

Sharma, P., Tyagi, A., Bhansali, P., Pareek, S., Singh, V., Ilyas, A., Mishra, R., & Poddar, N. K. (2021). Saponins: Extraction, bio-medicinal properties and way forward to anti-viral representatives. *Food and Chemical Toxicology*, 150, 112075.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112075>

Soto, M. (2015). Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedentes de la región Amazonas. *In Crescendo*, 6(1), 33. <https://doi.org/10.21895/incres.2015.v6n1.04>

Sulaiman, C., & Balachandran, I. (2012). Total phenolics and total flavonoids in selected Indian medicinal plants. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74(3), 258.

<https://doi.org/10.4103/0250-474X.106069>

Tak, A. A., & Kakde, U. B. (2017). ASSESSMENT OF AIR POLLUTION TOLERANCE INDEX OF PLANTS: A COMPARATIVE STUDY. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 9(7), 83. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i7.18447>

- Tong, W.-Y. (2013). Biotransformation of Terpenoids and Steroids. In *Natural Products* (Vol. 1, pp. 2733–2759). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_122
- Troiani, H., Prina, A., Muiño, W., Tamame, M., & Beinticinco, L. (2017). *Botánica, morfología, taxonomía y fitogeografía* (M. Caraballo, Ed.). Universidad Nacional de La Pampa. <https://repo.unlpam.edu.ar/bitstream/handle/unlpam/110/1b-trobot017.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Truong, W., Hidayat, L., Bolaris, M., Nguyen, L., & Yamaki, J. (2021). The antibiogram: key considerations for its development and utilization. *JAC-Antimicrobial Resistance*, 3(2). <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab060>
- Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., & Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines*, 5(3), 93. <https://doi.org/10.3390/medicines5030093>
- USF. (1980, August 7). *Leucaena trichodes (Jacq.) Benth - University of South Florida Herbarium (USF)*. <https://swbiodiversity.org/seinet/collections/individual/index.php?occid=21646109>
- Usman, M., Khan, W. R., Yousaf, N., Akram, S., Murtaza, G., Kudus, K. A., Ditta, A., Rosli, Z., Rajpar, M. N., & Nazre, M. (2022). Exploring the Phytochemicals and Anti-Cancer Potential of the Members of Fabaceae Family: A Comprehensive Review. *Molecules*, 27(12), 3863. <https://doi.org/10.3390/molecules27123863>
- Veiga, M., Costa, E. M., Silva, S., & Pintado, M. (2020). Impact of plant extracts upon human health: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(5), 873–886. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1540969>

- Vera, M., Naranjo, J., Calle, M., & Pino, A. (2021). Evaluación ecológica rápida para un ciclismo de montaña responsable en el bosque seco tropical, Guayaquil, Ecuador. *Ecuadorian Science Journal*, 5(3), 1–11. <https://doi.org/10.46480/esj.5.3.139>
- Widayanti, V., Pranowo, D., Gadizza Perdani, C., Kurnia Sinta, D., & Arini Sundari, S. (2023). Microwave-assisted extraction (MAE) method for optimization of dates seed (Phoenix dactilifera) extraction. *Advances in Food Science, Sustainable Agriculture and Agroindustrial Engineering*, 6(1), 49–61. <https://doi.org/10.21776/ub.afssae.2023.006.01.5>
- Yige, C., Fangqing, C., Lei, L., & Shunbo, Z. (2012). Physiological Responses of Leucaena leucocephala Seedlings to Drought Stress. *Procedia Engineering*, 28, 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.01.691>
- Zaky, M., & Samling, B. (2016). PHYTOCHEMICAL CONSTITUENTS OF THE LEAVES OF LEUCAENA LEUCOCEPHALA FROM MALAYSIA. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(12). https://www.researchgate.net/profile/Mohamed-Zayed-14/publication/311418921_Phytochemical_constituents_of_the_leaves_of_Leucaena_leucocephala_from_Malaysia/links/5847307108ae2d2175703b5a/Phytochemical-constituents-of-the-leaves-of-Leucaena-leucocephala-from-Malaysia.pdf
- Zhang, S., Jin, J., Chen, J., Ercisli, S., & Chen, L. (2022). Purine alkaloids in tea plants: component, biosynthetic mechanism and genetic variation. *Beverage Plant Research*, 2(1), 1–9. <https://doi.org/10.48130/BPR-2022-0013>

ANEXOS

ANEXO A. Localización geográfica de la especie recolectada *Leucaena trichodes* (Jacq.)

Benth. Guayaquil – Ecuador.

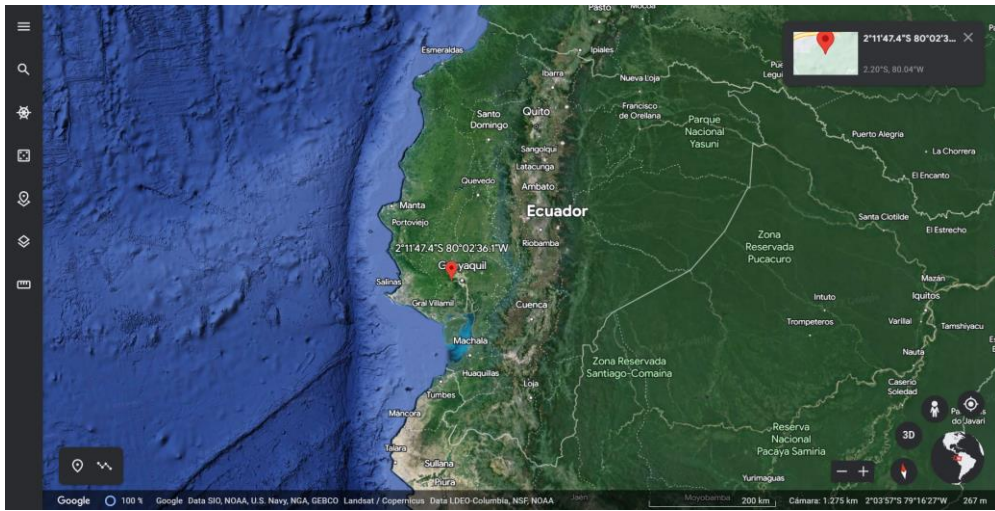


Gráfico 1: Mapa de la ubicación geográfica de la especie recolectada en Ecuador.

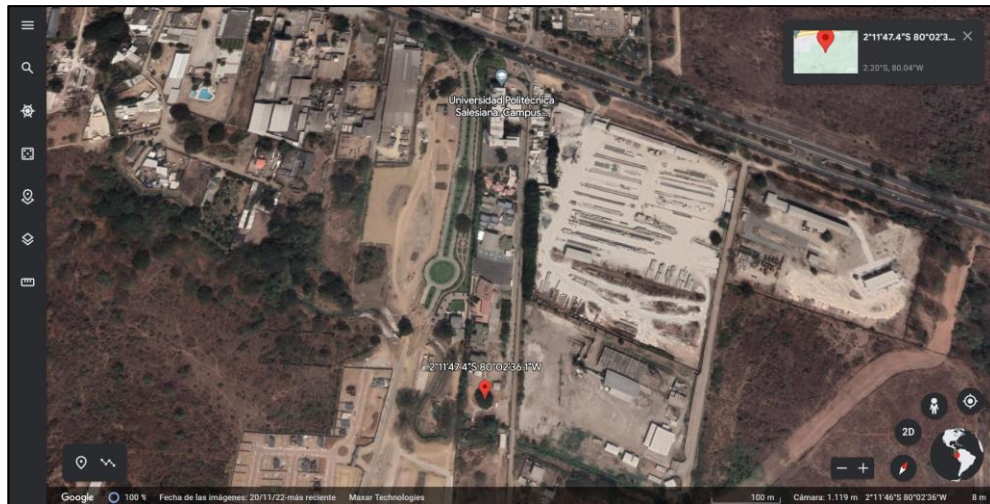


Gráfico 2: Fotografía de la ubicación geográfica de la especie en la ciudad de Guayaquil.

Obtenido por Google Earth por (Albán, 2023)

ANEXO B. Recolección de la especie *Leucaena trichodes* (Jacq.) Benth

Fotografías realizadas por: (Albán, 2023).



Gráfico 3: Fotografía de l especie L. trichodes in situ.



Gráfico 4: Fotografía de las ramificaciones y hojas de la especie.



Gráfico 5: Presencia de inflorescencias





Gráfico 6: Presencia de semillas



Gráfico 7 y 8: Medidas de una hoja de *L. trichodes*

Gráfico 9: Fotografía de inflorescencia de *L. trichodes*

ANEXO C. Comparación de muestra de *L. trichodes* obtenida en la investigación con muestras obtenidas del repositorio Naturalis Biodiversity Center.

Muestras vegetales herborizadas de <i>Leucaena trichodes</i> (Jacq.) Benth	
Muestras herborizadas por (Albán, 2023)	Repositorio de Naturalis Biodiversity Center
	
Gráfico 10	Gráfico 11

Origen de la muestra: Ecuador, provincia del Guayas.

(Albán, 2023).

Origen de la muestra: Perú, provincia de Tumbes.

(Naturalis Biodiversity Center, 1989).



Gráfico 12

Origen de la muestra: Ecuador, provincia del Guayas.

(Albán, 2023).



Gráfico 13

Origen de la muestra: Ecuador, Provincia de Loja

(Naturalis Biodiversity Center, 1997b).



Gráfico 14

Origen de la muestra: Ecuador, provincia del Guayas.

(Albán, 2023).

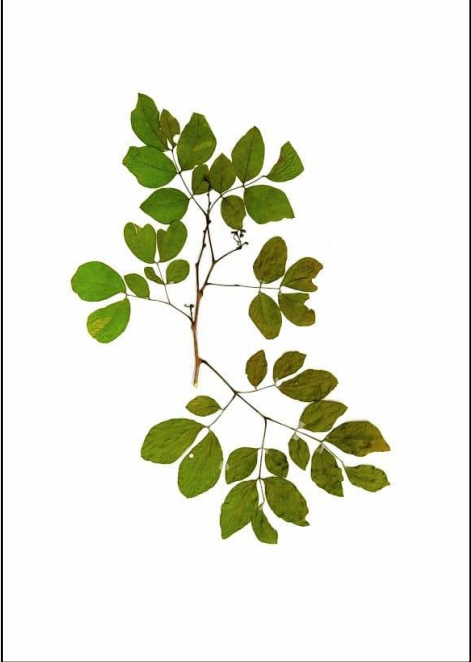
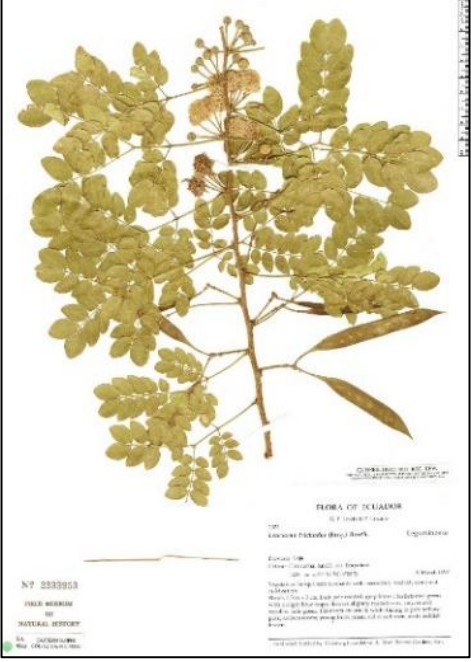


Gráfico 15



Origen de la muestra: Ecuador, Provincia de Loja

(Naturalis Biodiversity Center, 1997a).

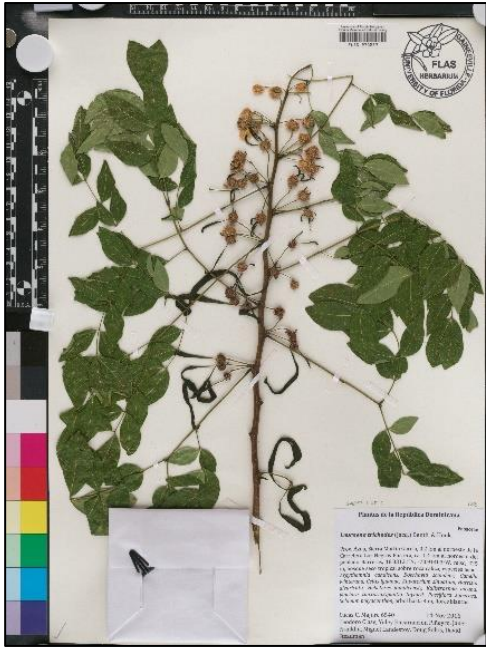
ANEXO D. Comparación de muestra de *L. trichodes* obtenida en la investigación con muestra obtenida del repositorio del Field Museum Botanical Collection.

Muestras vegetales herborizadas de <i>Leucaena trichodes</i> (Jacq.) Benth	
Muestras herborizadas por (Albán, 2023).	Repositorio del Field Museum Botanical Collection
	
<p>Gráfico 16</p> <p>Origen de la muestra: Ecuador, provincia del Guayas.</p> <p>(Albán, 2023).</p>	<p>Gráfico 17</p> <p>Origen de la muestra: Ecuador, provincia de Loja.</p> <p>(Field Museum Botanical Collection, 1997).</p>

ANEXO E. Comparación de muestra de *L. trichodes* obtenida en la investigación con muestra recopilada en el Herbario de la Universidad de South Florida.

Muestras vegetales herborizadas de <i>Leucaena trichodes</i> (Jacq.) Benth.	
Muestras herborizadas por (Albán, 2023)	Repositorio del Herbario de la Universidad de South Florida (USF)
	
<p>Gráfico 18</p> <p>Origen de la muestra: Ecuador, provincia del Guayas.</p> <p>(Albán, 2023).</p>	<p>Gráfico 19</p> <p>Origen de la muestra: Ecuador, provincia de Manabí.</p> <p>(USF, 1980).</p>

ANEXO F. Comparación de muestra de *L. trichodes* obtenida en la investigación con muestras obtenidas del repositorio del Herbario de la Universidad de Florida.

Muestras vegetales herborizadas de <i>Leucaena trichodes</i> (Jacq.) Benth.	
Muestras herborizadas por (Albán, 2023).	Repositorio del Herbario de la Universidad de Florida (FLAS)
	
<p>Gráfico 20</p> <p>Origen de la muestra: Ecuador, provincia del Guayas.</p> <p>(Albán, 2023).</p>	<p>Gráfico 21</p> <p>Origen de la muestra: República Dominicana, provincia de Azua</p> <p>(FLAS, 2016a).</p>

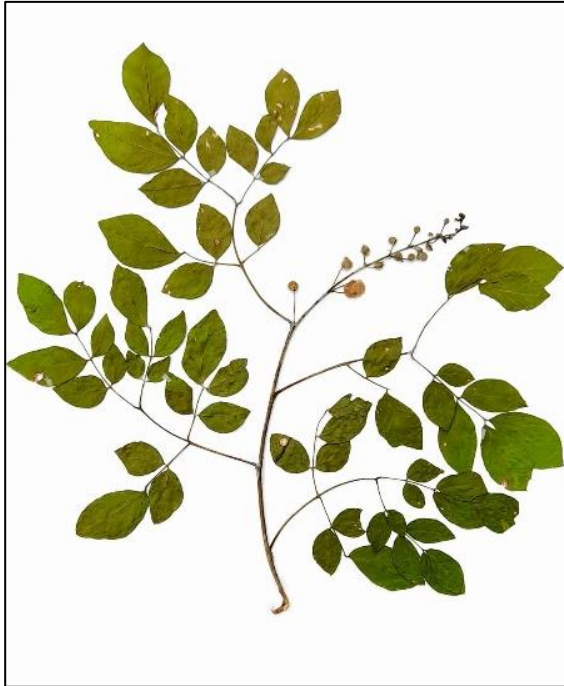


Gráfico 22

Origen de la muestra: Ecuador, provincia del Guayas.

(Albán, 2023).

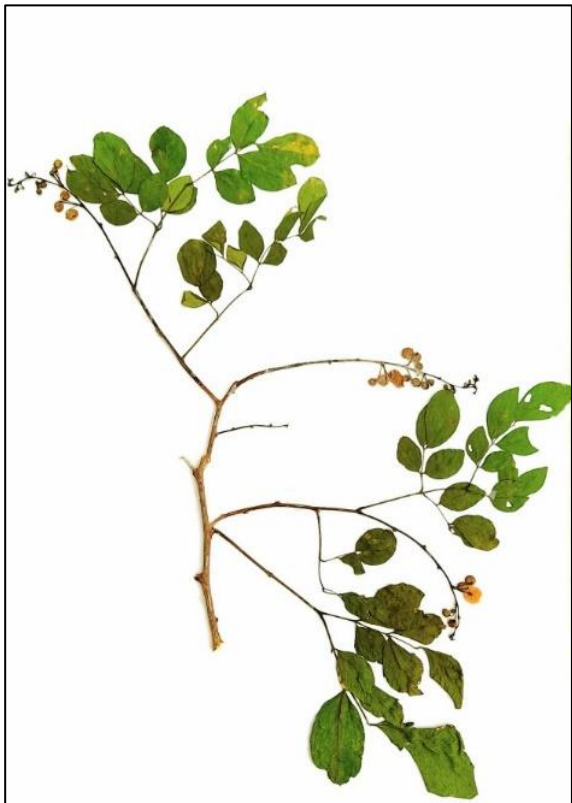



Gráfico 23

Origen de la muestra: República Dominicana.

(FLAS, 2016b).

ANEXO G. Comparación de muestra de *L. trichodes* obtenida en la investigación con muestra obtenida del repositorio del Herbario Desert Botanical Garden.

Muestras vegetales herborizadas de <i>Leucaena trichodes</i> (Jacq.) Benth.	
Muestras herborizadas por (Albán, 2023).	Repositorio del Herbario Desert Botanical Garden
	
<p>Gráfico 24</p> <p>Origen de la muestra: Ecuador, provincia del Guayas.</p> <p>(Albán, 2023).</p>	<p>Gráfico 25</p> <p>Origen de la muestra: República Dominicana</p> <p>(DES, 2016).</p>

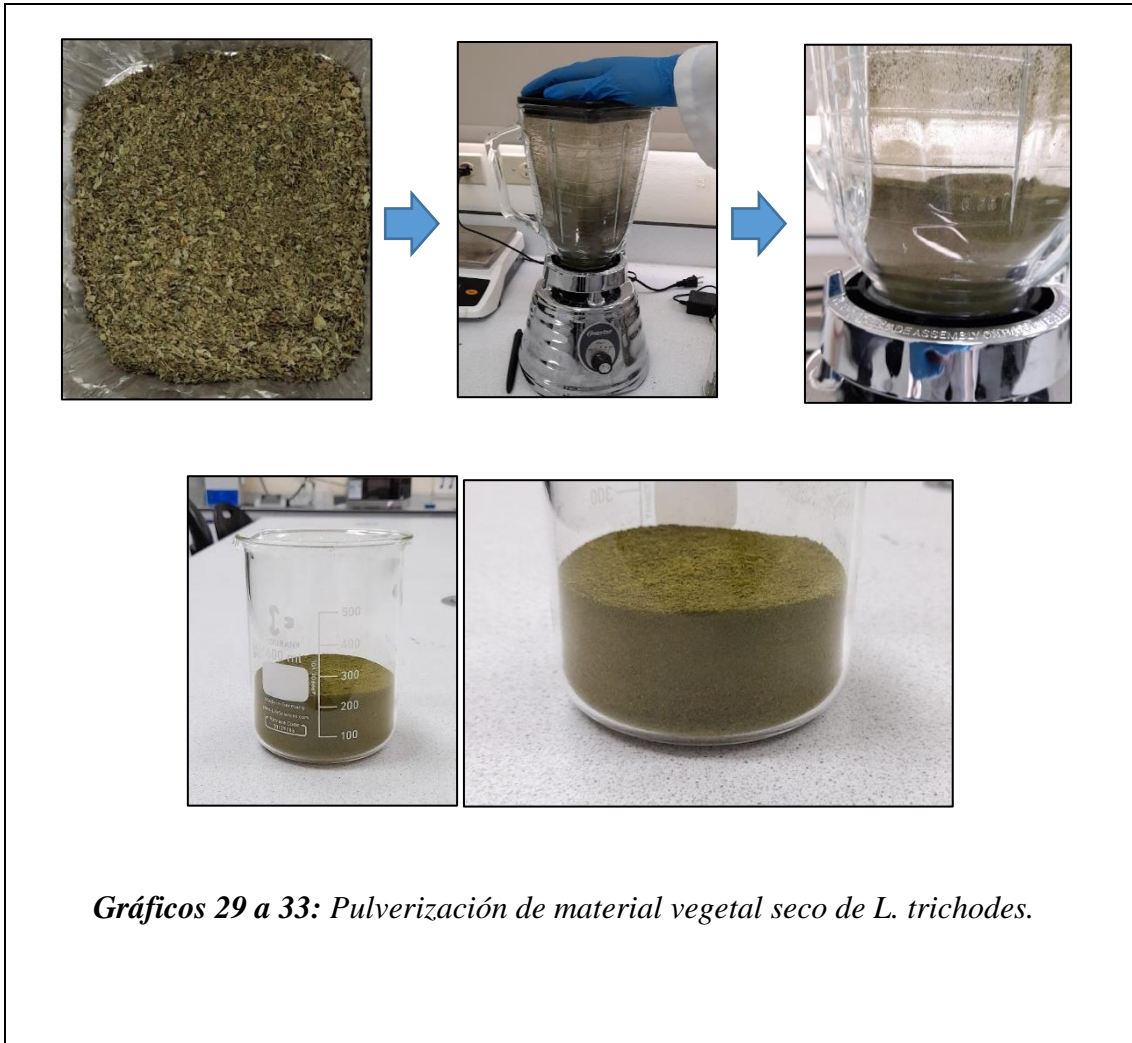
ANEXO H. *Desinfección, secado, triturado y pulverizado de las hojas frescas de Leucaena trichodes (Jacq.) Benth.*



Gráficos 26, 27 y 28: *Desinfección de las hojas frescas recolectadas de L. trichodes y secado a la interperie.*



Gráficos 29 y 30: *Triturado de las hojas de L. trichodes y proceso de secado en estufa.*



ANEXO I. Prueba preliminar de extractos con concentraciones 1:10 y 1:100.



ANEXO J. *Preparación de extractos acuoso y etanólico al 70% a partir de las hojas de *Leucaena trichodes* (Jacq.) Benth.*



Gráficos 39 y 40: *Proceso de obtención de extractos mediante la metodología de extracción por ultrasonido.*



Gráficos 41 a 44: *Filtrado al vacío de los extractos obtenidos y proceso de eliminación de solvente del extracto etanólico con rotavapor.*



Gráficos 45 a 47: Obtención del producto final de los extractos alcohólico (45) y acuoso (46), con su respectiva conservación en frascos ámbar (47).



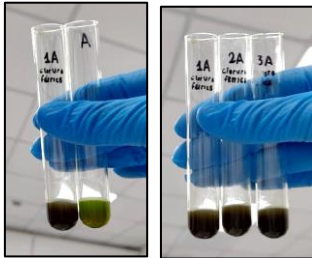
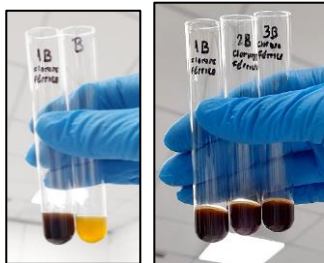
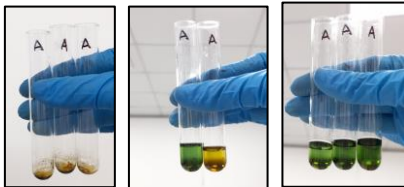
Gráfico 48: Prueba de tamizaje fitoquímico

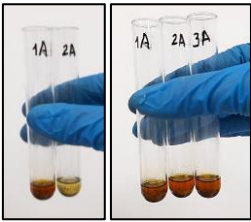
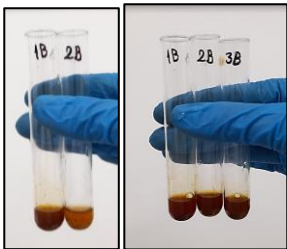

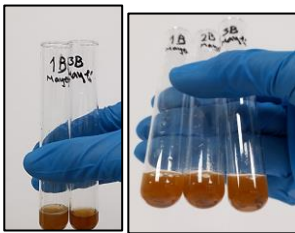
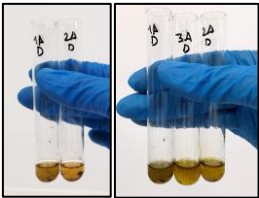
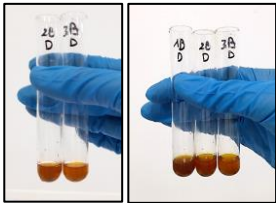
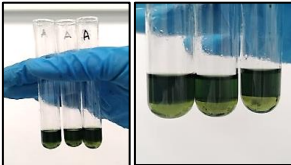
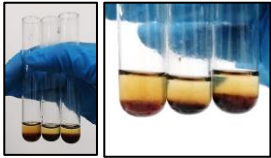
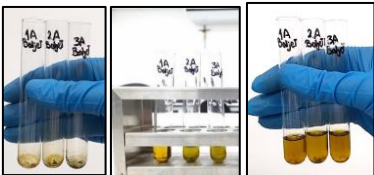
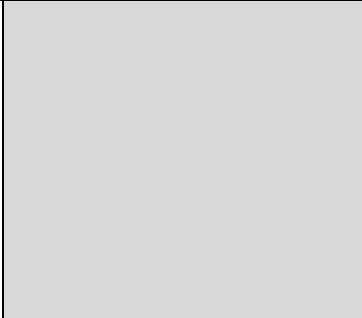
ANEXO K. Determinación de parámetros fisicoquímicos.

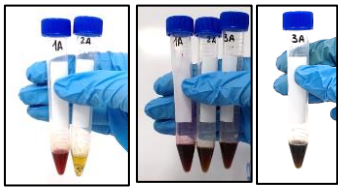
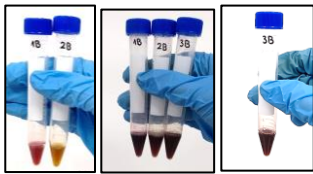
<p>DETERMINACIÓN DE GRADOS BRIX DE EXTRACTOS HUMEDAD</p>	<p>DE GRADOS BRIX DE EXTRACTOS ALCOHÓLICO Y ACUOSO</p>
	
<p>ANÁLISIS DE ASPECTO DE LOS EXTRACTOS</p>	<p>PH DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS</p>
	

DENSIDAD DE SOLVENTES	ANÁLISIS DE ASPECTO
	

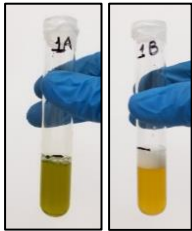
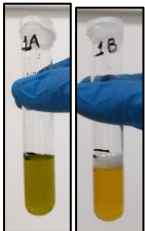
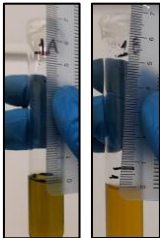
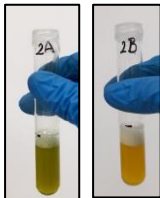
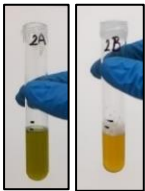
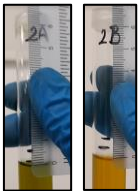
ANEXO L. Tamizaje fitoquímico.


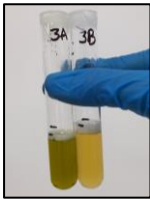
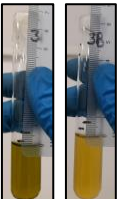
Tamizaje fitoquímico	(A) Extracto etanólico al 70%	(B) Extracto acuoso
Cloruro Férrico Metabolito a analizar: Fenoles y taninos (A) Taninos (B)	+++ 	+++ 
Liebermann – Burchard Metabolito a analizar: Triterpenos, esteroides	++ 	
Wagner	++	+++

<p>Metabolito a analizar: Alcaloides</p>		
<p>Mayer Metabolito a analizar: Alcaloides</p>	<p>+</p> 	<p>+++</p> 
<p>Dragendorff Metabolito a analizar: Alcaloides</p>	<p>+</p> 	<p>+++</p> 
<p>Shinoda Metabolito a analizar: Flavonoides</p>	<p>-</p> 	<p>+</p> 
<p>Baljet Metabolito a analizar: Lactonas (Cumarinas)</p>	<p>+</p> 	

<p>Fehling</p> <p>Metabolito a analizar:</p> <p>Azúcares reductores</p>	+	+
		

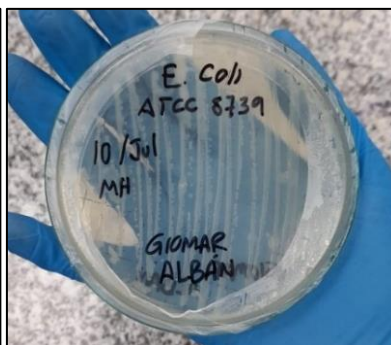
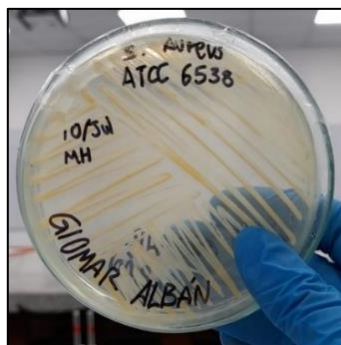
ANEXO M. Prueba de espuma

Prueba de espuma	Tiempo de espera: 2 minutos	Medición final:	Conclusión
			<p>1A:</p> <p>Espuma 0,3cm</p> <p>Luego de 2 minutos <0,1cm.</p> <p>1B</p> <p>Espuma: 0,7cm</p> <p>Luego de dos minutos: 0,3cm</p>
			<p>2A:</p> <p>Espuma: 0,5 cm</p> <p>Luego de 2 minutos: 0,1cm</p> <p>2B:</p> <p>Espuma: 0,8cm</p> <p>Luego de dos minutos: 0,5cm</p>

			<p>3A</p> <p>Espuma: 0,6 cm</p> <p>Luego de dos minutos: 0,15cm</p> <p>3B</p> <p>Espuma: 0,7 cm</p> <p>Luego de dos minutos: 0,4cm</p>
---	---	---	--

ANEXO N. *Antibiograma por difusión con discos de los extractos alcohólico y acuoso de las hojas de L. trichodes en S. aureus ATCC 6538 y E. coli ATCC 8739.*

ANTIBIOGRAMA



Gráficos 48 y 49: Bacterias *S. aureus* ATCC 6538 y *E. coli* ATCC 8739

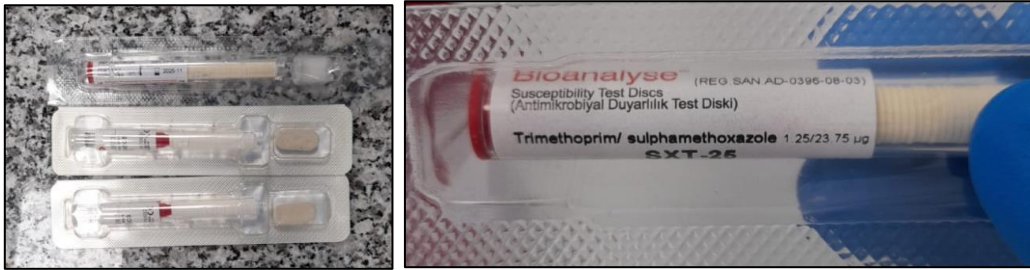
Gráfico 50: Inóculo preparado



Gráficos 51 a 54: Preparación de la escala McFarland (51), Absorbancia de la escala McFarland (52), Absorbancia del inóculo de *S. aureus* ATCC 6538 (53) y Absorbancia del inóculo de *E. coli* ATCC 8739 (54).

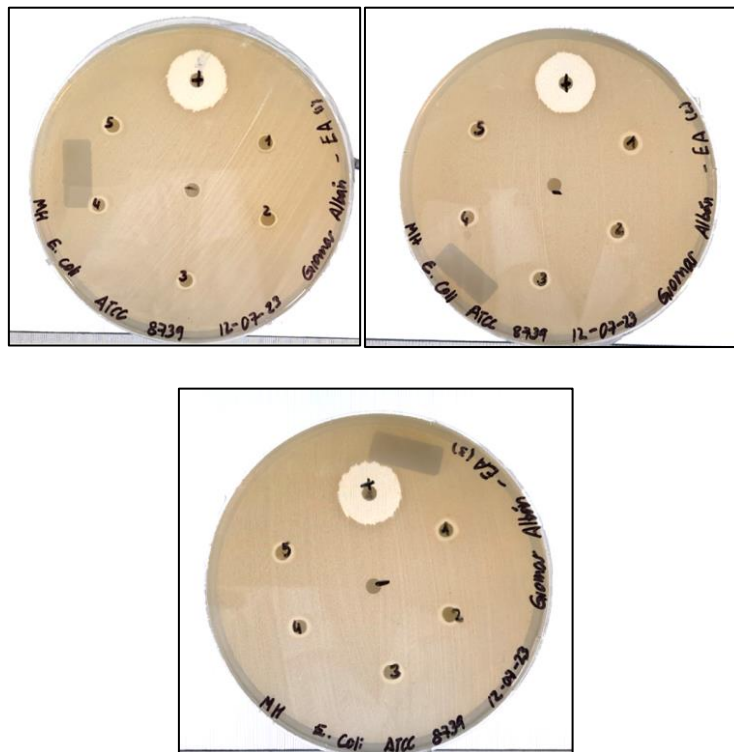


Gráficos 55 a 56: Procedimiento de antibiograma de difusión por discos (55) y los extractos alcohólico y acuoso en las concentraciones 15, 25, 50, 75 y 100% (56).



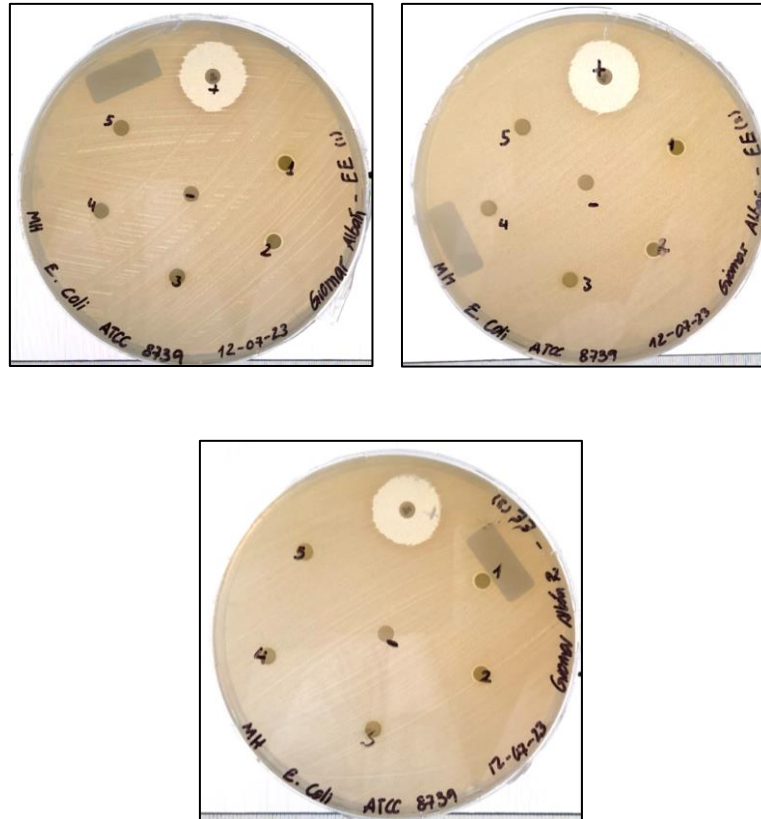
Gráficos 57 y 58: Discos de sensibilidad del antibiótico y discos en blanco (57),
Discos de trimetoprima-sulfametoxazol (58).

Extracto acuoso – *Escherichia coli* ATCC 8739



Gráficos 59 a 61: Resultados de antibiograma del extracto acuoso en *Escherichia coli* ATCC 8739

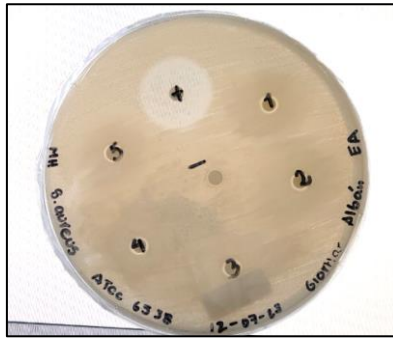
Extracto etanólico - *Escherichia coli* ATCC 8739



Gráficos 62 a 64: Resultados de antibiograma del extracto etanólico en Escherichia coli ATCC 8739

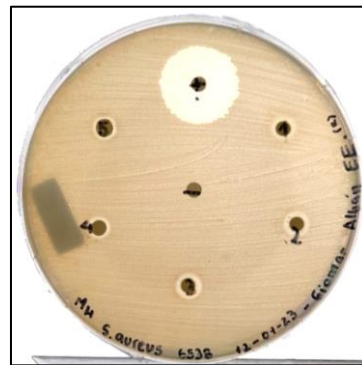
Extracto acuoso - *Staphylococcus aureus* ATCC 6538





Gráficos 65 a 67: Resultados de antibiograma del extracto acuoso en Staphylococcus aureus ATCC 6538

Extracto etanólico – Staphylococcus aureus ATCC 6538



Gráficos 68 a 70: Resultados de antibiograma del extracto etanólico en *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

ANEXO Ñ. Análisis estadístico realizado en el programa IBM SPSS Statistics.

Estadísticos descriptivos					
	Rango Estadístico	Mínimo Estadístico	Máximo Estadístico	Media	
				Estadístico	Error estándar
EXTRACTO_ACUOSO_8739	2,79	34,71	37,50	36,3940	,52066
EXTRACTO_ETANÓLICO_6538	4,43	28,90	33,33	31,1120	,78419
EXTRACTO_ACUOSO_6538	3,34	24,43	27,77	26,2220	,56719
EXTRACTO_ETANÓLICO_8739	30,54	,00	30,54	12,2160	7,48074

Estadísticos descriptivos		
	Desv. estándar Estadístico	Varianza Estadístico
EXTRACTO_ACUOSO_8739	1,16423	1,355
EXTRACTO_ETANÓLICO_6538	1,75350	3,075
EXTRACTO_ACUOSO_6538	1,26827	1,609
EXTRACTO_ETANÓLICO_8739	16,72745	279,807

Gráfico 71: Estadísticos descriptivos de los cuatro extractos analizados.

Pruebas de normalidad			
	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
EXTRACTO_ACUOSO_6538	,960	5	,808
EXTRACTO_ETANÓLICO_6538	,986	5	,964
EXTRACTO_ACUOSO_8739	,881	5	,312
EXTRACTO_ETANÓLICO_8739	,684	5	,006

Gráfico 72: Prueba de normalidad Shapiro Wilk al ser una población de $n < 30$, con valores mayores a 0,05 en normalidad por lo que se considera una distribución normal – Pruebas paramétricas.

Prueba T

Prueba para una muestra

	t	gl	P de un factor	P de dos factores	Diferencia de medias
EFFECTO_INHIBITORIO	9,828	19	<,001	<,001	26,48600

Valor de prueba = 0

Significación

P de un factor

P de dos factores

Diferencia de medias

Gráfico 73: Prueba paramétrica T de una muestra con un valor de $P < 0,01$, rechazando la hipótesis nula y aceptando la hipótesis alternativa.

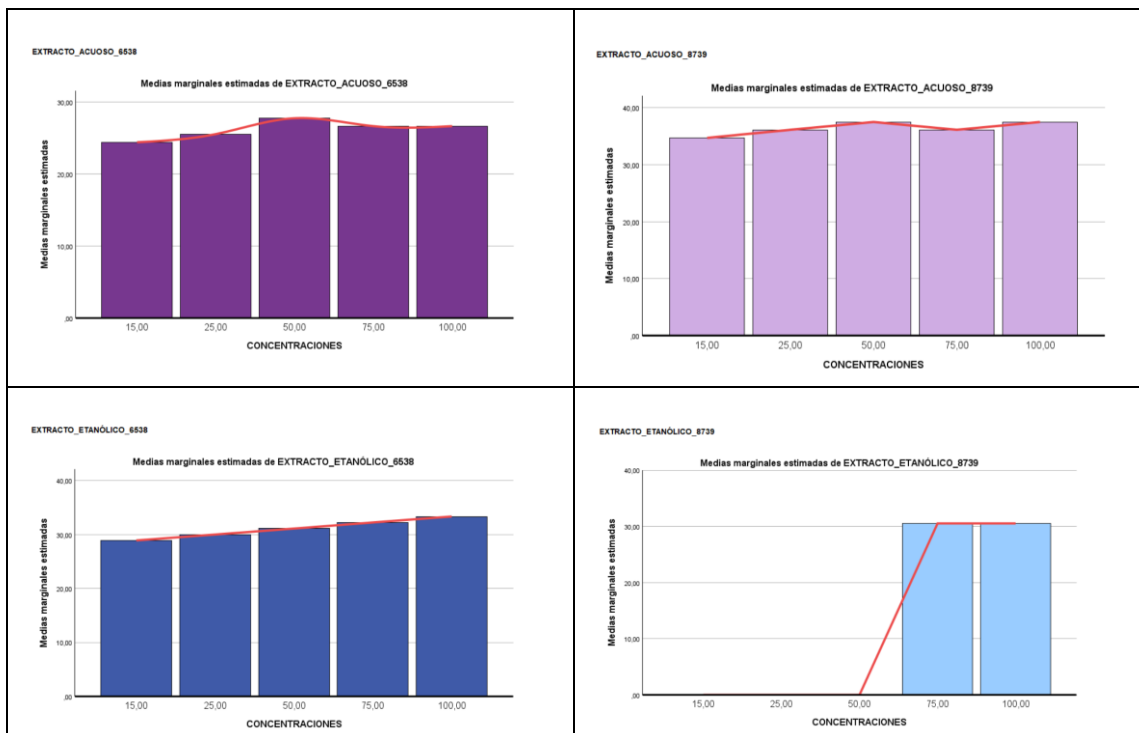


Gráfico 74: Gráficos de barras de los resultados de porcentaje de efecto inhibitorio en los cuatro extractos analizados.

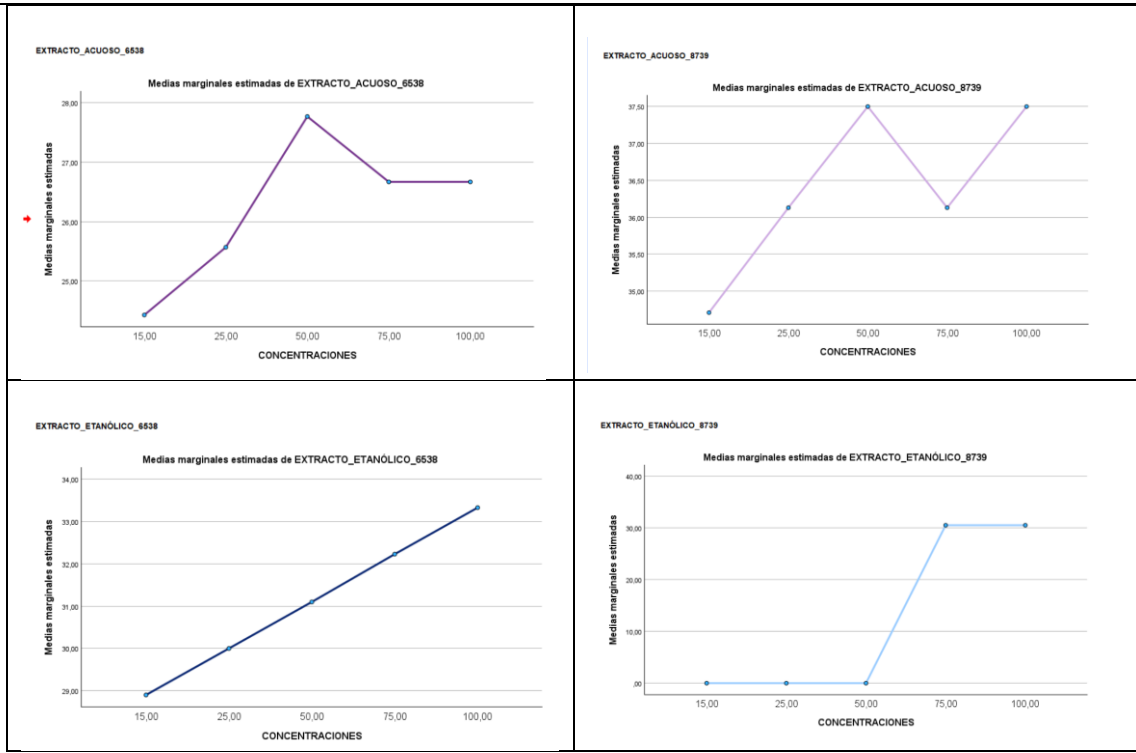


Gráfico 75: Gráficos lineales de los resultados de porcentaje de efecto inhibitorio en los cuatro extractos analizados.

ANEXO O. Análisis estadístico general realizado en el programa Statgraphics 19 – X64

ANOVA SIMPLE

Resumen estadístico:

<i>EXTRACTOS</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>	<i>Varianza</i>
ACUOSO_6538	26,222	1,26827	18,5703	33,8737	1,60852
ACUOSO_8739	36,394	1,16423	28,7423	44,0457	1,35543
ETANOLICO_6538	31,112	1,7535	23,4603	38,7637	3,07477
ETANOLICO_8739	12,216	16,7274	4,56433	19,8677	279,807
Total	26,486	12,0519	-		145,249

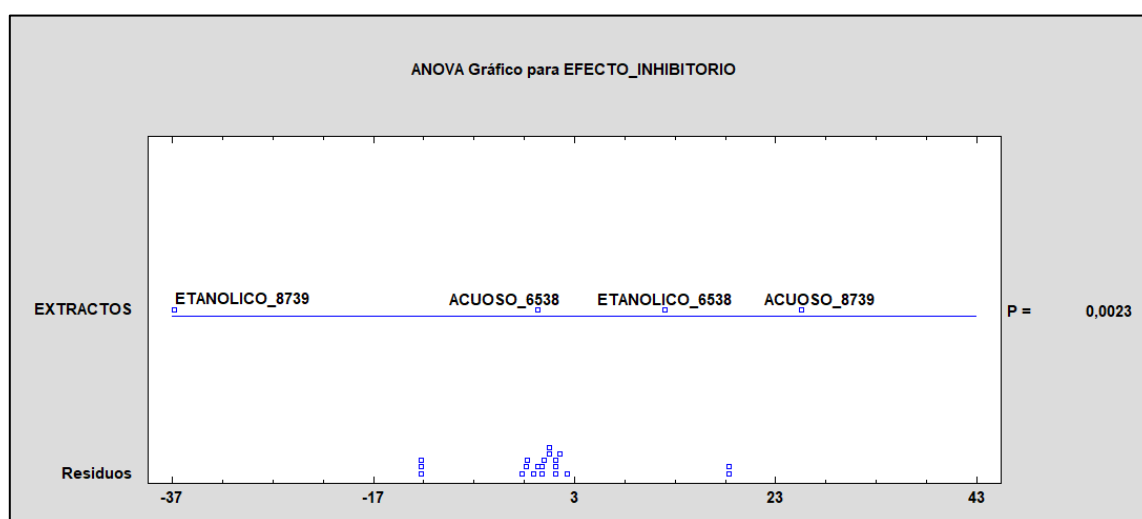
<i>EXTRACTOS</i>	<i>Error Estándar</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>
ACUOSO_6538	0,56719	24,43	27,77	3,34
ACUOSO_8739	0,520659	34,71	37,5	2,79
ETANOLICO_6538	0,78419	28,9	33,33	4,43
ETANOLICO_8739	7,48074	0	30,54	30,54
Total	2,6949	0	37,5	37,5

<i>EXTRACTOS</i>	<i>Cuartil Inferior</i>	<i>Cuartil Superior</i>	<i>Rango Intercuartílico</i>
------------------	-------------------------	-------------------------	------------------------------

ACUOSO_6538	25,57	26,67	1,1
ACUOSO_8739	36,13	37,5	1,37
ETANOLICO_6538	30,0	32,23	2,23
ETANOLICO_8739	0	30,54	30,54
Total	26,12	34,02	7,9

Tabla ANOVA para EFECTO_INHIBITORIO por EXTRACTOS

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-F</i>
Entre grupos	1616,35	3	538,785	7,54	0,0023
Intra grupos	1143,38	16	71,4615		
Total (Corr.)	2759,74	19			



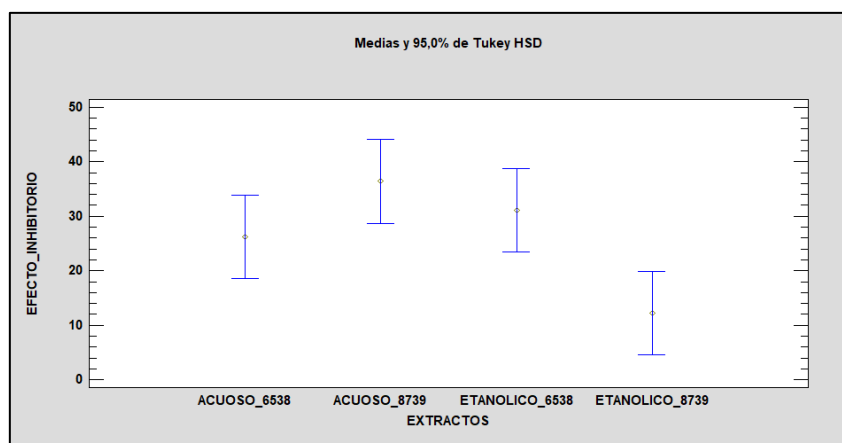
Pruebas de Múltiple Rangos para EFECTO_INHIBITORIO por EXTRACTOS

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>EXTRACTOS</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
ETANOLICO_8739	5	12,216	X
ACUOSO_6538	5	26,222	XX
ETANOLICO_6538	5	31,112	X
ACUOSO_8739	5	36,394	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
ACUOSO_6538 - ACUOSO_8739		-10,172	15,3033
ACUOSO_6538 - ETANOLICO_6538		-4,89	15,3033
ACUOSO_6538 - ETANOLICO_8739		14,006	15,3033
ACUOSO_8739 - ETANOLICO_6538		5,282	15,3033
ACUOSO_8739 - ETANOLICO_8739	*	24,178	15,3033
ETANOLICO_6538 - ETANOLICO_8739	*	18,896	15,3033

* indica una diferencia significativa.



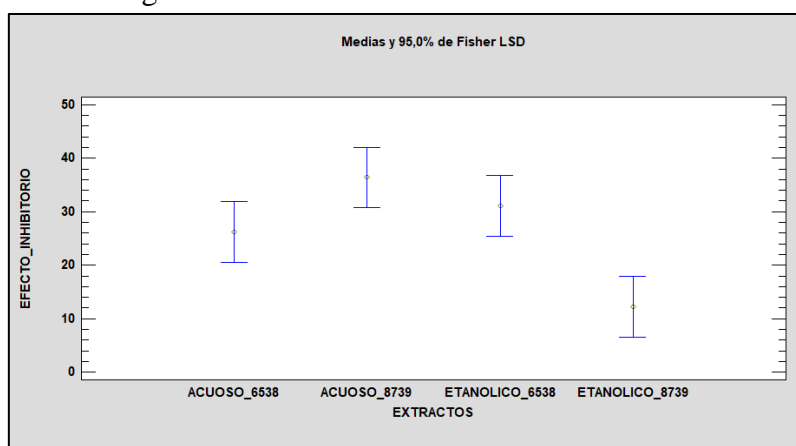
Pruebas de Múltiple Rangos para EFECTO_INHIBITORIO por EXTRACTOS

Método: 95,0 porcentaje LSD

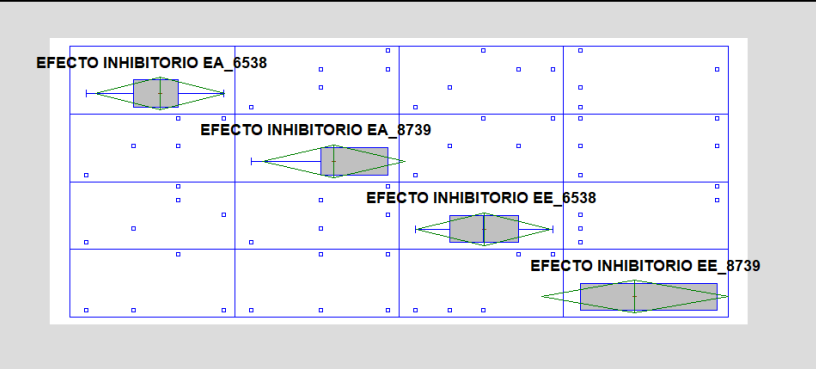
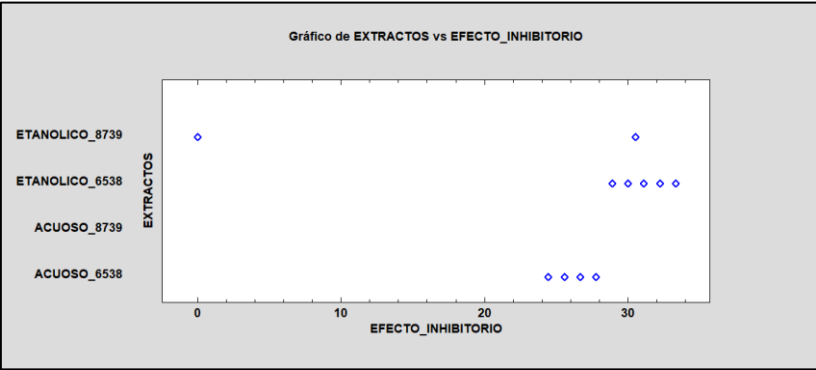
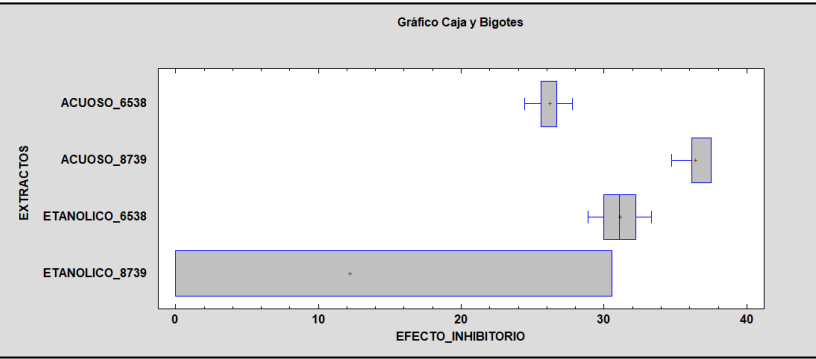
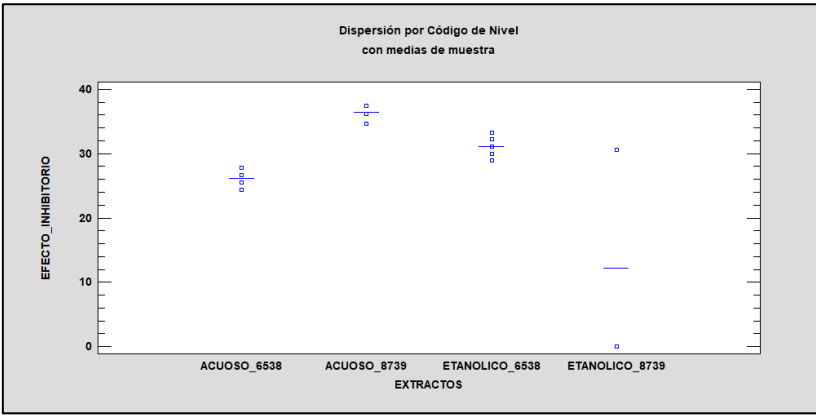
<i>EXTRACTOS</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
ETANOLICO_8739	5	12,216	X
ACUOSO_6538	5	26,222	X
ETANOLICO_6538	5	31,112	X
ACUOSO_8739	5	36,394	X

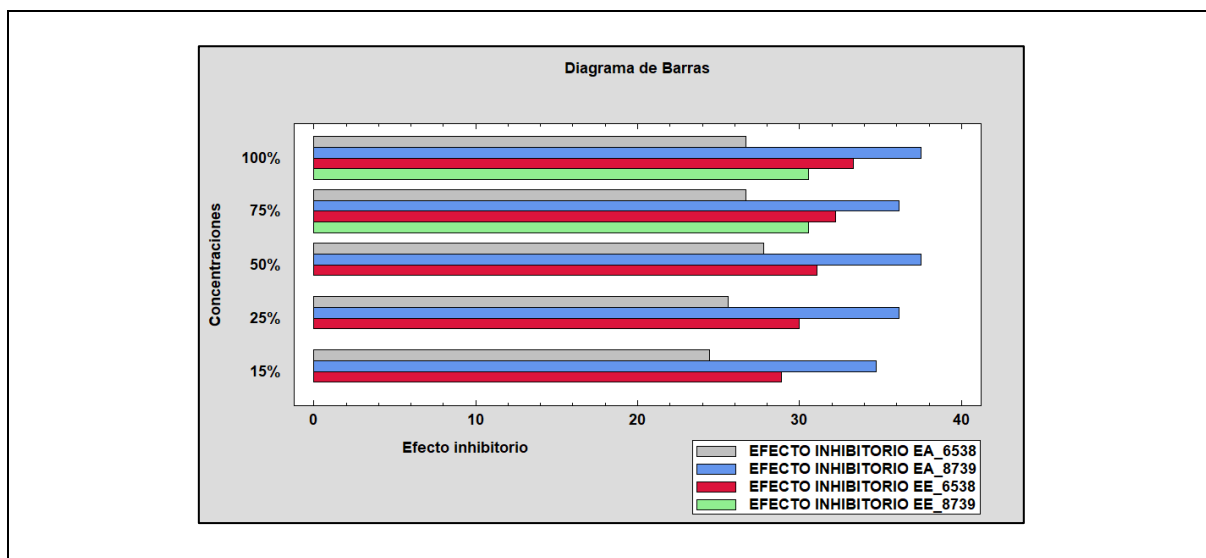
<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
ACUOSO_6538 - ACUOSO_8739		-10,172	11,334
ACUOSO_6538 - ETANOLICO_6538		-4,89	11,334
ACUOSO_6538 - ETANOLICO_8739	*	14,006	11,334
ACUOSO_8739 - ETANOLICO_6538		5,282	11,334
ACUOSO_8739 - ETANOLICO_8739	*	24,178	11,334
ETANOLICO_6538 - ETANOLICO_8739	*	18,896	11,334

* indica una diferencia significativa.



Gráficos estadísticos:





ANEXO P. *Análisis estadístico del efecto inhibitorio del extracto acuoso en el microorganismo E. coli ATCC 8739 realizado en el programa Statgraphics 19*

Datos/Variable: EFECTO INHIBITORIO EA_8739

5 valores con rango desde 34,71 a 37,5

Prueba de Hipótesis para EFECTO INHIBITORIO EA_8739

Media Muestral = 36,394

Mediana Muestral = 36,13

Desviación Estándar de la Muestra = 1,16423

Prueba t

Hipótesis Nula: media = 0

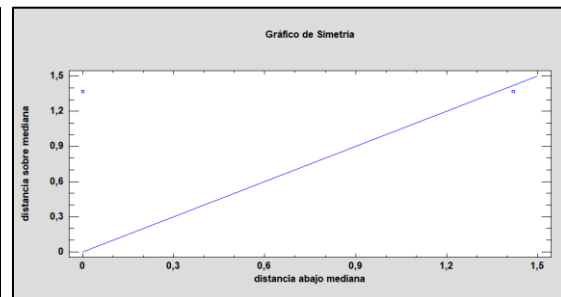
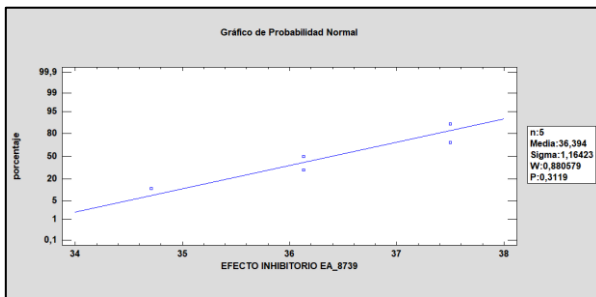
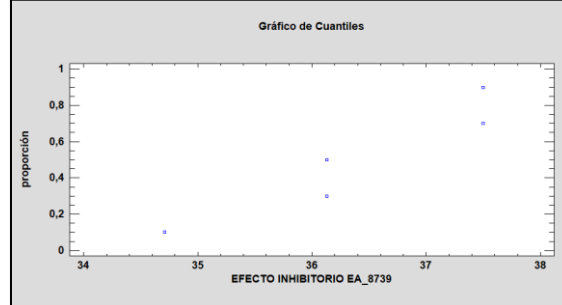
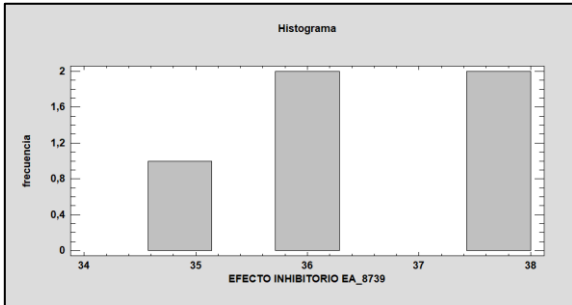
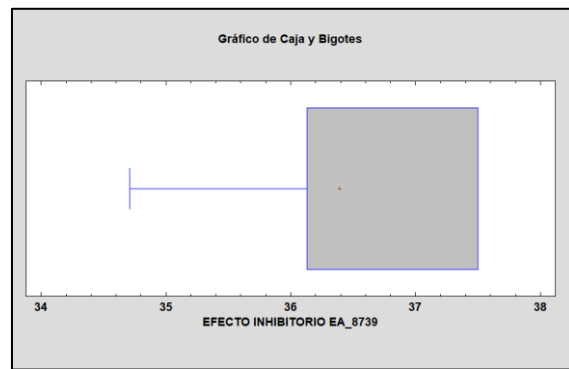
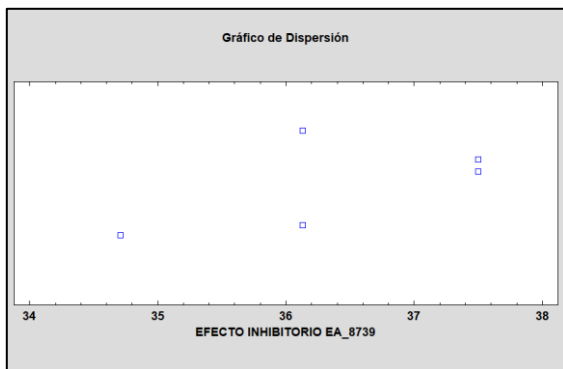
Alternativa: no igual

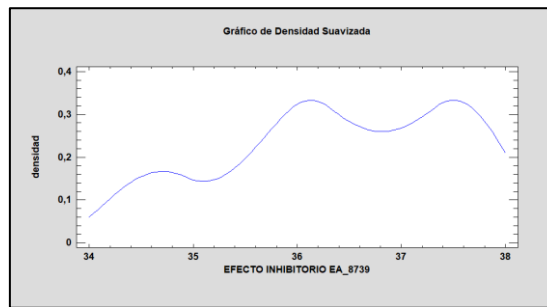
Estadístico t = 69,8999

Valor-P = 2,50986E-7

Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05.

Gráficos estadísticos:





ANEXO Q. *Análisis estadístico del efecto inhibitorio del extracto etanólico en el microorganismo E. coli ATCC 8739 realizado en el programa Statgraphics 19*

Datos/Variable: EFECTO INHIBITORIO EE_8739

5 valores con rango desde 0 a 30,54

Prueba de Hipótesis para EFECTO INHIBITORIO EE_8739

Media Muestral = 12,216

Mediana Muestral = 0

Desviación Estándar de la Muestra = 16,7274

Prueba t

Hipótesis Nula: media = 0

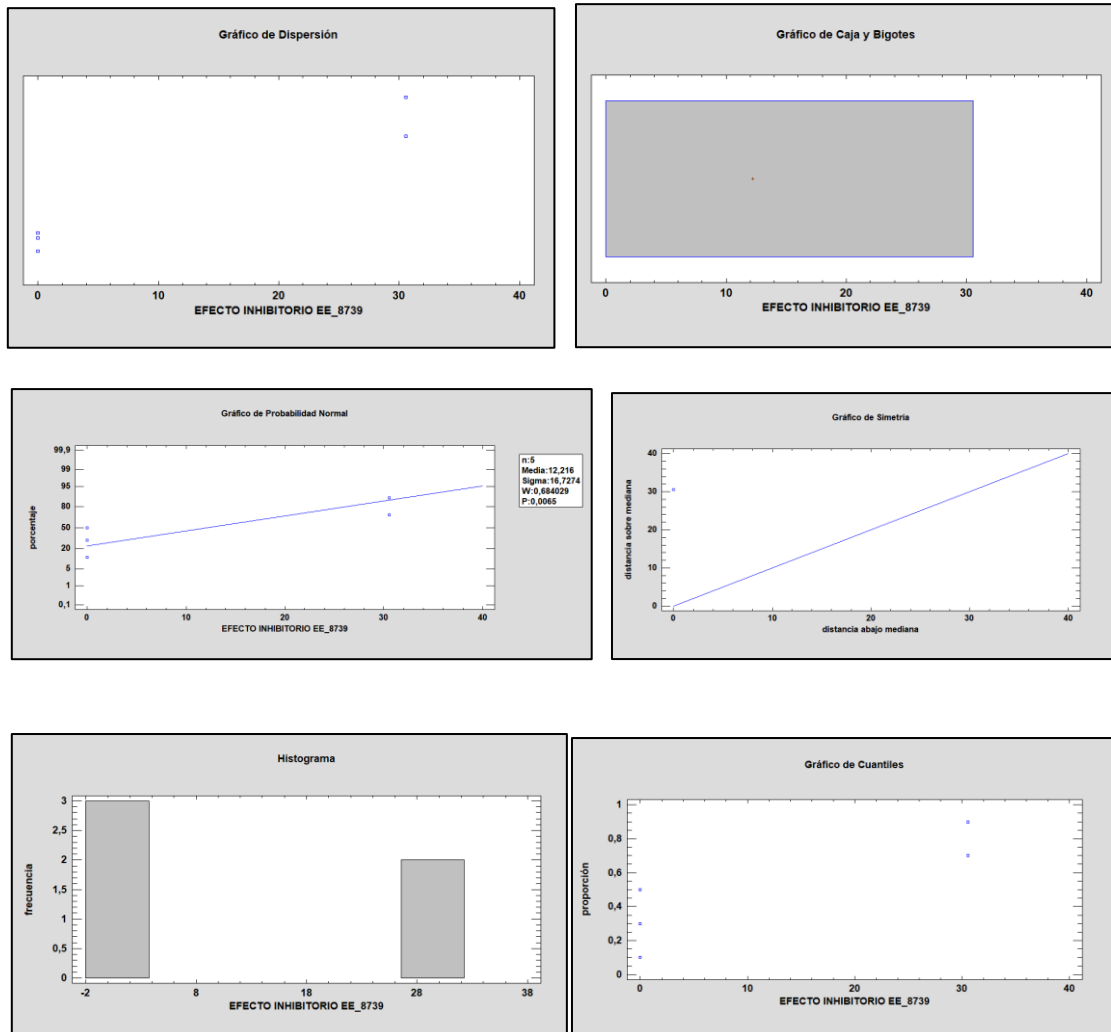
Alternativa: no igual

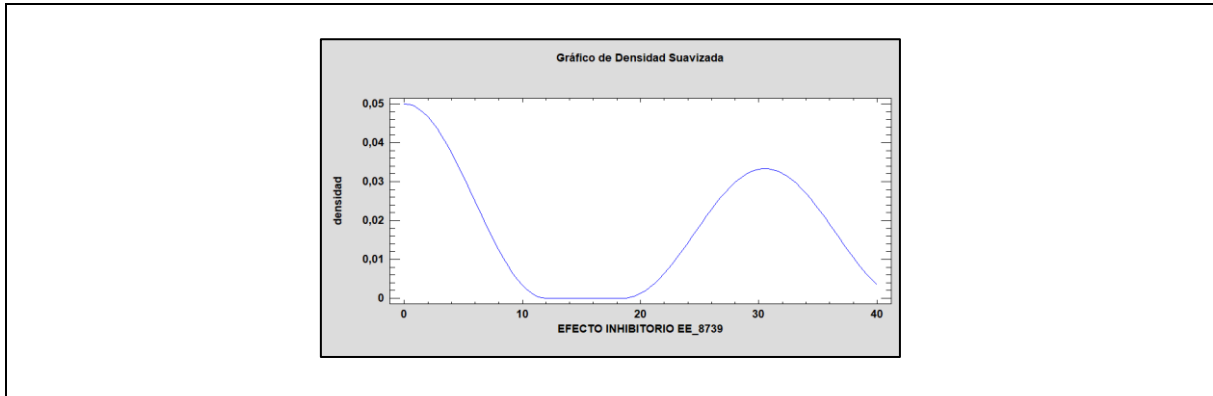
Estadístico t = 1,63299

Valor-P = 0,177808

No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05.

Gráficos estadísticos:





ANEXO R. *Análisis estadístico del efecto inhibitorio del extracto acuoso en el microorganismo S. aureus ATCC 6538 realizado en el programa Statgraphics 19 – X64*

Datos/Variable: EFECTO INHIBITORIO EA_6538

5 valores con rango desde 24,43 a 27,77

Prueba de Hipótesis para EFECTO INHIBITORIO EA_6538

Media Muestral = 26,222

Mediana Muestral = 26,67

Desviación Estándar de la Muestra = 1,26827

Prueba t

Hipótesis Nula: media = 0

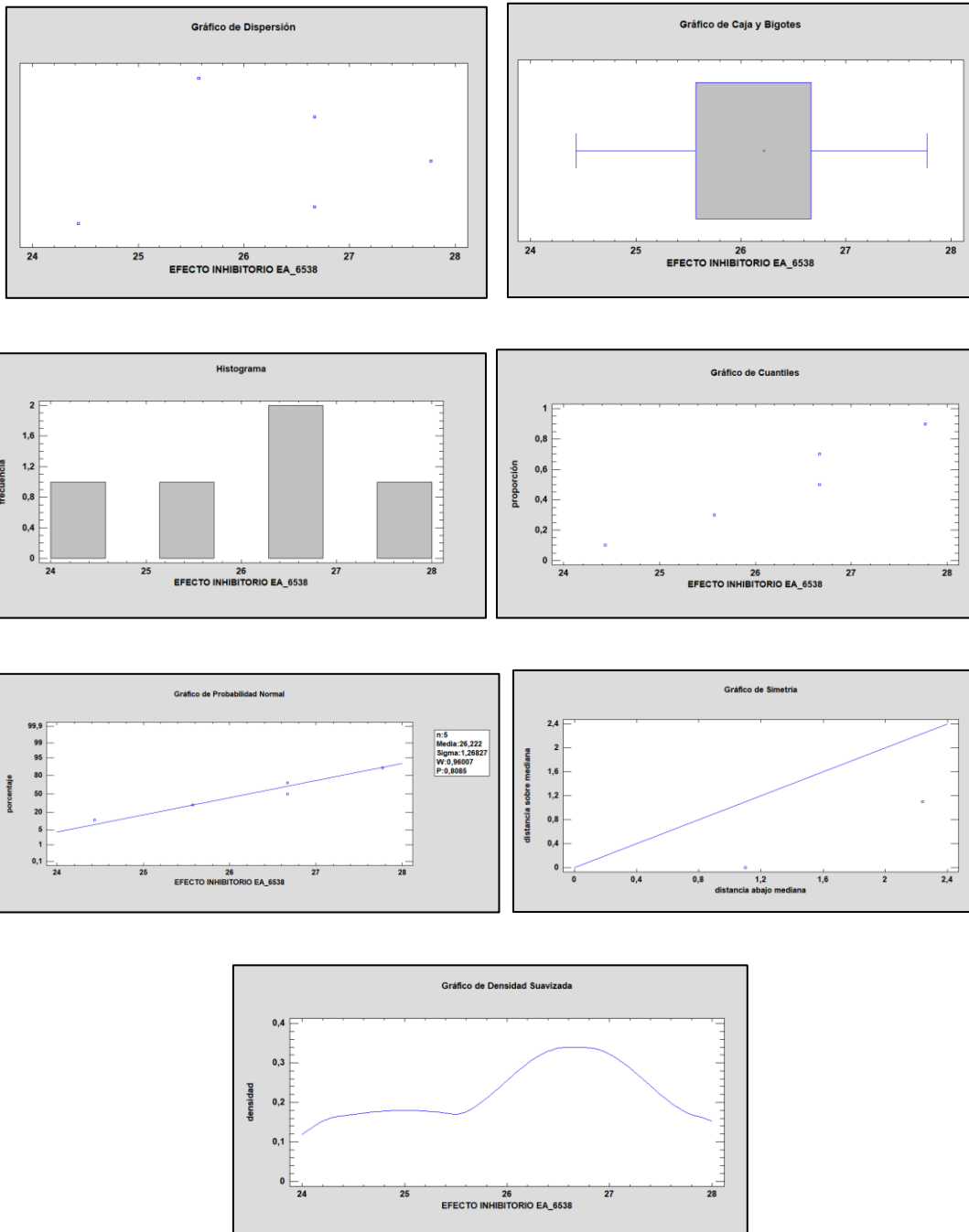
Alternativa: no igual

Estadístico t = 46,2315

Valor-P = 0,00000130931

Se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0,05$.

Gráficos estadísticos:



ANEXO S. *Análisis estadístico del efecto inhibitorio del extracto etanólico en el microorganismo S. aureus ATCC 6538 realizado en el programa Statgraphics 19.*

Datos/Variable: EFECTO INHIBITORIO EE_6538

5 valores con rango desde 28,9 a 33,33

Prueba de Hipótesis para EFECTO INHIBITORIO EE_6538

Media Muestral = 31,112

Mediana Muestral = 31,1

Desviación Estándar de la Muestra = 1,7535

Prueba t

Hipótesis Nula: media = 0

Alternativa: no igual

Estadístico t = 39,6741

Valor-P = 0,00000241147

Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05.

Gráficos estadísticos:

