



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

CARRERA DE AGROINDUSTRIA

**INFORME DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PREVIO A
LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

MECANISMO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TEMA:

**DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN BIOLÓGICA Y TOXICIDAD
DEL EXTRACTO DE TRES PLANTAS SILVESTRES (*Petiveria*
Alliacea, *Plectranthuns Amboinicus* y *Plantago Major*)**

AUTORES:

**DEMERA LUCAS WASHINGTON FERNANDO
INTRIAGO ALCÍVAR MARÍA FERNANDA**

TUTOR:

ING. SACÓN VERA ELY FERNANDO, PhD.

CALCETA, JULIO DE 2023

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

DEMERA LUCAS WASHINGTON FERNANDO, con cédula de ciudadanía 1310710429 e **INTRIAGO ALCÍVAR MARÍA FERNANDA**, con cédula de ciudadanía 1315818128, declaramos bajo juramento que el trabajo de integración curricular titulado: **DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN BIOLÓGICA Y TOXICIDAD DEL EXTRACTO DE TRES PLANTAS SILVESTRES (*Petiveria Alliacea*, *Plectranthuns Amboinicus* y *Plantago Major*)** es de nuestra autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración concedemos a favor de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos, conservando a mi favor todos los derechos patrimoniales de los autores sobre la obra, en conformidad con el Artículo 114 del Código Orgánico de la Economía social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación.



WASHINGTON F. DEMERA LUCAS
CC: 131071042-9



MARÍA F. INTRIAGO ALCÍVAR
CC: 131581812-8

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

DEMERA LUCAS WASHINGTON FERNANDO, con cédula de ciudadanía 1310710429 e **INTRIAGO ALCÍVAR MARÍA FERNANDA**, con cédula de ciudadanía, 1315818128, autorizamos a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, la publicación en la biblioteca de la institución del Trabajo de Integración Curricular titulado: **DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN BIOLÓGICA Y TOXICIDAD DEL EXTRACTO DE TRES PLANTAS SILVESTRES (*Petiveria Alliacea*, *Plectranthuns Amboinicus* y *Plantago Major*)**, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra exclusividad y total autoría.



WASHINGTON F. DEMERA LUCAS
CC: 131071042-9



MARÍA F. INTRIAGO ALCÍVAR
CC: 131581812-8

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

ELY FERNANDO SACÓN VERA, certifica haber tutelado el Trabajo de Integración Curricular titulado: **DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN BIOLÓGICA Y TOXICIDAD DEL EXTRACTO DE TRES PLANTAS SILVESTRES (*Petiveria Alliacea, Plectranthuns Amboinicus y Plantago Major*)**, que ha sido desarrollado por **DEMERA LUCAS WASHINGTON FERNANDO E INTRIAGO ALCÍVAR MARÍA FERNANDA**, previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial, de acuerdo al **REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR DE CARRERAS DE GRADO** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

ING. ELY FERNANDO SACÓN VERA, PhD.
CC: 130911763-6
TUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del Tribunal correspondiente, declaramos que han APROBADO el trabajo de Integración Curricular Titulado: **DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN BIOLÓGICA Y TOXICIDAD DEL EXTRACTO DE TRES PLANTAS SILVESTRES (*Petiveria Alliacea*, *Plectranthuns Amboinicus* y *Plantago Major*)**, que ha sido desarrollado por **DEMERA LUCAS WASHINGTON FERNANDO E INTRIAGO ALCÍVAR MARÍA FERNANDA**, previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial, de acuerdo al **REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR DE CARRERAS DE GRADO** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López

Mgtr. DENNYS L. ZAMBRANO VELÁSQUEZ
CC: 131034276-9
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Mgtr. RAMÓN T. RIVADENEIRA GARCÍA
CC: 130743395-1
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Mgtr. JOSÉ F. ZAMBRANO RUEDAS
CC:131082846-0
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que nos dio la oportunidad de una educación superior de calidad y en la cual hemos forjado nuestros conocimientos profesionales día a día.

A Dios quien me ha llevado por los mejores caminos para el cumplimiento de mis metas, a pesar de los obstáculos siempre me enseñaba la solución de los problemas.

A mis padres Washington Demera y Flor Lucas, y a toda mi familia quienes han sido mi pilar fundamental para seguir adelante gracias a todo su apoyo. Me han inculcado valores y consejos que me han servido para superar cada obstáculo presentado en la vida, de igual forma por el apoyo económico que nunca me negaron para poder culminar mis estudios.

A María Intriago quien es mi compañera de tesis, a compañeros y amigos que en el transcurso de mi vida universitaria siempre me han brindado su apoyo y confianza para la culminación de mi carrera.

A mi tutor quien ha estado presente en el desarrollo del trabajo de titulación, así mismo al tribunal que nos ha brindado la asesoría necesaria para la culminación del trabajo y finalmente a todos los docentes que me impartieron los conocimientos y consejos en el transcurso de mi carrera universitaria.

WASHINGTON F. DEMERA LUCAS

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Manabí Manuel Félix López que me dio la oportunidad de crecer profesionalmente brindando una educación superior de calidad.

A Dios por darme las fuerzas necesarias para salir adelante día a día y poder cumplir cada una de mis metas propuestas.

A mi mamá, María Alcívar por darme su amor y apoyo cada día, a mis hermanas, Gaby, Yasmin y Mercedes que de una u otra manera estuvieron para mí cuando más necesité, gracias por cada palabra de motivación, las amo.

A mi amado esposo y mis hijos, por estar siempre conmigo, por brindarme su amor y apoyo incondicional y por ser el pilar fundamental para la culminación de mi carrera universitaria, gracias por tanto amor.

Finalmente agradezco a cada uno de los docentes de la Carrera de Agroindustria por el conocimiento brindado, a mi compañero de tesis Washington Demera por tenerme paciencia, a mi grupo de amigos y compañeros por brindarme su amistad y por los momentos vividos que pasamos juntos

MARÍA F. INTRIAGO ALCÍVAR

DEDICATORIA

A Dios, quien es el que nos permite vivir y así poder cumplir todos nuestros proyectos de vida, a toda mi familia que ha participado tanto económica como moralmente en el cumplimiento de cada una de mis metas que me he propuesto.

A mis padres y familiares que siempre me han brindado su apoyo para seguir formándome como una persona de bien. Gracias a sus consejos y ánimos me encuentro aquí.

A mis amigos, compañeros, docentes y demás personas que han estado presente en mi vida con su ayuda y buenas palabras de motivación para poder continuar siempre que se presentaba un obstáculo.

WASHINGTON F. DEMERA LUCAS

DEDICATORIA

A toda mi familia por el apoyo brindado para poder salir adelante día a día, especialmente a mi esposo quien me impulsó a seguir con mis estudios y me ayudó a lo largo de mi carrera universitaria.

A mi persona, por luchar día a día para seguir adelante con cada meta propuesta.

MARÍA F. INTRIAGO ALCÍVAR

CONTENIDO GENERAL

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN	iii
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL.....	v
AGRADECIMIENTO	vi
AGRADECIMIENTO	vii
DEDICATORIA	viii
DEDICATORIA	ix
CONTENIDO GENERAL.....	x
CONTENIDO DE TABLAS.....	xii
CONTENIDO DE FIGURAS	xiii
CONTENIDO DE GRÁFICOS	xiii
CONTENIDO DE FÓRMULAS	xiii
RESUMEN.....	xiv
PALABRAS CLAVES:.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	3
1.3. OBJETIVOS	5
1.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	5
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
1.4. HIPÓTESIS.....	5
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	6

2.1. PLANTAS SILVESTRES	6
2.1.1. ZORRILLA	6
2.1.2. ORÉGANO	7
2.1.3. LLANTÉN	8
2.2. PRINCIPIOS ACTIVOS	8
2.2.1. TAMIZAJE FITOQUÍMICO	9
ALCALOIDES	9
TANINOS	9
2.3. FUNCIÓN BIOLÓGICA	10
2.3.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	10
2.3.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	11
2.4. TOXICIDAD	12
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO	13
3.1. UBICACIÓN	13
3.2. DURACIÓN	13
3.3. MÉTODOS	13
3.4. TÉCNICAS	14
3.5. FACTORES EN ESTUDIO	17
3.6. TRATAMIENTOS	17
3.7. MANEJO DEL EXPERIMENTO	18
3.8. UNIDAD EXPERIMENTAL	22
3.9. VARIABLES A MEDIR	22
3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1. TAMIZAJE FITOQUÍMICO	24
4.2. RESPUESTA IN VITRO PARA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.	25
4.2.1. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	25

4.2.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	28
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA SOBRE STAPHYLOCOCCUS AUREUS.....	29
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA SOBRE ESCHERICHIA COLI.	32
4.3. TOXICIDAD.....	34
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	39
5.1. CONCLUSIONES.....	39
5.2. RECOMENDACIONES	39
BIBLIOGRAFÍA.....	40
ANEXOS.....	49

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1. Detalle de los tratamientos.....	17
Tabla 2. Esquema del ADEVA bifactorial AxB	18
Tabla 3: Unidad experimental	22
Tabla 4. Presencia o ausencia de metabolitos secundarios	24
Tabla 5. Supuesto de normalidad para la variable de capacidad antioxidante.....	25
Tabla 6. Contenido promedio de la capacidad antioxidante (DPPH) de los extractos de llantén, orégano orejón y zorrilla	26
Tabla 7. Prueba de Kruskal-Wallis para los tres tipos de extractos	26
Tabla 8. Actividad antimicrobiana de los extractos de llantén, orégano orejón y zorrilla en cepas de <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	28
Tabla 9. Adeva para inhibición de la cepa bacteriana <i>Staphylococcus Aureus</i> frente a los tres tipos de extractos y dos porcentajes de concentración	30
Tabla 10. Medias por Mínimos Cuadrados para <i>Staphylococcus Aureus</i> con intervalos de confianza del 95,0%.....	30
Tabla 11. Tukey para inhibición de la cepa bacteriana <i>Staphylococcus Aureus</i> frente a los tres tipos de extractos y dos porcentajes de aplicación.....	31
Tabla 12. ADEVA para inhibición de la cepa bacteriana <i>Escherichia coli</i> frente a los tres tipos de extractos y dos porcentajes de aplicación.....	32

Tabla 13. Medias por Mínimos Cuadrados para <i>Escherichia coli</i> con intervalos de confianza del 95,0%	33
Tabla 14. Tukey para inhibición de la cepa bacteriana <i>Escherichia coli</i> frente a los tres tipos de extractos	33
Tabla 15. Tukey para inhibición de la cepa bacteriana <i>Escherichia coli</i> frente a los % de concentración de los tres tipos de extractos	34
Tabla 16. Adeva para actividad de los extractos de plantas silvestres sobre la letalidad de <i>E. Coli</i> .	35
Tabla 17. Medias por Mínimos Cuadrados para DL50 con intervalos de confianza del 95,0%	35
Tabla 18. Pruebas de Tukey para DL50 por EXTRACTOS	36
Tabla 19. Pruebas de Tukey para DL50 por dosis	36

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de proceso en la obtención de extractos	21
---	----

CONTENIDO DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Diagrama de cajas y bigotes para la capacidad antioxidante de los extractos de llantén, orégano orejón y zorrilla	27
Gráfico 2. Valores de inhibición para <i>S.aureus</i> expresados de forma comparativa por cada tipo de extracto evaluado	32
Gráfico 3. Valores de inhibición para <i>E. coli</i> expresados de forma comparativa por cada tipo de extracto evaluado	34
Gráfico 4. Inhibición del 50% de los extractos de llantén, orégano orejón y zorrilla.	37

CONTENIDO DE FÓRMULAS

Fórmula 1. Determinación de actividad antioxidante	15
Fórmula 2. Determinación de toxicidad	17

RESUMEN

El objetivo principal de la presente investigación fue determinar la función biológica y la toxicidad del extracto de tres plantas silvestres (*Petiveria alliacea*, *Plectranthus amboinicus* y *Plantago major*) y comprobar la presencia de compuestos bioactivos que son usados en la elaboración de alimentos funcionales. Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA) en arreglo bifactorial AxB, se estudiaron seis tratamientos con cuatro réplicas cada uno. En la determinación de alcaloides se empleó la prueba de Dragendorff y en el caso de los taninos el método de cloruro férrico, además, se utilizó la metodología del DPPH en la actividad antioxidante a concentraciones de 200 ppm en los extractos de *Plectranthus amboinicus* y *Plantago major*, y 400 ppm para *Petiveria alliacea*. Se obtuvo ausencia de alcaloides (-) en los tres extractos, mientras que, el extracto de *Plectranthus amboinicus* presentó el mayor contenido de taninos (+++) seguido del extracto de *Plantago major* (++) y ausencia del extracto de *Petiveria alliacea* (-). En lo que respecta a la actividad antioxidante, presentó una media de 114.845 μmol Equivalente a Trolox /g de muestra seca para el *Plectranthus amboinicus*, 23.249 en *Plantago major*, y 14.936 en *Petiveria alliacea*. El extracto que evidenció las mejores cualidades fue el *Plectranthus amboinicus* tanto en porcentaje de taninos y actividad antioxidante. Todos los extractos presentaron un valor de toxicidad bajo, debido a que requieren altas concentraciones para tener una inhibición del 50%.

PALABRAS CLAVE:

Extractos, compuestos bioactivos, tamizaje fitoquímico, función biológica, toxicidad.

ABSTRACT

The main objective of this research was to determine the biological function and toxicity of the extract of three wild plants (*Petiveria alliacea*, *Plectranthus amboinicus* and *Plantago major*) and to verify the presence of bioactive compounds that are used in the elaboration of functional foods. A completely randomized design (DCA) was applied in a bifactorial arrangement AxB, six treatments with four replicates each were studied. In the determination of alkaloids, the Dragendorff test was used and in the case of tannins, the ferric chloride test, in addition, the DPPH methodology was used in the antioxidant activity at concentrations of 200 ppm in the extracts of *Plectranthus amboinicus* and *Plantago major*, and 400 ppm for *Petiveria alliacea*. The absence of alkaloids (-) was obtained in the three extracts, while the *Plectranthus amboinicus* extract had the highest tannin content (+++) followed by the *Plantago major* extract (++) and the absence of the *Petiveria alliacea* extract (-). Regarding antioxidant activity, it presented an average of 114,845 μmol Equivalent to Trolox /g of dry sample for *Plectranthus amboinicus*, 23,249 in *Plantago major*, and 14,936 in *Petiveria alliacea*. The extract that showed the best qualities was *Plectranthus amboinicus* both in percentage of tannins and antioxidant activity. All the extracts presented a low toxicity value, because they require high concentrations to have a 50% inhibition.

KEYWORD

Extracts, bioactive compounds, phytochemical screening, biological function, toxicity.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Desde la antigüedad, el uso de las plantas silvestres ha sido de gran relevancia para la población humana, puesto que se las ha empleado para diferentes fines, particularmente en la alimentación y medicina (Cordero et al., 2017). Gasaly et al. (2020) mencionan que los antepasados cazadores-recolectores del paleolítico consumían entre 200 a 400 especies diferentes de plantas con elevado aporte de fibras, mientras que, hoy en día se consume una cantidad menor de vegetales que oscilan entre 20 a 40 especies distintas.

Myers et al (2000) citado por Oleas et al. (2021) consideran al Ecuador como uno de los países megadiversos del mundo, debido a sus climas y a la gran riqueza natural de flora y fauna que posee. Indacochea et al. (2018) indica que en el país existe una gran variedad de plantas, las cuales se pueden utilizar para fines terapéuticos, aromáticos y medicinales debido a sus bondades curativas y alimenticias. El empleo de las plantas está regulado por el conocimiento tradicional, hábitos, costumbres y formas de vida propias de cada región del país; los cuales responden a la estrecha relación complementaria hombre-naturaleza.

García (2015) citado por Vera y Zambrano (2019) mencionan que en la provincia de Manabí se encuentran lugares con una belleza natural; especialmente en las zonas rurales de la provincia, los cuales son hábitat de una diversidad de flora y fauna, siendo de gran interés para productores debido a que son lugares turísticos y de producción, y para los investigadores para realizar sus estudios. Gallegos-Zurita. (2016) citado por Jiménez et al. (2021) señalan que para las comunidades rurales la primera opción para tratar enfermedades es el uso de plantas medicinales, siendo una tradición que ha venido adoptado por todas las generaciones que han pasado. Sin embargo, actualmente el uso de las plantas silvestres es limitado a causa del desconocimiento, de todas las especies vegetales presentes en el planeta, solo un 10% ha sido estudiada científicamente con fines medicinales o terapéuticos, quedando un aproximado de 15000 plantas

medicinales en peligro de extinción (Organización Panamericana de la Salud [OPS], 2019)

Las plantas silvestres están constituidas por un sinnúmero de compuestos que puede ser beneficioso su uso, tal es el caso de los compuestos fitoquímicos o bioactivos que para el punto de vista de Gasaly et al. (2020), contienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antibacterianas, antihipertensivas, antitumorales, etc; existen miles de fitoquímicos diversos en la naturaleza, aún por estudiarse la mayoría. Del mismo modo Morales et al. (2015) se refieren a los compuestos fitoquímicos como beneficiosos para la salud humana por su contenido de vitaminas C, E, K, vitaminas del grupo B, el ácido fólico; minerales, como el hierro, zinc, calcio, selenio; carotenoides, compuestos fenólicos (flavonoides, cinamatos y taninos), glucosinolatos y fitoesteroles.

A pesar de los beneficios que tienen las plantas en estudio, no se debe descuidar el grado de toxicidad que estas podrían tener, es por ello que Martín (2017) recomienda que se debe identificar el riesgo que ocasiona el uso de los extractos de estas plantas, así mismo, establecer los límites de seguridad. Por otro lado, Echeverría (2020) acota que se han realizado estudios toxicológicos en donde se ha determinado que los compuestos sintéticos usados en la industria alimentaria tienen la posibilidad de presentar efectos tóxicos y pueden ser los promotores de algunos tipos de cáncer.

De acuerdo con el punto de vista de Ruiz y Moreira (2017) en Ecuador existen muy pocas investigaciones publicadas sobre estudios fitoquímicos, dando como resultado el desconocimiento de los principios activos de las plantas y sus efectos biológicos y toxicológicos para el hombre. De igual forma Tumino et al. (2002), citado por Morales (2011), menciona que existen diversos estudios donde se han evaluado la composición nutritiva de especies silvestres. Sin embargo, los autores han demostrado que existen carencias en los conocimientos científicos de muchas especies silvestres, debido a que en muchos casos el número de muestras es limitado y en otros casos los resultados son parciales (Barros et al., 2009, citado por Morales, 2011).

Mellado (2017) señala que la información en cuanto a la actividad biológica y toxicológica sobre el factor de seguridad y determinación de relación dosis respuesta en estudios in vitro son fundamentales para establecer el uso de los componentes y sus posibles consecuencias, aunque en la actualidad no son suficientes los estudios realizados. En la zona 4 existen una diversidad de plantas silvestres, mismas que pueden ser nativas, introducidas o modificadas de las cuales la información relacionada hacia los compuestos activos, actividad biológica y toxicológica es escasa y no es suficiente para el desarrollo agroindustrial de estas en la producción de alimentos funcionales y otro tipo de industria. En base a lo expuesto anteriormente se formula la siguiente interrogante:

¿De qué manera contribuye la determinación de la actividad biológica y toxicológica de extractos a partir de plantas silvestres (*Petiveria alliacea*, *Plectranthus amboinicus* y *Plantago major*) para su utilización en el desarrollo de alimentos funcionales?

1.2. JUSTIFICACIÓN

Lock. (2016) citado por Castañeda. (2019) menciona que hoy en día existe un creciente interés el estudio de las plantas silvestres, gracias a los sinnúmeros de beneficios que estas aportan a los seres humanos, en la actualidad se usan cientos de plantas en la medicina, siendo la ciencia moderna la encargada de analizar y estudiar los efectos terapéuticos que las plantas tienen logrando comparar y clasificar sus propiedades.

La zorrilla (*Petiveria alliacea*) es una hierba perenne a la cual se ha investigado determinando su contenido de propiedades antitumorales, antiinflamatorias, inmunomoduladores, antimicóticas y analgésicas, además, presenta diferentes principios activos como alcaloides, esteroides, triterpenos, derivados sulfurados y flavonoides (Correa et al., 2017). El orégano orejón (*Plectranthus amboinicus*) es una planta medicinal con propiedades anticonvulsivas, antiepilépticas, antiasmáticas, antiespasmódicas, sedante, broncodilatador y antimicrobiana (Acosta et al., 2021). El llantén (*Plantago major*) es una herbácea perenne que contiene propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, astringentes y anti-

sangrantes, además, se la puede emplear como agente cicatrizante interno y externo de heridas (Blanco et al., 2008 citado por Matos, 2022).

La determinación de la función biológica se realizará mediante un tamizaje fitoquímico a los diferentes extractos para determinar qué compuestos bioactivos están presentes, además de conocer si posee efectos antioxidantes y antimicrobianos las cuales permitirán potenciar su consumo tradicional y llegar a valorarlos como una fuente de ingredientes nutricionales y se establecerán de manera in vitro, por ende se determinará el grado de toxicidad que podrían tener los diferentes extractos para medir en relación al factor de seguridad.

Para la selección de especies en estudio se partió de la disponibilidad en el medio, además, de ser parte de un plan de muestreo del proyecto institucional. Es por ello que se pretende obtener a través de esta investigación la caracterización de los principios activos presentes en las plantas para el surgimiento de nuevos ingredientes en la producción de alimentos funcionales.

La presente investigación está enmarcada en un proyecto institucional sobre la “Aplicación de principios activos de plantas silvestres para una bebida funcional en el mejoramiento de la calidad de la cadena de valor de productores de pequeña escala” el cual tiene como propósito caracterizar estos compuestos activos (alcaloides y taninos) para que puedan ser utilizados en próximas investigaciones en determinados productos. De acuerdo con Noles (2018) los taninos sirven como defensas naturales privando al microorganismo de un medio apropiado para que pueda desarrollarse. Aproximadamente se han identificado de un 25 a 50% de fármacos derivados de plantas permitiendo la síntesis de compuestos químicos, evidenciándose una gran cantidad de metabolitos secundarios como taninos, terpenoides y alcaloides que poseen una actividad antimicrobiana in vitro (Torres, 2014 citado por Noles, 2018).

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la función biológica y toxicidad del extracto de tres plantas silvestres (*Petiveria alliacea*, *Plectranthuns amboinicus* y *Plantago major*) que cumplan con los requerimientos mínimos en el desarrollo de alimentos funcionales.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer la presencia de metabolitos secundarios mediante tamizaje fitoquímico de los diferentes extractos por su importancia en las funciones biológicas.
- Determinar la relación dosis respuesta *in vitro* para conocer su actividad biológica (antioxidante y antimicrobiana).
- Estimar la seguridad de los extractos mediante ensayos de toxicidad en estudios *in vitro*.

1.4. HIPÓTESIS

Al menos uno de los tres tipos de extractos (orégano orejón, llantén y zorrilla) poseen actividad biológica y una capacidad toxicológica segura.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. PLANTAS SILVESTRES

Son especies nativas que crecen de forma espontánea, aunque su gestión sea intensa, como las especies domésticas introducidas que han terminado por naturalizarse (Menéndez, 2015). De acuerdo con Buitrón (1998) citado por Sánchez y Zambrano (2005) estas plantas se utilizan como materia prima, en forma de extractos, semi purificada o como sustancias químicas puras o semisintéticas.

Las plantas silvestres siempre han formado parte de la cultura alimenticia de los pueblos, especialmente de las sociedades indígenas. Análisis nutricionales realizados a plantas silvestres comestibles demuestran que estas presentan niveles superiores de nutrientes y elevados componentes energéticos. Además de niveles considerables de proteínas, esto en comparación a las plantas de cultivos tradicionales (Charpentier, 1991 citado por Castillo y Cáceres, 2009). Estas plantas presentan sustancias bioactivas, responsables de diversas actividades biológicas, las cuales varían en su proporción, pureza y concentración dependiendo de la especie, de la época del año en que se cultivó y recolectó la planta y de su parte utilizada (López et al., 2013).

En el país existen especies de plantas silvestres únicas y exóticas propias del entorno, las sustancias contenidas en ellas se pueden emplear para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos puedan servir de precursores para la elaboración de productos en la industria farmacéutica y alimentaria.

2.1.1. ZORRILLA

La zorrilla (*Petiveria alliacea L.*) es una planta perteneciente a la familia Phytolaccaceae, generalmente utilizada en la medicina tradicional y según estudios científicos es una planta promisoriosa por la presencia de metabolitos secundarios (Hernández, 2021). Esta planta se encuentra en patios y jardines, López y Prado (2018) señalan que esta planta contiene metabolitos secundarios como taninos, alcaloides, flavonoides, triperpenos, lactonas, cumarinas y esteroide, además, existen reportes de saponinas, cianogénicos, glicósidos cardiotónicos, etc

Sariego et al. (2015) mencionan que la zorrilla posee una composición química peculiar de compuestos sulfurados, los cuales presentan propiedades antimicrobianas que le confieren la posibilidad de actuar en la fitorremediación, además, contienen flavonoides y polifenoles que funcionan como fitoalexinas en respuesta al ataque microbiano, sin embargo, no se han estudiado la efectividad in vitro de estos compuestos, ni su posible efecto sinérgico en la actividad antimicrobiana atribuida a la planta. Mientras que Guedes et al. (2009) citado por Flota et al. (2021) indican que el extracto de *Petiveria alliacea* ha demostrado poseer propiedades antimicrobianas y antifúngicas contra microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y diversas especies de *Candida spp.*

2.1.2. ORÉGANO

Es una planta perenne perteneciente a la familia Lamiaceae, sus hojas son de color verde claro, textura peciolada y ovalada. Entre sus primordiales propiedades se encuentra la de conservador de alimentos, anticancerígeno, plaguicida y antimicrobiano (Morales et al., 2021). Mientras que Acosta et al. (2021) acota diciendo que esta planta se cultiva en abundancia a escala doméstica en poblaciones rurales y urbanas.

Para Valencia y Quintero (2022), el carvacrol y el timol son los compuestos que se encuentran en mayor cantidad en el *Plectranthus amboinicus*, a las cuales se les atribuye propiedades antisépticas, bactericidas y antioxidantes, además, contienen flavonoides y terpenos que son inhibidores de bacterias Gram positivas y negativas. Además, Ayala (2001) citado por Caice (2019) argumenta que el extracto tiene una actividad bactericida en bacterias patógenas, alterando la permeabilidad de la membrana celular.

Esta planta es muy apetecible por sus diversos usos tanto medicinales como alimentarios. Desde la perspectiva de García (2019) esta planta se la usa en la medicina popular para combatir enfermedades tales como el frío, asma, estreñimiento, cefalea, tos, fiebre y enfermedades de la piel; así mismo, en sus hojas se reporta la presencia de monoterpenoides, diterpenoides, triterpenoides, sesquiterpenoides, fenoles, flavonoides y ésteres.

2.1.3. LLANTÉN

Es una herbácea perenne, de tallos subterráneos no ramificados, además, es una planta fácil de obtener y es comercializable gracias a sus propiedades antiinflamatoria, antibacteriana, astringente y antihemorrágica; también se lo emplea como cicatrizante de heridas, tanto interno como externo. Esta planta reporta la presencia de mucílagos, pectinas, flavonoides, taninos, un glucósido denominado aucubósido (aucubina) y otro llamado catalpol (Machado, 2017). Así mismo, Blanco et al. (2008) citado por Matos (2022) atribuye que adicionalmente contiene alcaloides vegetales e indoxantina, vitamina C que se encuentra en las hojas, pocas sales minerales, además, abundancia de potasio.

Por otro lado, Cipra (2018) menciona que el *Plantago major* tiene principios activos como mucílagos, pectinas, flavonoides, taninos, un glucósido denominado aucubósido (aucubina) y otro llamado catalpol, también su principal metabolito es la aucubina quién es responsable de la actividad antibacteriana.

2.2. PRINCIPIOS ACTIVOS

Son sustancias que se encuentran en diferentes partes de las plantas y funcionan como droga o medicamento para mitigar enfermedades, además; desempeñan acciones farmacológicas sean estas beneficiosas o perjudiciales para un organismo vivo (Hidalgo, 2019). De la misma manera Gómez (2016) indica que estos principios pueden cambiar a lo largo de una misma especie y en una misma planta debido a causas como época del año y características del suelo, así mismo, los estímulos químicos a que es sometida la planta en los niveles de ciertos componentes.

Los principios activos son moléculas del fruto del metabolismo en los organismos vegetales, los cuales brindan una actividad farmacológica. Entre los principales principios activos destacan los terpenos, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, aceites esenciales, alcaloides y lactonas (Herrera, 2020).

Para la determinación de los compuestos bioactivos se realiza un tamizaje fitoquímico en donde existe un ensayo diferente para identificar la presencia de cada uno de los compuestos.

2.2.1. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Tenorio (2020) describe al tamizaje fitoquímico como el inicio de la investigación fitoquímica, permitiendo determinar cualitativamente los principales componentes químicos de una planta, siendo estudios rápidos y sencillos con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Del mismo modo Pujol et al. (2020) indican que el tamizaje fitoquímico se basa en la determinación de los metabolitos secundarios mediante reacciones y análisis químicos en los extractos naturales de las plantas.

ALCALOIDES

Kennedy (2019) menciona que los alcaloides son un conjunto de compuestos con un peso molecular bajo, con uno o más átomos de nitrógeno, exclusivamente como parte de un grupo amino. En las plantas se desempeñan como defensivos y tóxicos contra insectos herbívoros e invertebrados. Los alcaloides en las personas tienen una interacción con neurotransmisores ejerciendo respuestas psicológicas y fisiológicas, son tóxicos al usarse en altas dosis adhiriéndose al hígado, por lo contrario, al usar dosis bajas y controladas funcionan como relajantes, tranquilizantes, analgésicos y sedantes (Ruiz, 2019).

TANINOS

Ochoa y Sarmiento (2018) definen a los taninos como compuestos fenólicos que forman parte de las plantas, su estructura es compleja proveniente de la unión de fenoles y azúcares. En las plantas se desempeñan como mecanismo de defensa ante los insectos herbívoros e invertebrados, mientras que, en los humanos funcionan de una manera beneficiosa como los taninos en el vino, los cuales impiden la creación de endotelina-1, que es una molécula que provoca vasoconstricción.

Por otro lado, Martínez et al. (2017) indican que, al usar niveles adecuados de taninos en la dieta, respalda parte del nitrógeno y favorecen su utilización en el tracto posterior, modificando las rutas de excreción del nitrógeno, disminuyendo la cantidad eliminada en la orina e incrementándose la excreción en las heces, lo que implica tener efectos importantes en el suelo.

Los taninos son importantes en la función antioxidante porque son capaces de captar radicales libres e inhibir la peroxidación lipídica, además inhiben la autooxidación del ácido ascórbico (Vitamina C). Al mismo tiempo, se pueden emplear los taninos en la función antibacteriana puesto que priva a los microorganismos del medio adecuado para que puedan proliferar (Cárdenas, 2017).

2.3. FUNCIÓN BIOLÓGICA

2.3.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Neha et al. (2019) citado por Abril (2021) describe a los antioxidantes como sustancias que retardan o evitan la oxidación significativa de las biomoléculas orgánicas e inorgánicas, los antioxidantes provienen de sustancias naturales y son fundamentales en la formulación de medicamentos en el campo de la medicina como antiinflamatorios, antidiabéticos, en la defensa contra enfermedades cardiovasculares o de neuro y hepatoprotectores; además, se utiliza en la industria farmacéutica, nutracéutica y cosmética. Además, Hés et al. (2019) citado por Abril (2021) mencionan que la principal fuente de antioxidantes son las plantas, por su contenido de compuestos bioactivos como flavonoides, terpenos, ácidos grasos, polisacáridos, esteroides, carotenoides y enzimas.

Los antioxidantes protegen a los sistemas biológicos de la oxidación, inhibiendo la producción de radicales libres y capturándolos para evitar la cadena de reacción o restaurando el deterioro causado por los mismos. En los seres humanos contribuye al fortalecimiento de la inmunidad innata del cuerpo humano frente a enfermedades crónicas o relacionadas con la edad, impidiendo los efectos nocivos de los radicales libres y reduciendo con esto el impacto del fotoenvejecimiento de las células cutáneas (Khan y Ahmad, 2020 citado por Abril 2021).

Por otro lado, Tubay, (2018) manifiesta que, la determinación de la actividad antioxidante es imprescindible debido a que hay muchos agentes antioxidantes naturales como el ácido ascórbico (vitamina C), glutatión (GCH), α - tocoferol (vitamina E), carotenoides y flavonoides, para su aplicación en la industria alimentaria en donde ya se han obtenido resultados favorables.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DPPH

Para determinar la actividad antioxidante se utiliza el método DPPH el cual fue propuesto por Blois en 1958, en donde demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH para aceptar un átomo de hidrógeno (H) proveniente de una molécula de cisteína. El procedimiento original para el ensayo DPPH ha sido adoptado por muchos laboratorios en donde se han realizado modificaciones a conveniencia (Tovar, 2013).

El ensayo DPPH, permite evaluar la actividad de compuestos específicos o extractos usando el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) en una solución metanólica. La reducción del DPPH se monitorea por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda característica. En su forma de radical libre, el DPPH absorbe a 515 nm y cuando sufre reducción por un antioxidante, esta absorción desaparece. En consecuencia, la desaparición del DPPH proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto para atrapar radicales (Gallego, 2016).

2.3.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Es la capacidad de impedir la proliferación de bacterias que pueden provocar infecciones graves o incluso la muerte de los seres humanos. Alrededor del 60 % de la población mundial utiliza plantas naturales y productos derivados de ellas para tratar diversas enfermedades y entre el 60 y 80 % de fármacos antibacterianos y de anticancerígenos son derivados de productos naturales (García, 2015).

Las plantas son ricas en una amplia variedad de metabolitos secundarios, tales como taninos, alcaloides, terpenoides, y flavonoides, que presentan propiedades antimicrobianas in vitro (Cárdenas, 2017). Por lo consiguiente, Sariago et al. (2013) reportan estudios de extractos de las hojas de *Petiveria alliacea* mostrando una actividad antimicrobiana frente a bacterias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*). En el caso del *Plectranthus amboinicus* también se reportan actividades antimicrobianas (Acosta et al., 2021) y el *Plantago major* el principio activo con actividad antimicrobiana es la *aucubigenina* (Acosta et al., 2019).

La prueba de difusión en disco (Kirby-Bauer), es la capacidad de muchos agentes antimicrobianos de difundir en el agar creando un gradiente continuo de concentración. Si el disco que contiene el antimicrobiano se deposita sobre una placa recién inoculada, se producirá la inhibición del crecimiento del microorganismo analizado en un punto del gradiente y dará como resultado un área concéntrica al disco de inhibición del crecimiento (Morales, 2015 citado por Sabando, 2020).

Para la determinación de la actividad antimicrobiana se llevó a cabo con bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

2.4. TOXICIDAD

Desde la perspectiva de Soler et al. (2009) las plantas tienen el potencial curativo de ciertas dolencias y enfermedades, también poseen el potencial de producir daño, toxicidad y muerte. Por lo tanto, es de vital importancia desarrollar estudios que permitan determinar los efectos tóxicos y dosis correspondientes. Por su parte Robles et al. (2015) mencionan que las plantas poseen metabolitos secundarios que contienen funciones ecológicas que intervienen en defensa de ellas, actuando como atrayentes y repelentes de animales, generando sabores amargos haciéndolas indigestas o venenosas ante diferentes organismos. Para poder consumir o aplicar los metabolitos secundarios, se necesita determinar dosis adecuadas que eviten efectos tóxicos a los seres humanos.

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN

La extracción etanólica se efectuó en el laboratorio de Bromatología de la carrera de Agroindustria en la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López”, en el Sitio El Limón a 2 Km de la ciudad de Calceta, entre las coordenadas 0°49′23″ de latitud sur y 80°11′1′ de longitud oeste a una altitud de 22 msnm. Por otra parte, la determinación de cada uno de los análisis propuestos en los objetivos: tamizaje fitoquímico (alcaloides y taninos), actividad antioxidante, actividad antimicrobiana y la presencia de toxicidad, se desarrolló en los laboratorios de la Universidad Técnica de Manabí extensión Chone, Facultad de Ciencias Zootécnicas, ubicada en la provincia de Manabí, Cantón Chone, en el sitio Ánima Km. 2 ½ Vía Boyacá Mz 30-36. Geográficamente está a 0 grado 41 minutos y 17 segundos de latitud Sur y a 80 grados 7 minutos y 25.60 segundos de longitud oeste.

3.2. DURACIÓN

El desarrollo de la presente investigación tuvo una duración de 24 semanas, a partir de agosto del 2022.

3.3. MÉTODOS

3.3.1. DESCRIPTIVO

Para Espada (2021) este método permite recopilar datos cuantificables los cuales se pueden estudiar con fines estadísticos en una población objeto. Este método es muy útil en cualquier estudio, sea cual sea su naturaleza, simplemente se debe recopilar la información adecuadamente.

3.3.2. ANALÍTICO

Permitió analizar la actividad antimicrobiana y antioxidante, y la toxicidad de los diferentes extractos de las tres plantas silvestres. De acuerdo con Rodríguez (2019)

el método analítico principalmente se utiliza para encontrar evidencia que apoye a las investigaciones para hacerlas más veraz o crear nuevas ideas acerca de una materia concreta.

3.3.3. MÉTODO BIBLIOGRÁFICO

Permitió recopilar conceptos con el objetivo de adquirir un conocimiento sistematizado (Salas, 2019). Se obtuvo información de fuentes de repositorios de tesis de diferentes Universidades y de revistas científicas.

3.3.4. MÉTODO EXPERIMENTAL

Es una técnica estadística sistemática cuyo objetivo es realizar una serie de pruebas en las que se inducen cambios deliberados para averiguar si determinados factores influyen en la variable de interés o de estudio (González, 2014). Este diseño experimental se utilizó para medir la función biológica (actividad antimicrobiana y actividad antioxidante) y la toxicidad.

3.4. TÉCNICAS

3.4.1. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Para la determinación del tamizaje fitoquímico (alcaloides y taninos) los análisis se desarrollaron en los laboratorios de la Universidad Técnica de Manabí aplicando la prueba de Wagner para alcaloides y el ensayo de cloruro férrico para taninos. Las pruebas fitoquímicas se ejecutaron a los extractos de las plantas en estudio con la metodología descrita por Ramos y Solórzano (2016) con algunas modificaciones.

DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES. PRUEBA DE DRAGENDORFF

Se agregó 1 mL del extracto a un tubo de ensayo para posteriormente acidificar el medio con tres gotas de ácido clorhídrico concentrado. Luego se colocó 3 gotas de reactivo de Wagner, para proceder a observar los cambios de color, en el cual se considerará positivo en los siguientes rangos: presencia de opalescencia (+), presencia de turbidez definida (++) y presencia de precipitado (+++).

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y/O TANINOS. ENSAYO DE CLORURO FÉRRICO.

Se utilizó 1 mL del extracto en un tubo de ensayo y se le adicionó 100 µL de solución de cloruro férrico al 5 % en una solución salina fisiológica. La prueba se considera positiva (+++) cuando la solución es de color: rojo vino, verde intenso o azul.

3.4.2. FUNCIÓN BIOLÓGICA

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DPPH

Para la determinación de la actividad antioxidante se utilizó el método del DPPH descrito por Mimica-Dukić (2003) citado por Vera et al. (2021) con modificaciones.

Como primer punto se preparó una solución de 2 mM de DPPH (Sigma Aldrich) en metanol y se dejó incubar por 24 horas en la oscuridad. Después, a partir de una solución stock de los diferentes extractos con una concentración de 10000 ppm en metanol, se realizaron diluciones de 200 ppm para llantén y orégano y 400 ppm para zorrilla. Para la medición de la actividad antioxidante, se añadió 1 mL de solución del DPPH a 1 mL de las diferentes muestras preparadas y se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Posteriormente, se medirá la absorbancia en un espectrofotómetro UV-vis (modelo Genesys 180, marca ThermoFisher) a una longitud de onda de 517 nm utilizando una curva de calibración Trolox (1,25; 2,50; 5; 10; 15; 20 y 25 µM). La concentración inhibitoria media, se obtendrá gráficamente con los valores del porcentaje de inhibición determinado por la ecuación 1 y las concentraciones de las soluciones preparadas. Para esto se utilizó el software Origen Lab2019.

Ecuación 1. Determinación Antioxidante.

$$\%Inh = \frac{Abs.control - Abs.muestra}{Abs.control} * 100 \quad [1]$$

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO (KIRBY-BAUER)

Se realizó la inoculación y siembra sobre la superficie de los agares Mueller Hinton para las bacterias: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, cada una de ellas por

separado; cepas pertenecientes al laboratorio de Microbiología de la carrera de Pecuaria de la ESPAM MFL.

Primero se procedió a preparar las concentraciones de 50 % y 100 % de los extractos, para esto se utilizó agua destilada. Para la concentración de 50 % se utilizó 1 mL de extracto con 1 mL de agua destilada, mientras que, para la concentración de 100 % simplemente se utilizó 2 mL de extracto. Luego se impregnan 50 μ L de las diferentes concentraciones de los extractos, en cada uno de los discos de papel filtro y se colocó sobre la superficie de la placa de agar inoculada. Luego se incubaron invertidas a 35 ± 2 °C por 8 horas, posteriormente se midió los halos de inhibición incluyendo el diámetro de los discos; esto se lo efectuó basándose en el estudio de Sánchez et al. (2016) citado por Sabando, (2020) con algunas modificaciones.

3.4.3. DETERMINACIÓN DE TOXICIDAD POR EL MÉTODO DE REDUCCIÓN DE RESAZURINA

Para la determinación de la toxicidad de los extractos de llantén, orégano y zorrilla, se utilizó el método de reducción de resazurina desarrollado por Liu (1986) citado por Vera et al. (2021) con algunas modificaciones.

Para este ensayo se preparó un cultivo bacteriano en el que se transfirió una colonia del microorganismo seleccionado (*E. coli*) a 100 mL de caldo nutriente (Mueller Hinton Broth), se cubrió y se colocó en una incubadora durante 18 horas a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo, se debe transferir 15 mL del caldo en condiciones asépticas a tubos de ensayo y llevarlos a centrifugar a 4000 rpm por 5 minutos, el sobrenadante de los tubos se descarta y el precipitado se suspende en una solución salina fisiológica para volver a centrifugar, repitiendo este proceso hasta que el sobrenadante este transparente. A continuación, se mide la absorbancia de la suspensión de microorganismos a 600 nm y se realizan diluciones seriadas a las que se miden las absorbancias y en paralelo se siembran en agar estándar (Sigma-Aldrich) con el fin de construir una gráfica de UFC/mL vs absorbancia, con esto se calculó el factor de dilución necesario para obtener una suspensión con una concentración de 10^6 UFC/mL.

Se preparan las diluciones de los extractos y el DMSO (dimetil sulfóxido) al 10 % v/v (2000, 3000, 4000, 5000, 6000 y 7000 mg/mL). Para el análisis de las muestras, en un tubo de ensayo se colocaron 300 µL de caldo nutriente, 250 µL de extracto, 500 µL de solución salina, 100 µL de suspensión bacteriana de 10⁶ UFC/mL y 100 µL de resazurina. Los tubos se deben homogeneizar e incubar a 37°C durante 5 horas. Pasado el tiempo establecido, se leen las absorbancias a una longitud de onda de 600 nm, y para determinar la concentración letal media (DL50) se determinó según el cambio de resazurina (azul) a resazurina (rosa) expresada como porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano. El cálculo del valor de DL50 se realizó a través de la ecuación 2, obtenida por ajustando los datos obtenidos en un modelo dosis-efecto realizado con el software Origen Lab2019.

Ecuación 2. Determinación de Toxicidad.

$$\% \text{ de Inh} = \frac{(Abs_{ctrl \text{ react.}} - Abs_{ctrl \text{ m.o.}}) - (Abs_{ctrl \text{ react.}} - Abs_{sample})}{(Abs_{ctrl \text{ react.}} - Abs_{ctrl \text{ m.o.}})} * 100 \quad [2]$$

3.5. FACTORES EN ESTUDIO

Los factores en estudio dentro de esta investigación fueron los siguientes:

- **Factor A:** Extractos de plantas silvestres
- **Factor B:** Porcentaje de concentración de los extractos aplicados

3.6. TRATAMIENTOS

Tabla 1. Detalle de los tratamientos

Tratamientos	Factor A (Tipo de extracto)	Factor B (% de concentración)
T1	Llantén	50
T2	Llantén	100
T3	Orégano orejón	50
T4	Orégano orejón	100
T5	Zorrilla	50
T6	Zorrilla	100

3.7. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se aplicó un Diseño Completamente al Azar (DCA) en arreglo bifactorial AxB, dispuesto en tres tipos de extractos; constituyéndose el tipo de extracto o función principal, por tres tipos de plantas silvestres (Ilantén, Orégano orejón, Zorrilla).

Tabla 2. Esquema del ADEVA bifactorial AxB

FUENTE DE VARIABILIDAD	GL.
TOTAL	23
EXTRACTO DE PLANTAS SILVESTRES (A)	2
PORCENTAJE DE CONCENTRACIÓN DE LOS EXTRACTOS (B)	1
INTERACCIÓN AxB	2
ERROR	18

Fuente: Los autores.

3.7. MANEJO DEL EXPERIMENTO

Para dar cumplimiento con los objetivos establecidos en esta investigación se procedió de la siguiente manera:

Se procedió como primer punto la obtención de los diferentes extractos etanólicos, el desarrollo de esta actividad se realizó siguiendo la metodología de Espinoza y Pincay (2022) con algunas modificaciones.

Recepción y clasificación de las materias primas: Las hojas de las plantas en estudio fueron recolectadas de diferentes lugares de la ciudad de Calceta, estas fueron recolectadas en la mañana para que estuvieran frescas y luego llevadas hasta el laboratorio de Bromatología de la Carrera de Agroindustria. Se seleccionaron las hojas que presentaron las mejores apariencias para continuar con el proceso.

Una vez escogida la materia prima de mejor apariencia se procedió a lavar las hojas en un recipiente con agua para eliminar las impurezas presentes en ellas, posteriormente se colocaron en papel absorbente con la finalidad de succionar el agua presente en la superficie de las hojas

Desecación: Las hojas fueron llevadas a la estufa a una temperatura de 60 °C por 45 minutos, en el caso del orégano este tuvo un tiempo de 3 horas puesto que esta planta contiene más humedad, transcurrido este tiempo y comprobando que las hojas estuvieran bien secas.

Molido del material vegetal: Por cada material vegetal se disminuye el tamaño de partícula hasta obtener un polvo. Esto se realizó con una licuadora tomando en cuenta la ley de Fick, la cual indica que, mientras mayor es el grado de división de la muestra, mayor será la superficie entre las fases de extracción y por tanto, mayor será la difusión a través de la membrana porosa; es decir que, durante la destilación en el proceso de extracción, el etanol entrará en íntimo contacto con el tejido de las hojas.

Pesado: Una vez obtenido el material vegetal en pequeñas partículas se procedió a pesar 5g en una balanza analítica y agregó en cartuchos elaborados a partir de papel filtro y sellados con grapas. En total se realizaron 3 cartuchos por cada planta.

Maceración y extracción por método soxhlet: Se utilizó el método de maceración con la intención de extraer los principios activos sin someter los extractos a altas temperaturas por tiempos prolongados, considerando la existencia de principios activos termolábiles. Se efectuaron dos tipos de maceración (alcohólica y acuosa), la alcohólica se realizó con los cartuchos elaborados con 5 g de muestra y 200 mL de alcohol potable al 96 % de pureza, método que se llevó a cabo en una estufa durante 36 horas a 50 °C; mientras que, en la acuosa se agregaron 25 g de muestra y 200 mL de agua esterilizada, de igual forma se llevó a cabo en la estufa en un tiempo de 48 horas a 50 °C. Cabe mencionar que estas muestras fueron selladas con papel aluminio.

Una vez realizada la maceración se continuó con la extracción en el equipo Soxhlet, el cual se llevó a efecto a temperaturas no mayores a 150 °C durante 5 corridas.

Evaporación del alcohol: Una vez realizada las corridas en el equipo Soxhlet, se procede a llevar las diferentes muestras al equipo rotaevaporador con el objetivo de evaporar el alcohol que aún contenía y así obtener el extracto final.

Envasado: Finalmente, los extractos de cada planta se envasaron en frascos oscuros de 50 mL y se almacenaron a una temperatura de entre 4 y 7 °C para así no perder sus propiedades.

Para el cumplimiento de cada uno de los objetivos los extractos fueron llevados hasta los laboratorios de la Universidad Técnica de Manabí extensión Chone, Facultad de Ciencias Zootécnicas, allí se procedió a realizar cada uno de los análisis a los diferentes extractos.

3.7.2. DIAGRAMA DE PROCESO EN LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

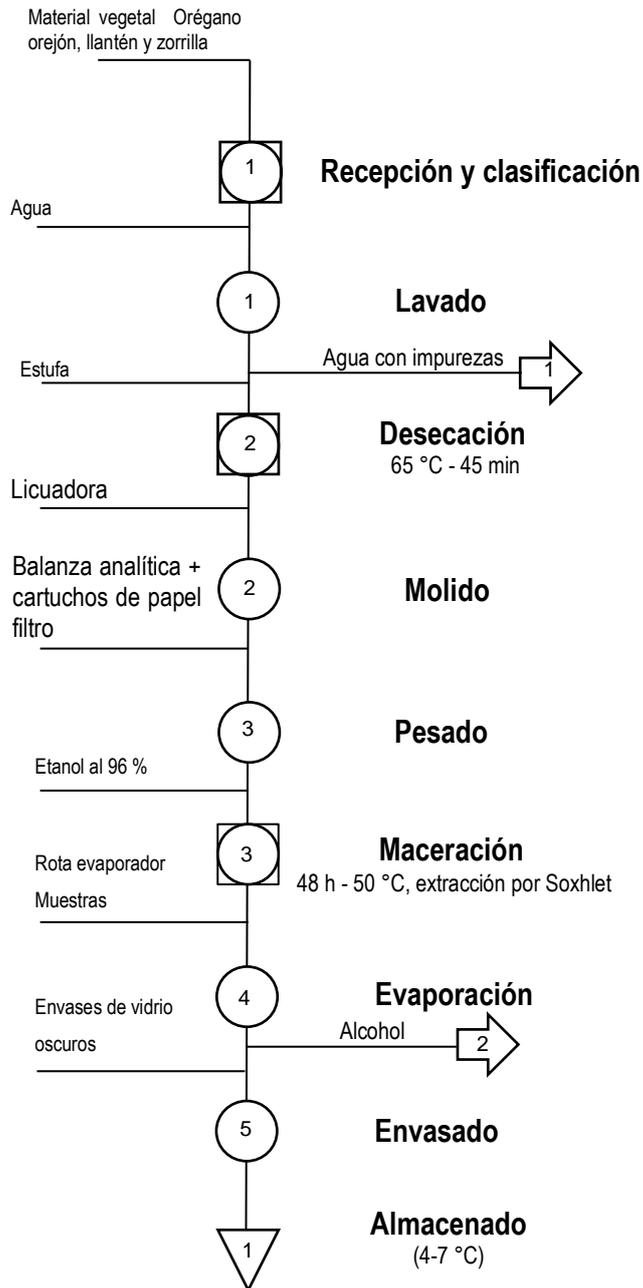


Figura 1. Diagrama de proceso en la obtención de extractos

3.8. UNIDAD EXPERIMENTAL

Se realizaron cuatro réplicas por cada tratamiento, obteniendo un total de 24 unidades experimentales. A continuación, el detalle se evidencia en la siguiente tabla.

Tabla 3: Unidad experimental

Materias primas					
Denominación	Nombre científico	Cantidad	Unidad	Réplicas	Total
TANINOS Y ALCALOIDES					
Llantén			1 mL	4	4
Orégano Orejón			1 mL	4	4
Zorrilla			1 mL	4	4
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE					
Llantén			1 mL	4	4
Orégano Orejón			1 mL	4	4
Zorrilla			1 mL	4	4
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA					
Llantén			2 mL	4	8
Orégano Orejón			2 mL	4	8
Zorrillo			2 mL	4	8
TOXICIDAD					
Llantén			2 mL	4	8
Orégano Orejón			2 mL	4	8
Zorrilla			2 mL	4	8

Fuente: Los autores

3.9. VARIABLES A MEDIR

- Tamizaje Fitoquímico
- Actividad antioxidante y actividad antimicrobiana
- Toxicidad

3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de las variables en estudio se utilizó el programa Statgraphics y se realizaron las siguientes pruebas:

- Supuestos del ADEVA: lo que permitió determinar la normalidad (ShapiroWilk) y homogeneidad (Levene) de los datos.

- Análisis de varianza (ADEVA): permitió estudiar si el factor influyó sobre la variable respuesta.
- Prueba de Tukey nivel de significancia ($p < 0,05$) se realizó para establecer la diferencia significativa entre tratamientos.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

En la tabla 4 se muestran los resultados de los análisis de alcaloides y taninos, realizados a los tres extractos de plantas silvestres (llantén, orégano orejón y zorrilla) obtenidos en el laboratorio de bromatología de la ESPAM MFL. Los análisis de alcaloides dieron negativo para todos los tres extractos, reflejando la ausencia de estos compuestos; mientras que para los análisis de taninos los extractos de orégano orejón y llantén dieron positivo (reportando presencia) a excepción del extracto etanólico de Zorrilla que reportó ausencia o resultado negativo.

Tabla 4. Presencia o ausencia de metabolitos secundarios

Análisis	Extracto etanólico de Orégano orejón (<i>Plectranthus amboinicus</i>)	Extracto etanólico de Llantén (<i>Plantago major</i>)	Extracto etanólico de Zorrilla (<i>Petiveria alliacea</i>)
Alcaloides	-	-	-
Taninos	+++	++	-

Leyenda: (-): Ausencia de metabolito secundario; (+): Bajo contenido del metabolito secundario; (++) : Contenido leve del metabolito secundario; (+++): Abundante contenido del metabolito secundario.

Fuente: Los autores.

Arogbodo et al. (2022) obtuvo resultados similares del extracto etanólico de *Petiveria alliacea* en lo que respecta a alcaloides y en taninos obtuvo variabilidad debido a que presentó contenido leve, mientras que Trevisan et al. (2022) mostró contenido leve en taninos y abundancia de alcaloides en extractos hidroalcohólicos. En cuanto a los resultados de *Plectranthus amboinicus* Maldonado et al. (2020) e Ismayil y Nimila (2019) tuvieron ausencia de alcaloides y taninos, siendo diferentes los resultados de taninos en comparación a nuestra investigación. Por último, Caro (2018) reportó resultados de ausencia en alcaloides y abundancia de taninos en extractos acuosos de *Plantago major*.

Los resultados negativos o de ausencia de alcaloides en los tres extractos de plantas silvestres guardan relación con lo citado en la investigación por Inga y Maldonado (2022), quienes manifestaron que la presencia de alcaloides está asociado generalmente a la presencia de un compuesto llamado galantamina

destacando que ciertas plantas silvestres como el llantén y la zorrilla no contienen galantamina, pero sin embargo pueden ser utilizadas para tratar enfermedades endémicas en el Ecuador (Mosquera, 2022).

Los taninos y los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en las plantas y juegan un papel destacado en las estrategias generales de defensa de las plantas, además de contribuir a la calidad de los alimentos, bajo lo citado anteriormente se argumenta que en la presente investigación se obtuvo resultados positivos para taninos en los extractos de orégano orejón y llantén (Quetin et al. 2017).

En lo que respecta a la planta silvestre zorrilla, la misma presentó ausencia de taninos. Según Quevedo y León (2022), el dibencílico trisulfuro es uno de los principales compuestos activos que se encuentran en el anamú o zorrilla, aunque también posee otros compuestos como triterpenos, polifenoles, compuestos de azufre y esteroides, sin embargo, no se les ha comprobado efectividad al ser purificados en este caso con el etanol.

4.2. RESPUESTA IN VITRO PARA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

4.2.1. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Los datos obtenidos para la capacidad antioxidante no cumplieron con el supuesto de normalidad (tabla 5), por lo que los resultados para esta variable fueron analizados mediante vía no paramétrica.

Tabla 5. Supuesto de normalidad para la variable de capacidad antioxidante

Normality Test (Shapiro-Wilk)		
	W	p
ACT. ANTIOXIDANTE	0.816	0.014

En la tabla 6 se muestra el promedio de los resultados obtenidos de la evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de llantén, orégano orejón y zorrilla. El extracto de orégano orejón presentó el valor más alto con un promedio de 114,85 (μmol equivalente a Tx/ g MS), en comparación de los extractos de llantén y zorrilla

que presentaron valores de 23,25 (μmol equivalente a Trolox/ g de muestra seca) y 14,94 respectivamente (μmol equivalente a Tx/ g MS). La actividad antioxidante se atribuye principalmente a los metabolitos secundarios analizados en el tamizaje fitoquímico, además es importante mencionar que la diferencia de promedios de capacidad antioxidante en los diferentes tipos de extractos, se debe principalmente a la solubilidad que presentan cada una de las plantas silvestres evaluadas (Tufinio et al., 2021).

Tabla 6. Contenido promedio de la capacidad antioxidante (DPPH) de los extractos de llantén, orégano orejón y zorrilla.

TIPOS DE EXTRACTOS	Recuento	Promedio (μmol Tx/g MS)	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
Llantén	4	23,25	4,15	17,86%
Orégano orejón	4	114,85	0,76	0,66%
Zorrilla	4	14,94	0,71	4,73%
TOTAL	12	51,01	47,33	92,79%

La prueba de Kruskal-Wallis aplicada sobre la relación dosis-respuesta in vitro de la actividad antioxidante se observa en la tabla 7. Los resultados obtenidos muestran un nivel de significancia de 0,007 ($p\text{-valor} < 0,05$); por lo tanto, existe diferencia estadística entre los valores de μmol Tx/g MS (capacidad antioxidante) en los tres tipos de extractos.

Tabla 7. Prueba de Kruskal-Wallis para los tres tipos de extractos

TIPOS DE EXTRACTOS	TAMAÑO DE MUESTRA	RANGO PROMEDIO
Llantén	4	6,5
Orégano orejón	4	10,5
Zorrilla	4	2,5
Estadístico		9,84615
Valor-P		0,00727671

En la investigación de Afroditi et al. (2023), se obtuvieron valores de capacidad antioxidante bajo el método DPPH) en diferentes variedades de orégano (entre ellos el orégano cubano o *Coleus amboinicus*), con valores de 108,5 y 108,6 en μmol equivalente a Trolox /g de muestra seca (MS), estos resultados concuerdan con los obtenidos en la presente investigación, evidenciando así en el extracto de orégano orejón una capacidad antioxidante promedio de 114,85 μmol equivalente a Trolox/ g de muestra seca (gráfico 1). Es importante destacar que *Plectranthus*

amboinicus (Orégano orejón), posee aceites esenciales como carvacrol, timol y eugenol; mismos que presentan un potencial de estabilización de radicales libres, siendo incluso similares ciertos antioxidantes sintéticos como BHA Y BHT.

En lo que respecta al extracto de llantén (*Plantago major*), investigaciones como la de Rodríguez et al. (2022), han demostrado la presencia de mucílagos, pectinas, flavonoides, taninos, entre otros que le confieren capacidad antioxidante, lo que concuerda con Babak (2022), quienes en su investigación citan que el extracto metanólico de llantén muestra actividad eliminadora de radicales DPPH bastante fuerte, es decir mayor poder de reducción de radicales libres.

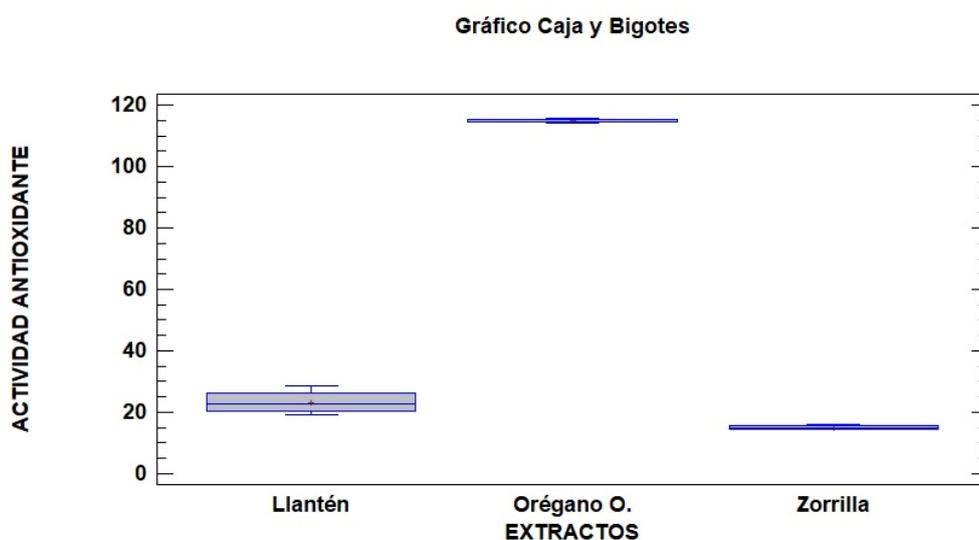


Gráfico 1. Diagrama de cajas y bigotes para la capacidad antioxidante de los extractos de llantén, orégano orejón y zorrilla

Así mismo Babak (2022), obtuvieron en su investigación sobre las propiedades antioxidantes de las especies de *Plantago* (entre ellas *P. major*), un valor promedio de capacidad antioxidante de 24 ± 1 μmol equivalente a Trolox /g de muestra seca (MS). Este resultado reportado, se encontró muy similar al establecido en la presente investigación para el extracto de llantén, cuyo valor promedio de capacidad antioxidante fue de $23,25$ μmol equivalente a Trolox/ g de muestra seca, tal y como se observa en el gráfico 1. Estos resultados están sustentados en estudios similares que muestran el multimecanismo que poseen los agentes antioxidantes naturales en el llantén.

La capacidad antioxidante obtenida en la presente investigación para el extracto de zorrilla fue en un promedio de 14,94 μmol equivalente a Trolox/ g de muestra seca, valor que se encuentra relacionado con el mencionado por Babak (2022), quien en su investigación obtuvo una capacidad antioxidante de 13,4 para el extracto de *Petiveria alliacea* L, a una concentración de 100 %, este resultado se basan en que en el extracto de zorrilla hay actividad atrapada de radicales libres porque no cumplen con las características estructurales deseadas.

4.2.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

En la tabla 8 se muestran los resultados de susceptibilidad antimicrobiana para *E. coli* y *S. aureus*, con los extractos de llantén, orégano orejón y zorrilla a concentraciones de 50 y 100 %.

El mejor extracto frente a *E. coli* fue el orégano a una concentración de 100% con un halo de inhibición de 11 mm de diámetro. Para *S. aureus* se observó que así mismo el extracto de orégano fue el que presentó mayor efectividad en la concentración de 100 % con una inhibición de 13 mm.

Tabla 8. Actividad antimicrobiana de los extractos de llantén, orégano orejón y zorrilla en cepas de *E. coli* y *S. aureus*

Muestra	Bacteria	Concentración de extractos (%)	Actividad antimicrobiana (mm)			
			Réplicas			
			1	2	3	4
Llantén	<i>Escherichia coli</i>	50	0	0	0	0
		100	5	5	5	5
	<i>Staphylococcus aureus</i>	50	0	0	0	0
		100	6	6	5	6
Orégano orejón	<i>Escherichia coli</i>	50	5	5	5	5
		100	11	11	10	10
	<i>Staphylococcus aureus</i>	50	7	6	7	8
		100	12	13	14	13
Zorrilla	<i>Escherichia coli</i>	50	0	0	0	0
		100	5	5	5	5
	<i>Staphylococcus aureus</i>	50	6	5	5	5
		100	11	10	11	11

En el caso del extracto de zorrilla fue efectivo para *E. coli* a una concentración del 100 % con un halo de inhibición de 5 mm, para *S. aureus* la efectividad se demostró con el 100 % de concentración en un halo de 11 mm.

El extracto de llantén presentó la menor inhibición bacteriana en comparación a los otros extractos. Para *E. Coli* a una concentración de 100 % inhibió con 5 mm de diámetro y para *S. aureus* al 100 % de concentración con 6 mm de inhibición.

La resistencia bacteriana obtenida en la presente investigación demuestra que los extractos de plantas silvestres poseen metabolitos secundarios y compuestos antioxidantes, mismos que guardan efecto sobre la inhibición de microorganismos patógenos. Para este caso en particular el Orégano orejón (*P. amboinicus*), tuvo el mayor halo de inhibición, lo que radica principalmente en el potencial antimicrobiano y antiinflamatorio que posee esta planta (Sánchez y Tello, 2021). Las hojas de *P. amboinicus* secretan componentes como aceites esenciales (carvacrol con un 50,07 % de actividad antimicrobiana), flavonoides y terpenos, que exhiben una buena actividad antimicrobiana por su capacidad de desnaturalizar las superficies proteicas de ciertos microorganismos como los gram-positivos (*S. aureus*) (Acosta et al., 2021).

Se evidencia que el efecto antibacteriano de los diferentes extractos es directamente proporcional a la concentración de la dilución. Lo que explica que a mayor concentración mayor efecto antibacteriano (Schovelin y Muñoz, 2018).

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA SOBRE STAPHYLOCOCCUS AUREUS.

Según la tabla 9, los resultados del ADEVA determinaron diferencias significativas en cada uno de los factores, puesto que el p-valor es menor que 0,05; lo que indica que los tres tipos de extractos aplicados en las dos concentraciones tienen un efecto estadísticamente significativo sobre *Staphylococcus Aureus*.

Tabla 9. Adeva para inhibición de la cepa bacteriana *Staphylococcus Aureus* frente a los tres tipos de extractos y dos porcentajes de concentración

Fuente de Variación	gl	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Sig.
Total	23	420,958			
Factor A: Extractos	2	216,083	108,042	311,16	0,0000
Factor B: % de concentración	1	198,375	198,375	517,32	0,0000
Factor A*B: Tipo de extracto*% de concentración	2	0,25	0,125	0,36	0,7026
Error	18	6,25	0,347222		

El análisis de medias evidencia la inhibición bacteriana de cada una de las especies en los dos porcentajes de concentración evaluadas y combinación de ambos; en presencia de *S. aureus* (Tabla 10).

Tabla 10. Medias por Mínimos Cuadrados para *Staphylococcus aureus* con intervalos de confianza del 95,0%

Nivel	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior	
MEDIA GLOBAL	24	6,95833				
FACTOR A: Tipo de extracto						
Llantén	8	2,875	0,208333	2,43731	3,31269	
Orégano orejón	8	10	0,208333	9,56231	10,4377	
Zorrilla	8	8	0,208333	7,56231	8,43769	
FACTOR B: % de concentración						
	50	12	4,08333	0,170103	3,72596	4,44071
	100	12	9,83333	0,170103	9,47593	10,1907
FACTOR A por FACTOR B						
Llantén,50	4	0	0,294628	-0,618991	0,618991	
Llantén,100	4	5,75	0,294628	5,13101	6,36899	
Orégano orejón,50	4	7	0,294628	6,38101	7,61899	
Orégano orejón,100	4	13	0,294628	12,381	13,619	
Zorrilla,50	4	5,25	0,294628	4,63101	5,86899	
Zorrilla,100	4	10,75	0,294628	10,131	11,369	

La prueba de Tukey (tabla 11), identificó tres grupos homogéneos para el factor A (tipo de extracto) y dos para el factor B (% de concentración), al mismo tiempo la significancia indica que los subconjuntos muestran diferencias estadísticamente significativas ($p_valor < 0,05$) con un nivel del 95,0 % de confianza.

Tabla 11. Tukey para inhibición de la cepa bacteriana *Staphylococcus Aureus* frente a los tres tipos de extractos y dos porcentajes de aplicación.

Factor A	Casos	Media Ls	Sigma Ls	Grupos Homogéneos
Llantén	8	2,875	0,20833	X
Zorrilla	8	8	0,20833	X
Orégano orejón	8	10	0,20833	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Llantén-Orégano orejón	*	-7,125	0,618991
Llantén-Zorrilla	*	-5,125	0,618991
Orégano orejón-Zorrilla	*	2,0	0,618991

*indica una diferencia significativa

Factor B	Casos	Media Ls	Sigma Ls	Grupos Homogéneos
50	12	4,08333	0,170103	X
100	12	9,83333	0,170103	X

Contraste	Sig.	Diferencia	Límites
50 - 100	*	-5,75	0,505404

*indica una diferencia significativa

En la investigación de Pérez et al. (2021), se muestra que el extracto de orégano causa la mayor actividad antimicrobiana, alcanzando porcentaje y halos de inhibición de 16.65 mm frente a *S. aureus*. Estos resultados se encuentran con cierta diferencia al presente estudio, donde la media para el halo de inhibición fue de 10 mm (gráfico 2), sin embargo, en ambas investigaciones se especifica la efectividad del extracto de orégano frente a *S. aureus*.

La media para el halo de inhibición del llantén para la cepa de *S. aureus* fue de 2.87 mm (gráfico 2), este valor se encuentra diferente al obtenido en la investigación de Acosta et al. (2019), quienes obtuvieron un halo de inhibición de 14,64 mm a una concentración de 800 mg/ml.

Según la investigación de Navarrete et al. (2020), el extracto etanólico de *P. alliacea* (zorrilla) presentó una actividad antibacteriana sobre *S. aureus* de 11 mm, este halo de inhibición se diferencia a los 8 mm que se obtuvieron en el presente trabajo de investigación, sin embargo, el extracto si presenta actividad antimicrobiana.

La variación en los halos de inhibición se atribuye principalmente a los protocolos y solventes utilizados para la extracción, así como también a la cantidad de extracto adicionado y el amplio rango de concentraciones (Navarrete et al., 2020).

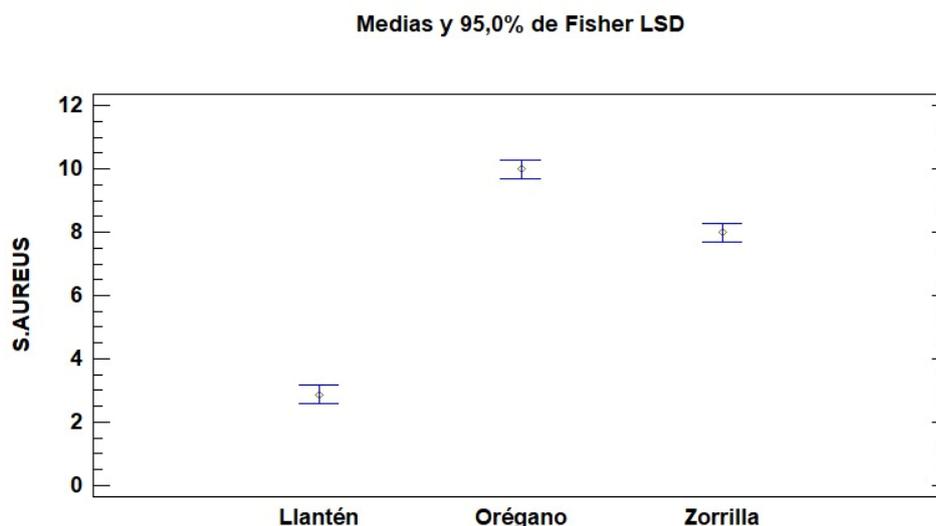


Gráfico 2. Valores de inhibición para *S.aureus* expresados de forma comparativa por cada tipo de extracto evaluado

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA SOBRE ESCHERICHIA COLI.

Los resultados del ADEVA determinaron diferencias significativas para Factor A y Factor B, puesto que el p-valor es menor que 0,05 (tabla 12); indicando que los tres tipos de extractos aplicados en las dos concentraciones tienen un efecto estadísticamente significativo sobre *Escherichia coli*. La combinación de ambos factores no mostró diferencia significativa.

Tabla 12. ADEVA para inhibición de la cepa bacteriana *Escherichia coli* frente a los tres tipos de extractos y dos porcentajes de aplicación

Fuente de Variación	gl	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Sig.
Total	23	308,5			
Factor A: Tipo de extracto	2	147,000	73,500	1323,00	0,0000
Factor B: % de concentración	1	160,167	160,167	2883,00	0,0000
Factor A*B: Tipo de extracto*% de concentración	2	0,333	0,166667	3,00	0,0751
Error	18	1,000	0,055556		

La tabla 13 muestra las medias para la inhibición bacteriana de cada una de las especies y dosis evaluadas en presencia de *E. coli* (Tabla 13). La media más alta la posee el extracto de orégano.

Tabla 13. Medias por Mínimos Cuadrados para *Escherichia coli* con intervalos de confianza del 95,0%

Nivel	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
MEDIA GLOBAL	24	4,25			
FACTOR A: Tipo de extracto					
Llantén	8	2,5	0,0833333	2,32492	2,67508
Orégano orejón	8	7,75	0,0833333	7,57492	7,92508
Zorrilla	8	2,5	0,0833333	2,32492	2,67508
FACTOR B: % de concentración					
	50	12	1,66667	0,0680414	1,52372
	100	12	6,83333	0,0680414	6,69038
FACTOR A por FACTOR B					
Llantén,50	4	0	0,117851	-0,247597	0,247597
Llantén,100	4	5	0,117851	4,7524	5,2476
Orégano orejón,50	4	5	0,117851	4,7524	5,2476
Orégano orejón,100	4	10,5	0,117851	10,2524	10,7476
Zorrilla,50	4	0	0,117851	-0,247597	0,247597
Zorrilla,100	4	5	0,117851	4,7524	5,2476

Para comprobar el tipo de extracto (Factor A) que más influyó sobre la inhibición de la cepa bacteriana *Escherichia coli*, se realizó la prueba de Tukey (tabla 14). Se comprobó que el llantén y la zorrilla comparten columna, por lo que se tienen dos subconjuntos homogéneos. Las diferencias estadísticas significativas se muestran para los pares llantén-orégano orejón y orégano orejón-zorrilla.

Tabla 14. Tukey para inhibición de la cepa bacteriana *Escherichia coli* frente a los tres tipos de extractos

Factor A	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Llantén	8	2,5	0,0833333	X
Zorrilla	8	2,5	0,0833333	X
Orégano orejón	8	7,75	0,0833333	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/-Límites
Llantén-Orégano orejón	*	-5,25	0,300917
Llantén-Zorrilla		0	0,300917
Orégano orejón-Zorrilla	*	5,25	0,300917

*indica una diferencia significativa

En la prueba de Tukey para el factor B (tabla 15), se observa que los dos niveles o dos porcentajes de concentración tienen efecto inhibitorio para la cepa bacteriana *Escherichia coli*.

Tabla 15. Tukey para inhibición de la cepa bacteriana *Escherichia coli* frente a los % de concentración de los tres tipos de extractos

Factor B	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
50	12	1,6667	0,0680414	X
100	12	6,8333	0,0680414	X

Contraste	Sig	Diferencia	Límites
50-100	*	-5,16667	0,202162

*indica una diferencia significativa

En gráfico 3 se muestran los diámetros de inhibición de *E. coli* frente a los tres tipos de extractos. El extracto que tuvo mayor efecto fue el de orégano con un halo de inhibición promedio de 7,8 mm, este resultado es menor al obtenido en la investigación de Salazar et al. (2018), quienes obtuvieron un valor de 14 mm para orégano orejón seco.

En cuanto al extracto de llantén y zorrilla, los diámetros de inhibición de *E. coli* fueron similares (2,5 mm), lo que se debe a que estas plantas silvestres poseen menor inhibición frente a bacterias gramnegativas (Sánchez y Tello, 2021).

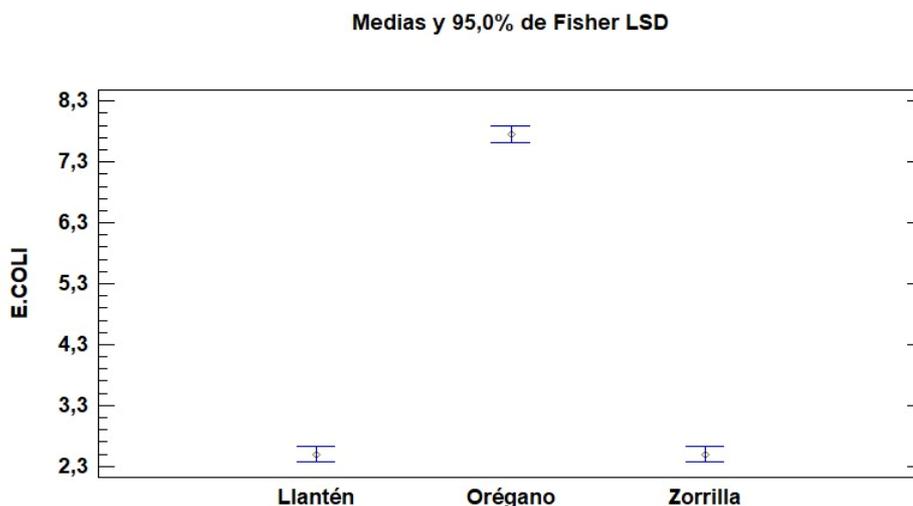


Gráfico 3. Valores de inhibición para *E. coli* expresados de forma comparativa por cada tipo de extracto evaluado

4.3. TOXICIDAD

La tabla 15 muestra la significancia estadística significativa ($p_valor < 0,05$) de cada uno de los factores y combinación de ambos para la variable toxicidad, por ende, el ensayo utilizado evidenció que los tres tipos de extractos utilizados (llantén, orégano orejón y zorrilla) y las dosis, alcanzan un porcentaje de inhibición del 50 %, es decir, disminuye la actividad de las cepas de *E. coli*. Las plantas silvestres en

estudio (llantén, orégano orejón y zorrilla), poseen fitoquímicos activos secundarios que pueden contener efectos letales para cepas microbiológicas a partir de dosis específicas (Salazar et al., 2019).

Tabla 16. Adeva para actividad de los extractos de plantas silvestres sobre la letalidad de *E. Coli*.

Fuente de Variación	gl	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Sig.
Total	71	94650,6			
Factor A: Tipo de extracto	2	4502,74	2251,37	746,32	0,0000
Factor B: % de concentración	5	85484,0	17096,8	5667,52	0,0000
Factor A*B: Tipo de extracto*% de concentración	10	4500,91	450,091	149,20	0,0000
Error	54	162,898	3,01663		

En tabla 17 se observa la media de DL50 (dosis aguda) para los tres tipos de extractos evaluados con sus respectivas dosis (factor B); y también los errores estándar de cada media, para ello se puso en consideración la inhibición de resazurina, lo que indicó la reducción o deterioro del metabolismo celular de *E. coli*. Las medias registradas indican la dosis letal para cada extracto y dosis, expresados en mg/L.

Tabla 17. Medias por Mínimos Cuadrados para DL50 con intervalos de confianza del 95,0%

Nivel	Casos	Media	Error Est.	Límite	Límite
				Inferior	Superior
MEDIA GLOBAL	72	63,6992			
FACTOR A					
Llantén	24	54,5226	0,354532	53,8118	55,2333
Orégano orejón	24	62,7513	0,354532	62,0405	63,4621
Zorrilla	24	73,8237	0,354532	73,1129	74,5345
FACTOR B					
2000	12	9,80664	0,501384	8,80142	10,8119
3000	12	24,1826	0,501384	23,1774	25,1878
4000	12	70,9155	0,501384	69,9102	71,9207
5000	12	83,326	0,501384	82,3208	84,3313
6000	12	95,4168	0,501384	94,4115	96,422
7000	12	98,5476	0,501384	97,5423	99,5528
FACTOR A por FACTOR B					
Llantén,2000	4	1,70017	0,868422	-0,0409101	3,44126
Llantén,3000	4	5,07742	0,868422	3,33634	6,81851
Llantén,4000	4	55,4464	0,868422	53,7054	57,1875
Llantén,5000	4	68,0668	0,868422	66,3257	69,8079
Llantén,6000	4	97,2105	0,868422	95,4694	98,9516
Llantén,7000	4	99,634	0,868422	97,8929	101,375

Orégano orejón,2000	4	1,84953	0,868422	0,10844	3,59061
Orégano orejón,3000	4	36,2616	0,868422	34,5205	38,0027
Orégano orejón,4000	4	62,4886	0,868422	60,7475	64,2296
Orégano orejón,5000	4	85,9102	0,868422	84,1692	87,6513
Orégano orejón,6000	4	91,749	0,868422	90,0079	93,4901
Orégano orejón,7000	4	98,2489	0,868422	96,5078	99,99
Zorrilla,2000	4	25,8702	0,868422	24,1291	27,6113
Zorrilla,3000	4	31,2088	0,868422	29,4677	32,9498
Zorrilla,4000	4	94,8114	0,868422	93,0703	96,5524
Zorrilla,5000	4	96,0011	0,868422	94,26	97,7421
Zorrilla,6000	4	97,2908	0,868422	95,5497	99,0319
Zorrilla,7000	4	97,7598	0,868422	96,0187	99,5009

*indica una diferencia significativa

El análisis de Tukey (tabla 18) evidenció tres grupos homogéneos para tipo de extracto (Factor A), indicando que la menor media para DL50 la posee el extracto de zorrilla (54,5226 mg/L), seguido del extracto de orégano (62,7513 mg/L) y finalmente el extracto de llantén (72.8275 mg/L). En todos los casos los valores superan los 5000 mg. L, por ende, todos los extractos poseen toxicidad aguda.

Tabla 18. Pruebas de Tukey para DL50 por EXTRACTOS

Factor A	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Llantén	24	54,5226	0,354532	X
Orégano orejón	24	62,7513	0,354532	X
Zorrilla	24	73,8237	0,354532	X

Contraste	Sig.	Diferencia	Límites
Llantén – Orégano orejón	*	-8,22874	1,00522
Llantén - Zorrilla	*	-19,3011	1,00522
Orégano orejón - Zorrilla	*	-11,0724	1,00522

La prueba de Tukey para el factor B (tabla 19), determinó que todas las dosis utilizadas para la inhibición de resazurina, indicaron la reducción o deterioro del metabolismo celular de *E. coli*

Tabla 19. Pruebas de Tukey para DL50 por dosis

FACTOR B	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2000	12	9,80664	0,501384	X
3000	12	24,1826	0,501384	X
4000	12	70,9155	0,501384	X
5000	12	83,326	0,501384	X

6000	12	95,4168	0,501384	X
7000	12	98,5476	0,501384	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
2000 - 3000	*	-14,376	1,42159
2000 - 4000	*	-61,1088	1,42159
2000 - 5000	*	-73,5194	1,42159
2000 - 6000	*	-85,6101	1,42159
2000 - 7000	*	-88,7409	1,42159
3000 - 4000	*	-46,7329	1,42159
3000 - 5000	*	-59,1435	1,42159
3000 - 6000	*	-71,2342	1,42159
3000 - 7000	*	-74,365	1,42159
4000 - 5000	*	-12,4106	1,42159
4000 - 6000	*	-24,5013	1,42159
4000 - 7000	*	-27,6321	1,42159
5000 - 6000	*	-12,0907	1,42159
5000 - 7000	*	-15,2215	1,42159
6000 - 7000	*	-3,1308	1,42159

Estos resultados indican que los tres extractos poseen un valor de toxicidad relativamente bajo, debido a que requieren altas concentraciones para tener una inhibición del 50 % (Gráfico 4).

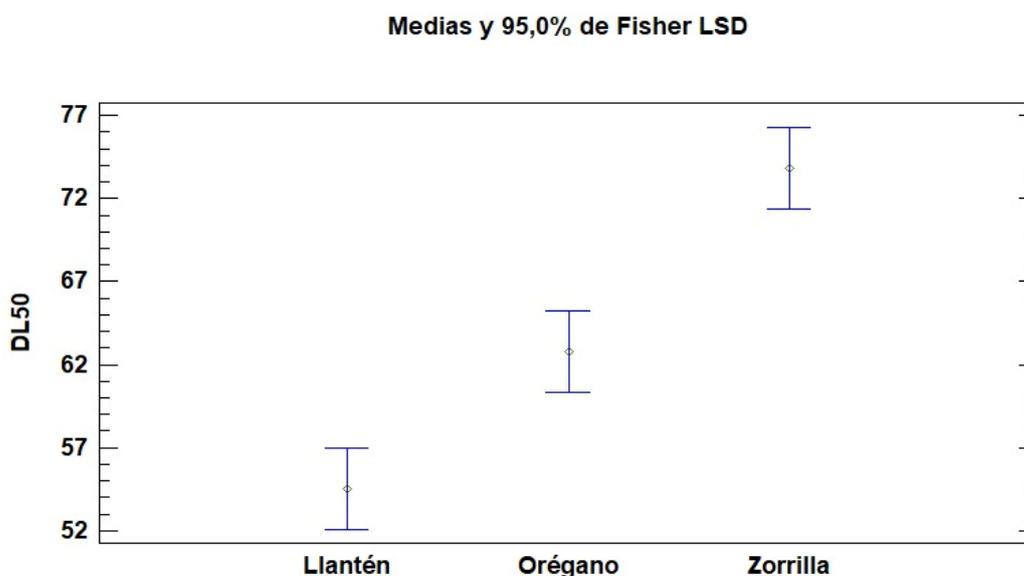


Gráfico 4. Inhibición del 50% de los extractos de llantén, orégano orejón y zorrilla.

Existen muy pocos reportes que muestren la toxicidad de extractos mediante el método de reducción de resazurina, sin embargo, es importante destacar que

estudios toxicológicos y clínicos de extractos fluidos de llantén, orégano orejón y zorrilla no han mostrado efectos adversos considerables, señalando que la DL50 en extractos fluidos de plantas silvestres (principalmente obtenido de las hojas) es mayor a 2499 mg.L (Gómez, 2022)

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- El tamizaje fitoquímico que se realizó a los extractos demostró que el orégano orejón tiene mayor cantidad de taninos (+++), seguido del llantén (++) , por último la zorrilla quien presento ausencia (-) del metabolito, sin embargo, todos los extractos reportaron ausencia de alcaloides
- A concentraciones de 200 ppm se obtuvieron resultados promedios de 114,94 y 23,25 $\mu\text{mol Tx/g MS}$ para orégano orejón y llantén respectivamente, mientras que al extracto de zorrilla se realizó a concentraciones de 400 ppm debido a que el equipo no pudo leer los datos, resultando con una concentración de 14,94 $\mu\text{mol Tx/g MS}$, mientras que en la actividad antimicrobiana se demostró que el extracto puro tiene mayores efectos de inhibición, siendo el orégano orejón quien presento los mayores halos de inhibición.
- Todos los extractos presentaron una DL50 o toxicidad aguda baja, por lo que son considerados extractos de aplicación segura.

5.2. RECOMENDACIONES

- Utilizar el extracto de orégano orejón debido a que presento mejor potencial de actividad antioxidante y antimicrobiana frente a los otros extractos estudiados y su toxicidad fue baja por lo tanto su aplicación no causaría daños.
- Realizar análisis cualitativo de fitoquímicos por otros métodos a los extractos estudiados puesto que no se han realizado muchas investigaciones.
- Efectuar análisis cuantitativo al extracto que presento mayor presencia de compuestos fitoquímicos.
- Con extractos de orégano orejón, llantén y zorrilla, utilizar concentraciones superiores a 50% debido a que logran mayor halo de inhibición frente a cepas de bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abril, Z. (2021). Antioxidantes producidos por microorganismos acuáticos y terrestres con uso potencial en cosméticos. *Actualidades Biológicas*, 44(116), 1–19. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v44n116a02>
- Acosta, D., Morales, M., y Villanueva, G. (2021). Obtención de extracto fluido de *Plectranthus amboinicus* (orégano), utilizando el método de agitación mecánica. *Afinidad*, 78(592), 41-47. <https://raco.cat/index.php/afinidad/article/view/385610/478786>
- Acosta, J., Verástegui, C., Iglesias, S., Moreno, M., Failoc, V. (2019). Efecto inhibitorio, in vitro del extracto etanólico de *Plantago Major* “Llantén” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus β-hemolíticos*. *Rev. Medicina Naturista*, 13(2), 7-11.
- Afroditi, M; Haralobos, K; Anastasia, K; Nikolaos S; y Marilena, D. (2023). Ultrasound-Assisted Extraction of Total Phenolic Compounds and Antioxidant Activity Evaluation from Oregano (*Origanum vulgare ssp. hirtum*) Using Response Surface Methodology and Identification of Specific Phenolic Compounds with HPLC-PDA and Q-TOF-MS/MS. *Molecules*. 28(5), 20-33. <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/5/2033/htm>.
- Arogbodo, J., Ibge, F., Adebayo, I. (2022). Preliminary studies on the phytochemical constituents and antioxidant properties of four medicinal plants in Nigeria. *Journal of Scientific Research in Medical and Biological Sciences*. 3(2), 9-19. <https://doi.org/10.47631/jsrmb.v3i2.516>
- Babak, T. (2022). Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Plantago major* frente a *Streptococcus mutans*. *Revista cubana de investigaciones biomédicas*, 40 (4), 1-14
- Caice, S. (2019). *Evaluación de la infusión de Hierba Luisa (Cymbopogon citratus) y Oreganon (Plectranthus amboinicus) como prebiótico en patos Broiler*. [Tesis de Grado, Universidad de Guayaquil]. <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/42977/1/Evaluaci%c3%b3n%20de%20la%20infusi%c3%b3n%20de%20HIERBA%20LUIZA%20%28Cymbopogon%20citratus%29%20y%20OREGANON%20%28Plectranthus%20amboinicus%29%20como%20PREBI%c3%93TICO%20en%20patos%20Broiler.pdf>
- Cárdenas, C. (2017). *Actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto etanólico de Prosopis pallida “algarrobo”*. [Tesis de Grado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/5857/Cardenas_cc.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Caro, D., Rivera, D., Ocampo, Y., Franco, L., y Salas, R. (2018). Evaluación farmacológica de *Mentha spicata* L. y *Plantago major* L., plantas medicinales para el tratamiento de la ansiedad y el insomnio en la costa caribe colombiana. *Medicina alternativa y complementaria basada en la evidencia*, vol. 2018, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2018/5921514>

- Castañeda, R. (2019). *Estudio Etnobotánico de las plantas silvestres del distrito andino de Lircay, Angaraes, Huancavelica, Perú*. [Tesis Doctoral, Universidad Nacional Mayor de San Marcos].
- Castillo, M., y Cáceres, M. (2009). *El bosque como fuente de alimento: Un estudio etnobotánico de plantas silvestres comestibles en tres comunidades de la Reserva Biológica Indio-Maíz, y tres comunidades de la Reserva de Biosfera BOSAWAS*. [Tesis de Grado, Universidad Nacional Agraria]. <https://cenida.una.edu.ni/Tesis/tnk01c352.pdf>
- Cipra, I. (2018). *Eficacia antibacteriana in vitro del extracto etanólico de Plantago major al 50% sobre Escherichia coli enteropatógena*. [Tesis de Grado, Universidad Privada Antenor Orrego]. http://repositorio.upao.edu.pe/bitstream/20.500.12759/4090/1/REP_MED.HUMA_INGRI.CIPRA_EFICACIA.ANTIBACTERIANA.INVITRO.EXTRACTO.ETANOLICO.PLANTAGO.MAJOR.50%25ESCHERICHIACOLI.ENTROPATOC3%93GENA.pdf
- Cordero, S., L. Abello y F. Galvez. (2017). *Plantas silvestres comestibles y medicinales de Chile y otras partes del mundo. Guía de Campo*. Ed. Corporación Chilena de la Madera, Concepción, Chile. https://fundacionphilippi.cl/wp-content/uploads/2018/10/guia-de-campo_plantas-silvestres-comestibles-y-medicinales-de-chile-y-otras-partes-del-mundo1.pdf
- Correa, M., Yeung, K., Linares, H., Pacheco, O., Caicedo, P., y Bonfante, R. (2017). Efectividad del extracto acuoso de la planta *petiveria alliacea* (mapurite) sobre la evolución del Melanoma maligno en ratones C57BL/6. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*, 21(2), 54-61. <https://revistas.uclave.org/index.php/gcv/article/view/824/330>
- Echeverría, M. (2020). *Antioxidantes: naturales vs sintéticos*. <https://thefoodtech.com/ingredientes-y-aditivos-alimentarios/antioxidantes-naturales-vs-sinteticos/>
- Espada, B. (29 de abril de 2021). Qué es el método descriptivo y ejemplos. <https://okdiario.com/curiosidades/que-metodo-descriptivo-2457888>
- Espinoza, H., y Pincay, G. (2022). *Relación del extracto de Piper carpunya Y Momordica charantia sobre la inhibición de patógenos in vitro y el tipo de interacción*. [Tesis de Maestría, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí-Manuel Félix López]. <https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/1681/1/TTMAI30D.pdf>
- Flota, G., Rosado, J., Rodríguez, R., y Bolio, M. (2021). Contribuciones científicas de la FMVZ-UADY sobre *Petiveria alliacea*: alternativa de control de garrapatas y nematodos en animales domésticos. *Tropical and Subtropical Agroecosystem*, 24(123), 1-14.
- Gallego, M. (2016). *Estudio de la actividad antioxidante de diversas plantas aromáticas y/o comestibles*. [Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Catalunya]. <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/403986/TMGG11de1.pdf?sequ>

- García, K. (2015). *Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos de dos especies de plantas del género Amaranthus aplicado sobre cepas de interés clínico en el periodo diciembre de 2013- mayo de 2014*. [Tesis de Grado, Universidad Nacional de Chimborazo]. <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/1305/1/UNACH-EC-LAB.CLIN-2015-0004.pdf>
- García, M. (2019). *Control de la calidad de la materia prima obtenida a partir de las hojas de Orégano Francés, en Centros de Producción Local de la provincia de Villa Clara*. [Tesis de Grado, Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas]. <https://dspace.uclv.edu.cu/bitstream/handle/123456789/11727/Garc%c3%ada%20Varens%2c%20Marco%20%20Antonio.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Gasaly, N., Riveros, K., y Gotteland, M. (2020). Fitoquímicos: una nueva clase de prebióticos. *Revista Chilena de Nutrición*, 47(2), 1-11. DOI:10.4067/S0717-75182020000200317
- Gómez, B. (2016). *Uso de plantas medicinales en agentes tradicionales para tratar síntomas asociados en Colcamar-Amazonas, 2015*. [Tesis de Grado, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas]. [http://repositorio.untrm.edu.pe/bitstream/handle/UNTRM/155/USO%20DE%20PLANTAS%20MEDICINALES%20EN%20AGENTES%20TRADICIONAL ES.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.untrm.edu.pe/bitstream/handle/UNTRM/155/USO%20DE%20PLANTAS%20MEDICINALES%20EN%20AGENTES%20TRADICIONAL%20ES.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Gómez, G. (2022). "Control de ninfas de garrapatas (*Rhipicephalus microplus*) en combinación de *Beauveria spp.* con moléculas orgánicas y químicas. [Tesis de Grado, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/32381/1/T-ESPESD-003216.pdf>
- González, I. (2014). *Diseño de experimentos y su aplicación en la industria*. [Tesis de Grado, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo]. <https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/sahagun/article/view/1340/4647>
- Hernandez, J. (2021). *Evaluación de la actividad citotóxica in vitro del extracto etanólico de *Petiveria alliacea* L. sobre la línea celular tumoral SiHa*. [Tesis de Grado, Universidad de La Salle]. <https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1143&context=biologia>
- Herrera, C. (2020). *Principios activos de plantas medicinales con actividad antimicrobiana contra microorganismos de interés estomatológico: Una revisión*. [Tesis de Grado, Universidad César Vallejo]. https://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/64829/Herrera_CCDD-SD.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Hidalgo, V. (2019). *Uso de plantas medicinales como analgésicos antiinflamatorios en el cantón Palora*. [Tesis de Grado, Universidad Técnica de Ambato]. <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/29446/2/Hidalgo%20Trelles%2C%20Vanesa%20Pamela.pdf>

- Indacochea, B., Parrales, J., Álvarez, B., Zhindón, B., y Choez, P. (2018). Uso popular de plantas medicinales del cantón Jipijapa, Ecuador. *UNESUM-Ciencias*, 2(2), 35-45.
- Inga, E y Maldonado, L. (2022). *El género Phaedranassa (Amaryllidaceae) como fuente promisorio de metabolitos bioactivos ante la enfermedad de Alzheimer - Revisión Bibliográfica*. [Tesis de Grado, Universidad de Cuenca]. Repositorio Institucional Universidad de Cuenca. <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/39465/1/Trabajo-de-Titulaci%C3%B3n.pdf>
- Ismayil, S., y Nimila, P. (2019). Actividad antimicrobiana de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) contra las bacterias gram negativas *Klebsiella pneumoniae* y *Shigella flexneri* y sus pruebas fitoquímicas. *International Journal of Health Sciences and Research*, 9 (5), 304-311.
- Jiménez, A., Mora, K., Rosete, S., y Cabrera, C. (2021). Utilización de plantas medicinales en cuatro localidades de la zona sur de Manabí, Ecuador. *Siembra*, 8(2), 1-13. <https://doi.org/10.29166/siembra.v8i2.3223>
- Kennedy, D. (2019). Fitoquímicos derivados de plantas para mejorar la función cognitiva y la atención. *Sports Science Exchange*, 29(193), 1-5. https://www.gssiweb.org/docs/librariesprovider9/sse-pdfs/sse_193_fitoquimicos_derivados_plantas.pdf?sfvrsn=2
- López, F., Meza, E., Jiménez, S., Altagracia, M., y Manjarrez, J. (2013). Métodos de extracción e identificación de los bioactivos de la *Lavandula officinalis* y su potencial uso como agente sedante. *Rev. Mex. Cienc. Farm*, 44(1), 60-65. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57929946008>
- Lopez, J., y Prado, M. (2018). *Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas de Petiveria alliacea L. (Mucura) frente a cepas de Candida Albicans in vitro*. [Tesis de Grado, Universidad Inca Garcilaso de la Vega]. <http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/2989/Tesis%20LOPEZ%20ASTOCONDOR%20JENNY-%20PRADO%20HENOSTROZA%20MERY.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Machado, J. (2017). *Análisis in vitro del efecto antimicrobiano del Plantago major L. (Llantén) frente a Enterococcus faecalis ATCC 19433*. [Tesis de Grado, Universidad Nacional de Chimborazo]. <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/3433/1/UNACH-EC-FCS-ODT-2017-0006.pdf>
- Maldonado, D., Subramanian, G., Kurup, R., y Ansari, A. (2020). Actividad antifúngica y cribado fitoquímico de hojas de *Cymbopogon citratus*, *Cajanus cajan* y *Plectranthus amboinicus* recolectadas en Guyana, América del Sur. *Revista Internacional de Investigación de Patógenos*, 5 (1), 1-9. <https://10.9734/IJPR/2020/v5i130122>
- Martín, F. (14 de junio de 2017). *Introducción a la toxicología de los alimentos: algunos conceptos generales*. <https://www.restauracioncolectiva.com/n/introduccion-a-la-toxicologia-de-los-alimentos-algunos-conceptos-generales-i>

- Martínez, M., Betancourt, I., Morejón, M., Orea, U., y Martínez, A. (2017). Análisis fitoquímico de los extractos del fruto de la especie *Cordia alliodora*. *Cultivos Tropicales*, 38(2), 7-14. <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v38n2/ctr01217.pdf>
- Matos, R. (2022). *Efecto de diferentes concentraciones de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) en la inducción de callos viables in vitro de llantén (Plantago major L.) en Pucallpa*. [Tesis de Grado, Universidad nacional de Ucayali]. http://repositorio.unu.edu.pe/bitstream/handle/UNU/5360/B5_2022_UNU_AGRONOMIA_2022_T_ROY_MATOS.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Mellado, M. (2017). *Evaluación toxicológica in vitro e in vivo de compuestos organosulfurados con potencial uso en envasado activo en contacto con alimentos*. [Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=109645>
- Menéndez, G. (2015). *Etnobotánica de las plantas silvestres comestibles y medicinales en cuatro comarcas de Araba y Bizkaia*. [Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid]. https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/667855/menendez_baceta_gorka.pdf?sequence=1
- Morales, G., Aguilar, A., Reyes, M., Sarracino, O., Castillo, M., Almenares, D., Miranda, E. (2021). Evaluación de tecnologías solares para el deshidratado de oregán (*Plectranthus amboinicus*) y contenido de fenoles totales. *Journal of Energy*, 5(1), 51-62.
- Morales, P. (2011). *Vegetales silvestres de uso alimentario: Determinación de compuestos bioactivos y valoración de la capacidad antioxidante*. [Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/14444/1/T33233.pdf>
- Morales, P., Sánchez, M., y Cámara, M. (25 de febrero de 2015). *Importancia de la presencia de compuestos bioactivos en los vegetales*. <https://www.interempresas.net/Poscosecha/Articulos/133699-Importancia-de-la-presencia-de-compuestos-bioactivos-en-los-vegetales.html>
- Mosquera, T. (2022). *Productos naturales*. Editorial Abya-Yala. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/21673/4/Productos%20naturales%202022.pdf>
- Navarrete, N., Pita, E., Sánchez, R., Giraldo, S., y Bernal, M. (2020). Actividad in vitro de los extractos etanólicos de *Lantana camara* L., *Petiveria alliacea* L. y *Lippia dulcis* T. frente a bacterias patógenas. *NOVA*. 18(33). 53-71. <https://doi.org/10.22490/24629448.3700>
- Noles, T. (2018). *Evaluación de la capacidad antibacteriana de los taninos extraídos del banano verde (Musa sp.), rechazo de las bananeras, frente a la bacteria Staphylococcus aureus ATCC:12600*. [Tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16597/1/UPS-CT008051.pdf>

- Ochoa, L y Sarmiento, A. (2018). *Estudio fitoquímico de la especie vegetal Bucquetia glutinosa (L. f.) DC. (Melastomataceae) y evaluación de su actividad biológica*. [Tesis de Grado, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales].
<https://repository.udca.edu.co/bitstream/handle/11158/996/TEISIS%202018-05-22.pdf;jsessionid=E97AA7B45F4A13E690EE42973B2293E0?sequence=1>
- Oleas, N., Valencia, K., Peña, P., Páez-Vacas, M., Salazar, L., y Tobes, I. (2021). BioCamb: 10 años contribuyendo al conocimiento de la biodiversidad en el Ecuador. *CienciAmérica*, 10(2), 2-11.
- Organización Panamericana de la Salud. (19 de marzo de 2018). *Situación de las plantas medicinales en Perú. Informe de reunión del grupo de expertos en plantas medicinales*.
https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50479/OPSPER19001_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Pérez, O.; Alvarado, R; Yacarini, A. (2021). Actividad antibacteriana in vitro de extracto etanólico crudo de las hojas de *Origanum vulgare*, frente *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 12(1), 21-29.
http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2072-92942021000100003&lng=es&tlng=es.
- Pujol, A., Tamargo, B., Salas, E., Calzadilla, C., Acevedo, R., y Sierra, G. (2020). Tamizaje fitoquímico de extractos obtenidos de la planta *Sapindus saponaria* L que crece en Cuba. *Revista Bionatura*, 5(3), 1209-1214.
<http://dx.doi.org/10.21931/RB/20120.05.03.7>
- Quetin, J; Monteiro, J y Colombo, E. (2017). Taninos. *ScienceDirect*. 1(1), 199-232.
<https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/tannin-derivative#:~:text=Tannins%20are%20plant%20secondary%20metabolites,character%20rendering%20plant%20tissues%20inedible>
- Quevedo, N y León, R. (2022). Tintura de *petiveria alliacea* (anamú) para controlar los niveles de glucosa. Riobamba, 2022.
<https://www.istmas.edu.ec/images/revista/edicion5/06.Articulo.Tintura%20Petiveria.pdf>
- Ramos, M. y Solórzano, R. (2016). *Características farmacognósticas de las hojas de Alternanthera lanceolata (Benth.) Schinz "lancetilla" proveniente del distrito de Urpay provincia de Sánchez Carrión región La Libertad*. [Tesis de Grado, Universidad Nacional de Trujillo]. <https://cutt.ly/xnaB8NU>
- Robles, M., Aguilar, A., Gutiérrez, M., Rodríguez, F., Morales, J., Guerrero, P., Madrigal, J., Del Toro, C. (2015). Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de Tempisque (*Sideroxylon capiri* PITTIER). *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 18(3), 3-8. <https://biblat.unam.mx/hevila/Biotecnia/2016/vol18/no3/1.pdf>

- Rodríguez, A. (14 de febrero de 2019). *Método analítico de investigación: características y ejemplos*. Lifeder. <https://www.lifeder.com/metodo-analitico-sintetico/>.
- Rodríguez, J., Argomedo, M., Sarmiento, P., Contreras, M., Reategui, M., Ruiz, W., Ramírez, R. (2022). Efecto de *Plantago major* L. (*Plantaginaceae*) sobre la capacidad de regeneración de *Girardia festae* (*DugesIIDae*). *Arnaldoa*, 29(1), 177-184. <https://dx.doi.org/10.22497/arnaldoa.291.29111>
- Ruiz, E., y Moreira, J. (2017). Metabolitos secundarios en plantas medicinales usadas para problemas gastrointestinales. Una revisión sobre medicina ancestral ecuatoriana. *Revista Bases de la Ciencia*, 2(3), 1-16. <https://revistas.utm.edu.ec/index.php/Basedelaciencia/article/view/1036/1078>
- Ruiz, W. (2019). *Determinación de los fitoconstituyentes cuantificación de polifenoles y actividad antioxidante de la Dalea strobilacea Barnedy (Hiernaichil)*. [Tesis de Grado, Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote]. http://repositorio.uladech.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13032/11477/DAL_EA_STROBILACEA_BARNEDY_HIERBAICHIL_RUIZ_IZQUIERDO_WALTER.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Sabando, L. (2020). *Efecto antimicrobiano in vitro del extracto de hojas de Icaco en bacterias mesófilas (Salmonella spp, Escherichia coli, Staphylococcus aureus)*. [Tesis de Grado, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López”]. <http://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/1288/1/TTAI08D.pdf>
- Salas, D. (2019). *Investigación bibliográfica*. <https://investigaliacr.com/investigacion/investigacion-bibliografica/>
- Salazar, C; Chavarry, M; Zárraga, H; Martínez, S; Quinter, M. (2018). *Camelia sinensis*(L.) Kuntze] y orégano orejón [*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.] sobre la inhibición in vitro de *Escherichia coli*. *Rev. Fac. Agron*, 44(3), 89-95. http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_agro/article/view/24362/144814490619
- Salazar, I; Rodríguez, R; Betancourt, C; Martínez, Y; Guillaume, J. (2019). Análisis de los metabolitos secundarios del polvo de hojas de *Origanum vulgare* y *Ficus pandurata*. *Revista de Producción Animal*, 31(1), 61-63. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-79202019000100061&lng=es&tlng=es.
- Sánchez, L., y Zambrano, F. (2005). *Establecimiento de una colección de especies medicinales tropicales en la zona de Quevedo*. [Tesis de Grado, Universidad Técnica Estatal de Quevedo]. <https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/2316/1/T-UTEQ-0032.pdf>
- Sánchez, M y Tello, A. (2021). Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Plantago major* frente a *Streptococcus mutans*. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 40(4), e1173.

://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002021000500005

- Sariego, S., Marín, J., Ochoa, A., Viera, Y. (2013). *Petiveria alliacea* L.: distintas condiciones experimentales en la elaboración de extractos con actividad antimicrobiana. *Química Viva*, 12(3), 274-287. <https://www.redalyc.org/pdf/863/86329278008.pdf>
- Sariego, S., Marín, J., Ochoa, A., Rivero, D., y Sariego, O. (2015). Determinación de metales, fenoles totales y flavonoides totales en extractos de las hojas de *Petiveria alliacea* L. (anamú). *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 46(1), 155-163.
- Schovelin, A. y Muñoz, M. (2018). Efecto Antibacteriano de la Infusión de Orégano (*Origanum vulgare*) sobre el Crecimiento in Vitro de *Streptococcus mutans*, 2015. *International journal of odontostomatology*, 12(4), 337-342. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-381X2018000400337>
- Soler, D., Macías, C., Pereira, E., Dranguet, Y., Guzmán, V., Calzada, A. (2009). Farmacología de las plantas medicinales. *Revista Información Científica*, 61(1), 1-14. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=551757317013>
- Tenorio, L. (2020). *Etnobotánica y fitoquímica de plantas medicinales en dos centros poblados del distrito de Santa Rosa, provincia La Mar, Ayacucho 2017*. [Tesis de Grado, Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga]. http://repositorio.unsch.edu.pe/bitstream/UNSCH/4978/1/TESIS%20B909_Ten.pdf
- Tovar, J. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecorregión cafetera*. [Tesis de Grado, Universidad Tecnológica de Pereira]. <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/3636/54763T736.pdf;jsessionid=B38727DDF43E975B0A2AECE6984A1E1A?sequence=1>
- Tubay, C. (2018). *Composición química (volátiles), caracterización físico química y actividades biológicas del aceite esencial de Lippia alba de Ecuador*. [Tesis de Maestría, Escuela Superior de Turismo e Tecnología do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria]. <https://iconline.ipleiria.pt/bitstream/10400.8/3474/1/TESIS%20LIPPIA%20ALBA%20DEL%20ECUADOR%2C%20MANABI%2C%20CHARAPOTO%201.pdf>
- Trevisan, M., Rodrigues, P., Numes, A., Falcão, M., Martins, H., Scapin, E., Dos Santos, M., & Seibert, C. (2022). Actividad antiedematogénica de *Petiveria alliacea* L. en intoxicaciones botrópicas. *Journal of Medicinal Plants Research*, 16(12), 315-325. <https://doi.org/10.5897/JMPR2022.7267>
- Tufinio, K; Ames, Harold; Vergara, A; Fukusaki, A; Paucar, K. (2021). Determinación de la actividad antioxidante de extractos de hojas de Buddleja Inkana, Oreocallis Grandiflora y Chuquiraga Spinosa. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 87(2), 107-119. <https://dx.doi.org/10.37761/rsqp.v87i2.343>

- Valencia, L., y Quintero, J. (2022). Extracción y caracterización de aceite esencial de orégano, especie *Plectranthus amboinicus*, a partir de cultivos orgánicos del Magdalena Medio en Colombia. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 5(1), 550-563. 10.34188/bjaerv5n1-043
- Vera, J., Dueñas, A., Rodríguez, J., y Radice, M. (2021). Phytochemical characterization of the ethanolic extract, antioxidant activity, phenolic content and toxicity of the essential oil of *Curcuma longa* L. *Revista de la Facultad de Agronomía*. 39(1), 1-7.
- Vera, T., y Zambrano, M. (2019). Diseño de un producto agroturístico como eje potenciador del desarrollo local sostenible en el sitio La Esperanza, cantón Bolívar, Provincia de Manabí. [Tesis de Grado, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí 'Manuel Félix López'] <https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/959/1/TTMT2.pdf>

ANEXOS

Anexo 1. Recolección de la materia prima



Anexo 2. Clasificación y lavado

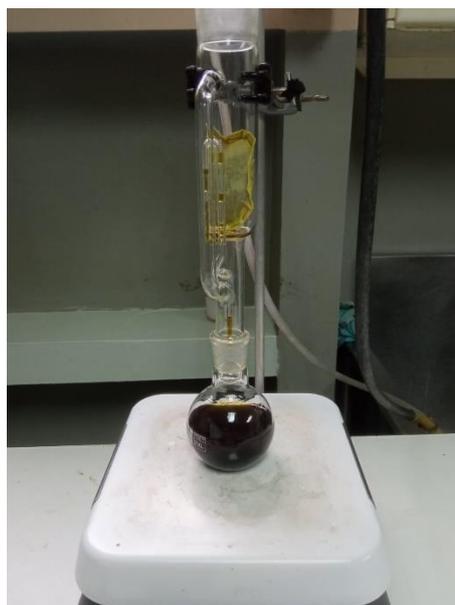


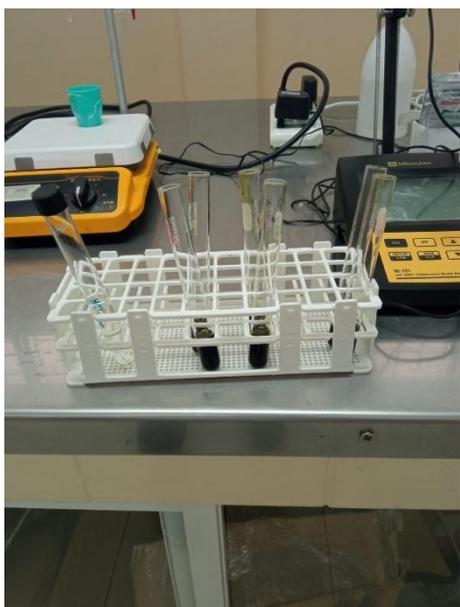
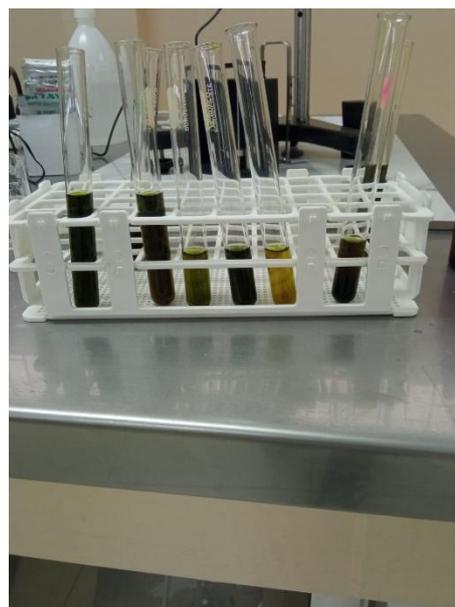
Anexo 3. Desección



Anexo 4. Molido



Anexo 5. Medición de humedad**Anexo 6. Pesado de la muestra****Anexo 7. Maceración****Anexo 8. Equipo Soxhlet**

Anexo 9. Rotaevaporador**Anexo 10. Ultrasonido****Anexo 11. Determinación de alcaloides****Anexo 12. Determinación de taninos**

DPPH

Anexo 13. Preparación de las muestras



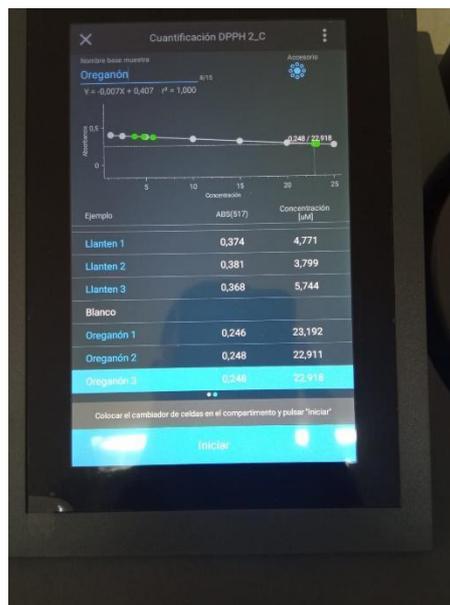
Anexo 14. Adición de DPPH



Anexo 15. Llenado de cubetas

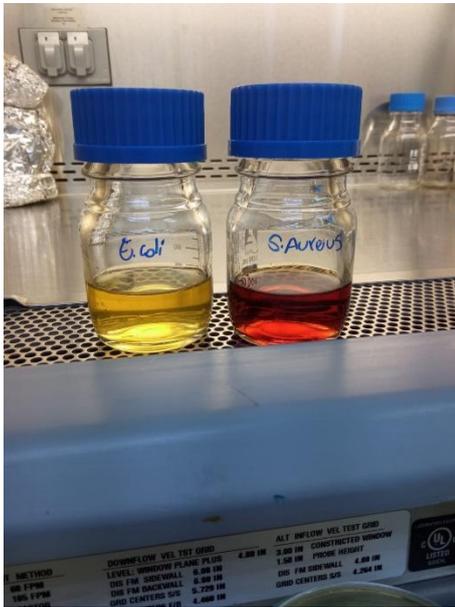


Anexo 16. Lectura en el Espectrofotómetro

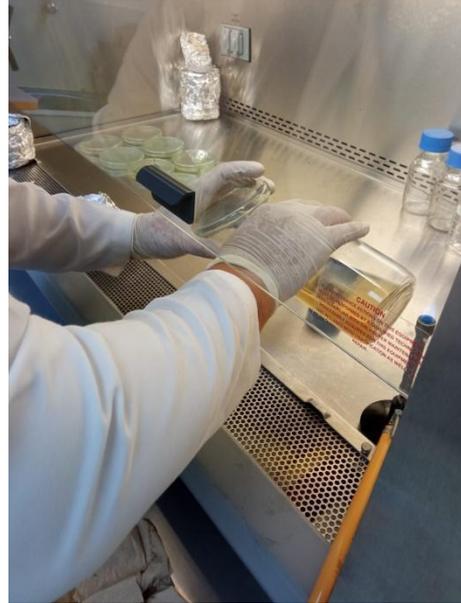


ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

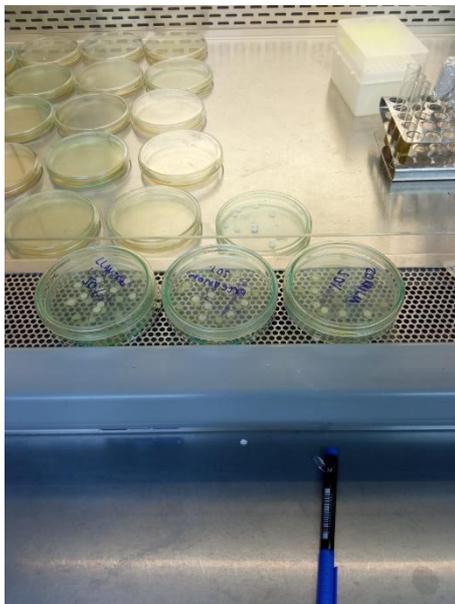
Anexo 17. Preparación de bacterias



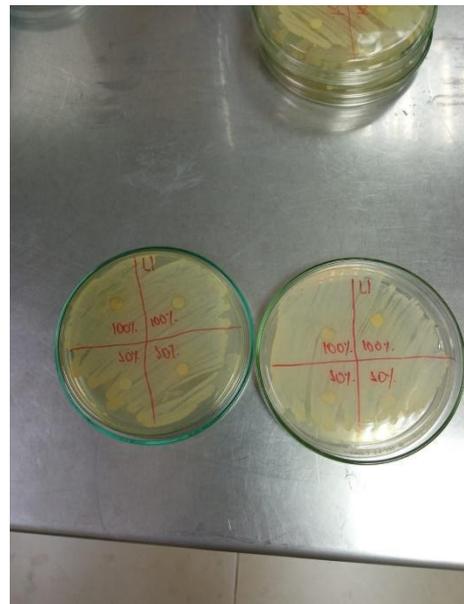
Anexo 18. Agar Mueller Hinton



Anexo 19. Impregnación de discos



Anexo 20. Inhibición



TOXICIDAD

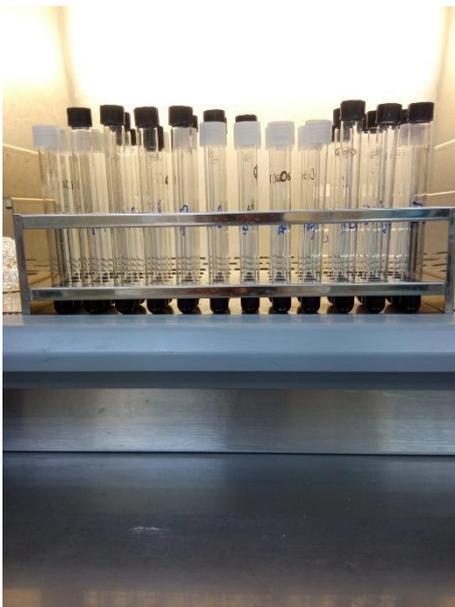
Anexo 21. Mezclado



Anexo 22. Agitación de la muestra



Anexo 23. Incubación de la muestra



Anexo 24. Determinación de toxicidad



Anexo 25: Resultados de los analisis realizados



FCZ-LAB

Investigamos para cambiar el sector Agropecuario

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE CIENCIAS ZOOTÉCNICAS
 EXTENSIÓN CHONE

Cliente	Washington Fernando Demera Lucas María Fernanda Intriago Alcívar	Fecha de recibido: 13/10/2022 Fecha de análisis: 13/10/2022 Fecha de reporte: 25/03/2023
Dirección	Calcuta	Ing. Mario Bonilla Loor, PhD Jefe de los Laboratorios de la FCZ - LAB Autorizado y revisado
Teléfono	0982628371	
Muestra	Extractos vegetales	
Cantidad recibida	100 mL / muestra	
Objetivo del análisis	Realizar un análisis – funcional de extractos vegetales	

TAMIZAJE CUALITATIVO

Muestra	Alcaloides	Taninos
Llantén	-	++
Oreganón	-	+++
Zorrilla	-	-
Ensayo	Dragendorff	Cloruro férrico

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

MÉTODO DPPH

Muestra	µmol Equivalente a Trolox / g de muestra seca			
	1	2	3	4
Llantén	23,855	18,995	28,720	21,425
Oreganón	115,960	114,555	114,590	114,276
Zorrilla	15,033	15,898	14,413	14,400



FCZ-LAB

Investigamos para cambiar el sector Agropecuario

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE CIENCIAS ZOOTÉCNICAS
 EXTENSIÓN CHONE

Cliente	Washington Fernando Demera Lucas María Fernanda Intriago Alcívar	Fecha de recibido: 13/10/2022 Fecha de análisis: 13/10/2022 Fecha de reporte: 25/03/2023
Dirección	Calceta	Ing. Mario Bonilla Loor, PhD Jefe de los Laboratorios de la FCZ - LAB Autorizado y revisado
Teléfono	0982628371	
Muestra	Extractos vegetales	
Cantidad recibida	100 mL / muestra	
Objetivo del análisis	Realizar un análisis – funcional de extractos vegetales	

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Muestra	Bacteria	Concentración (%)	Actividad antimicrobiana (mm)			
			1	2	3	4
Llantén	Escherichia coli	50	0	0	0	0
		100	5	5	5	5
	Staphylococcus aureus	50	0	0	0	0
		100	6	6	5	6
Oreganón	Escherichia coli	50	5	5	5	5
		100	11	11	10	10
	Staphylococcus aureus	50	7	6	7	8
		100	12	13	14	13
Zorrilla	Escherichia coli	50	0	0	0	0
		100	5	5	5	5
	Staphylococcus aureus	50	6	5	5	5
		100	11	10	11	11

Método: Antibiograma/ Difusión en disco



FCZ-LAB

Investigamos para cambiar el sector Agropecuario

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE CIENCIAS ZOOTÉCNICAS
 EXTENSIÓN CHONE

Ciente	Washington Fernando Demera Lucas María Fernanda Intriago Alcivar	Fecha de recibido: 13/10/2022 Fecha de análisis: 13/10/2022 Fecha de reporte: 25/03/2023
Dirección	Calceta	Ing. Mario Bonilla Loor, PhD Jefe de los Laboratorios de la FCZ - LAB Autorizado y revisado
Teléfono	0982628371	
Muestra	Extractos vegetales	
Cantidad recibida	100 mL / muestra	
Objetivo del análisis	Realizar un análisis – funcional de extractos vegetales	

ENSAYO TOXICOLÓGICO

LLANTEN

Concentración (mg. L)	% de Inhibición del crecimiento bacteriano			
	1	2	3	4
2000	0,6087	2,2321	2,1106	1,8493
3000	5,9130	4,6131	5,7496	4,0340
4000	53,8261	56,2500	55,0218	56,6879
5000	64,6087	69,3452	67,6128	70,7006
6000	97,3043	96,0565	97,8166	97,6645
7000	98,6087	100,0000	99,9272	100,0000
DL₅₀	4194,1639	4109,2304	4145,0871	4081,0446



FCZ-LAB

Investigamos para cambiar el sector Agropecuario

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE CIENCIAS ZOOTÉCNICAS
 EXTENSIÓN CHONE

Cliente	Washington Fernando Demera Lucas María Fernanda Intriago Alcívar	Fecha de recibido: 13/10/2022 Fecha de análisis: 13/10/2022 Fecha de reporte: 25/03/2023
Dirección	Calceta	Ing. Mario Bonilla Loor, PhD Jefe de los Laboratorios de la FCZ - LAB Autorizado y revisado
Teléfono	0982628371	
Muestra	Extractos vegetales	
Cantidad recibida	100 mL / muestra	
Objetivo del análisis	Realizar un análisis – funcional de extractos vegetales	

OREGANÓN

Concentración (mg. L ⁻¹)	% de Inhibición del crecimiento bacteriano			
	1	2	3	4
2000	0,5389	1,4888	3,4711	1,8993
3000	35,7968	31,5136	38,1818	39,5541
4000	63,5874	64,6816	60,7438	60,9414
5000	86,4511	85,6907	85,6198	85,8794
6000	91,3780	90,4880	92,3967	92,7333
7000	98,6143	99,4210	96,8595	98,1007
DL₅₀	3453,9273	3529,3973	3451,01094	3411,4353



FCZ-LAB

Investigamos para cambiar el sector Agropecuario

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE CIENCIAS ZOOTÉCNICAS
 EXTENSIÓN CHONE

Cliente	Washington Fernando Demera Lucas María Fernanda Intriago Alcívar	Fecha de recibido: 13/10/2022 Fecha de análisis: 13/10/2022 Fecha de reporte: 25/03/2023
Dirección	Calceta	Ing. Mario Bonilla Loor, PhD Jefe de los Laboratorios de la FCZ - LAB Autorizado y revisado
Teléfono	0982628371	
Muestra	Extractos vegetales	
Cantidad recibida	100 mL / muestra	
Objetivo del análisis	Realizar un análisis – funcional de extractos vegetales	

ZORRILLA

Concentración (mg. L ⁻¹)	% de Inhibición del crecimiento bacteriano			
	1	2	3	4
2000	26,0769	27,1860	26,96705	23,25088
3000	35,0000	33,8633	29,79153	26,18021
4000	95,3846	94,6741	95,42703	93,8516
5000	96,0769	94,9921	97,17552	95,7597
6000	98,2308	95,7870	98,18426	96,9611
7000	98,4615	96,8203	98,65501	97,1025
DL₅₀	3233,5354	3244,2523	3378,9423	3408,52841