



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

“Evaluación del método y solvente de extracción más eficientes para la obtención de metabolitos secundarios responsables de una actividad antioxidante y antibacteriana de 9 plantas medicinales en la ciudad de Cuenca-Ecuador”

**Trabajo de titulación previo
a la obtención del título de
Bioquímico Farmacéutico**

AUTORAS:

Jessica Nube Cuesta Cárdenas
CI: 0302742523
jesycuesta@hotmail.com

Viviana Maricela Mogrovejo Nieves
CI: 0107162455
vivi.mogrovejo94@outlook.com

DIRECTOR:

Ing. David Enrique Vanegas Jácome
CI: 0104046057

ASESOR:

Dra. Nancy Miriam Cuzco Quizhpi
CI: 0301624854

Cuenca-Ecuador
04-03-2020



RESUMEN

El uso de las plantas medicinales en el tratamiento o prevención de enfermedades ha surgido desde tiempos ancestrales, se considera como una alternativa de la medicina farmacéutica, puede ser usada en combinación con la anterior, beneficiando a las personas que la utilizan. Se determinó el método y solvente de extracción más eficiente en la obtención de los metabolitos secundarios que poseen actividades antioxidantes y antibacterianas. Nueve plantas medicinales se seleccionaron mediante revisión bibliográfica y disponibilidad en el medio local. Los métodos extractivos que se utilizaron y analizaron fueron: percolación, maceración, homogenización, sonicación e infusión, los solventes evaluados: metanol 100% y una mezcla hidroalcohólica: metanol: agua 80:20. La actividad antioxidante se evaluó por medio de las técnicas de Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) y 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y la actividad antibacteriana por el método de microdilución en placa. Los resultados obtenidos por las técnicas DPPH y FRAP revelaron que el mejor método extractivo fue homogenización y el mejor solvente fue metanol 100%, se determinó que los extractos de *Borago officinalis* fueron los que presentaron una mayor capacidad antioxidante en comparación con las demás plantas en estudio.

En la actividad antibacteriana se determinó que los extractos metanólicos de *Otholobium mexicanum* obtenidos por los métodos de homogenización, sonicación y percolación presentaron una limitada actividad frente a *S. aureus*, en el caso de la maceración los extractos fueron inactivos, al igual que el resto de extractos de las 8 plantas restantes sin importar el método extractivo.

Palabras clave: Plantas medicinales. DPPH. FRAP. Microdilución. Extracción. Solventes.



ABSTRACT

The use of medicinal plants in the treatment or prevention of diseases has arisen since ancient times, it is considered as an alternative of pharmaceutical medicine, it can be used in combination with the previous one, benefiting the people who use it. The most efficient extraction method and solvent in obtaining secondary metabolites that have antioxidant and antibacterial activities was determined. Nine medicinal plants were selected by literature review and availability in the local environment. The extractive methods that were used and analyzed were: percolation, maceration, homogenization, sonication and infusion, the solvents evaluated: 100% methanol and a hydroalcoholic mixture: methanol: 80:20 water. The antioxidant activity was evaluated by the techniques of Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and the antibacterial activity by the microdilution plate method. The results obtained by the DPPH and FRAP techniques revealed that the best extractive method was homogenization and the best solvent was 100% methanol, it was determined that the extracts of *Borago officinalis* were those that presented a greater antioxidant capacity compared to the other plants under study .

In the antibacterial activity it was determined that the methanolic extracts of *Otholobium mexicanum* obtained by the methods of homogenization, sonication and percolation presented a limited activity against *S. aureus*, in the case of maceration the extracts were inactive, as well as the rest of the Extracts from the remaining 8 plants regardless of the extractive method.

Keywords: Medicinal plants. DPPH. FRAP. Microdilution. Extraction. Solvents



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	14
OBJETIVOS.....	15
CAPÍTULO I	16
ESTADO DEL ARTE	16
1.1 PLANTAS MEDICINALES.....	16
1.1.1 Antecedentes	16
1.1.2 Actividades atribuidas a las 9 plantas medicinales seleccionadas.	16
1.1.3 Clasificación y características de las plantas medicinales de estudio.	17
1.2 METABOLITOS SECUNDARIOS RESPONSABLES DE UNA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIBACTERIANA	22
1.2.1 Metabolitos secundarios con actividad antioxidante.....	23
1.2.2 Metabolitos secundarios con actividad antibacteriana.	27
1.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	29
1.3.1 Homogenización	29
1.3.2 Infusión.....	30
1.3.3 Sonicación o extracción asistida por ultrasonido:	30
1.3.4 Percolación.....	31
1.3.5 Maceración	31
1.4 SOLVENTES DE EXTRACCIÓN.....	32
1.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	32
1.5.1 Oxidación celular	32
1.5.2 Radicales libres.....	33
1.5.3 Sistema de defensa antioxidante.....	34
1.5.4 Métodos de determinación de la capacidad antioxidante	35
1.6 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	36
1.6.1 Antecedentes	36
1.6.2 Resistencia bacteriana	36
1.6.4 Metodología para evaluar la actividad antimicrobiana	39
CAPÍTULO II	41



MATERIALES.....	41
2.1 MATERIAL VEGETAL.....	41
2.2 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS (ALCOHÓLICOS, HIDROALCOHÓLICOS Y ACUOSOS)	41
2.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	42
2.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	43
MÉTODOS	44
3.1 OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	44
3.2 SOLVENTES Y MÉTODOS DE EXTRACCIÓN:	45
3.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	48
3.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA, TÉCNICA DE MICRONDILUCIÓN EN PLACA.	50
CAPÍTULO IV	53
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	53
4.1 ESTUDIO ESTADÍSTICO ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, TÉCNICA DEL RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZILO Y TÉCNICA FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER.....	53
4.2 ESTUDIO ESTADÍSTICO ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA TÉCNICA DE MICRONDILUCIÓN EN PLACA.	54
4.3 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, TÉCNICA DEL RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZILO (DPPH).....	55
4.4 RESUMEN DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES CON MAYOR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, TÉCNICA DEL RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZILO (DPPH).....	61
4.5 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, TÉCNICA FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER (FRAP).	63
4.6 RESUMEN DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES CON MAYOR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, TÉCNICA FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER (FRAP).	70
4.7 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA, TÉCNICA DE MICRONDILUCIÓN EN PLACA.	72
CAPÍTULO V.....	77
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	77
5.1 CONCLUSIONES	77
5.2 RECOMENDACIONES.....	77
BIBLIOGRAFÍA:	79



ANEXOS.....	87
Anexo 1. Materiales y Reactivos.....	87
Anexo 2. Imágenes: Preparación del material vegetal y extracción de metabolitos secundarios.....	94
Anexo 3. Imágenes: corrida de actividad antioxidante, técnicas DPPH y FRAP....	97
Anexo 4. Graficas: Curvas de calibración, técnicas DPPH y FRAP.....	99
Anexo 5. Tabla resumen: Atividad antioxidante, técnicas DPPH y FRAP.	103



Cláusula de Propiedad Intelectual

Viviana Maricela Mogrovejo Nieves, autora del trabajo de titulación "Evaluación del método y solvente de extracción más eficientes para la obtención de metabolitos secundarios responsables de una actividad antioxidante y antibacteriana de 9 plantas medicinales en la ciudad de Cuenca-Ecuador", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 04 de marzo del 2020

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Viviana Maricela Mogrovejo Nieves".

Viviana Maricela Mogrovejo Nieves

C.I: 0107162455



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

Viviana Maricela Mogrovejo Nieves en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación del método y solvente de extracción más eficientes para la obtención de metabolitos secundarios responsables de una actividad antioxidante y antibacteriana de 9 plantas medicinales en la ciudad de Cuenca-Ecuador", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 04 de marzo del 2020



Viviana Maricela Mogrovejo Nieves

C.I: 0107162455



Cláusula de Propiedad Intelectual

Jessica Nube Cuesta Cárdenas, autora del trabajo de titulación "Evaluación del método y solvente de extracción más eficientes para la obtención de metabolitos secundarios responsables de una actividad antioxidante y antibacteriana de 9 plantas medicinales en la ciudad de Cuenca-Ecuador", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 04 de marzo del 2020

Jessica Nube Cuesta Cárdenas

C.I: 0302742523



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

Jessica Nube Cuesta Cárdenas en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación del método y solvente de extracción más eficientes para la obtención de metabolitos secundarios responsables de una actividad antioxidante y antibacteriana de 9 plantas medicinales en la ciudad de Cuenca-Ecuador, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 04 de marzo del 2020

Jessica Nube Cuesta Cárdenas

C.I: 0302742523



DEDICATORIA

JESSICA NUBE CUESTA

A Dios por la vida, por darme la capacidad, la sabiduría y la fortaleza para superar cada obstáculo y/o dificultad que se nos presentó durante la elaboración de este proyecto.

A mi hijo Jhoan, mi motor de vida, mi motivo para superarme cada día y ser una mejor persona.

A mi esposo Mauricio, por el apoyo incondicional brindado, por todo el amor, compresión y por acompañarme durante todo este arduo camino, gracias mi vida por todo el esfuerzo y sacrificio realizado.

A mis padres, suegros, familiares y amigas quienes de una u otra manera me supieron apoyar y ayudar para que culminara una etapa más en mi vida, gracias por todas sus palabras de aliento, gracias por no permitir que me dé por vencida.



VIVIANA MARICELA MOGROVEJO

Mi trabajo de titulación está dedicado a Dios,

Gracias a él por las características que con su infinita misericordia puso en mí al momento de concederme la vida.

A mis padres,

José Manuel y Elsa Yolanda por brindarme apoyo económico en todo el proceso de mi formación profesional, y nuevamente a ellos por impulsarme en cierta forma a buscar el éxito y superación, por ello un profundo sentimiento de gratitud.

A mis hermanos,

Alex, José y Kevin por su apoyo moral, a ellos por su amor y confianza, por sus ocurrencias y palabras motivacionales que en varias ocasiones lograron levantarme y/o mantenerme en pie en los momentos más difíciles de la vida.



AGRADECIMIENTOS

¡Después de este largo camino al fin podemos decir lo logramos!

La subida de este escalón más se lo debemos en primer lugar a Dios el dador de vida, gracias a él por llenarnos de fortaleza, fe, esperanza y sabiduría a lo largo este camino, no sólo en el desarrollo del presente trabajo de titulación sino a lo largo de nuestra carrera, inmensas gracias a él.

El apoyo moral y económico se lo debemos a nuestra familia, quienes nos ayudaron a superar con optimismo cada uno de los obstáculos que se presentaban.

Un sincero agradecimiento a nuestro tutor, estimado Ing. David Vanegas por su apoyo académico, imposible olvidar el tiempo y conocimientos que nos fueron compartidos con mucha amabilidad y con un entusiasmo sumamente contagioso.

Expresamos infinitas gracias a nuestros guías directos BQF. Fernando Huiracocha y BQF. Andrea Abril, quienes además de su conocimiento, supieron mostrarnos su apoyo, paciencia y empeño para que podamos finalizar con éxito el presente.

Un especial agradecimiento para la Dra. Lourdes Jerves, quien en modo de Directora del Proyecto de Plantas Medicinales supo darnos apertura de los laboratorios de Fitoquímica y Microbiología para el desarrollo de la parte práctica de nuestro trabajo de titulación.

Además, agradecemos a la Dra. Nancy Cuzco y Dra. Raffaella Ansaloni por regalarnos parte de su valioso tiempo en la resolución de las inquietudes presentadas.



INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo de investigación se seleccionaron 9 plantas medicinales a las cuales bibliográfica y culturalmente se les atribuyen diversas propiedades medicinales, entre otras, del tipo: antioxidante y antibacteriana. Dichas actividades se deben a la presencia de metabolitos secundarios capaces de desempeñar tales actividades.

León (2014) menciona que, en países en proceso de desarrollo muchas personas satisfacen sus necesidades sanitarias con plantas medicinales; probablemente el desconocimiento hace que el uso medicinal de plantas se limite notablemente, sin saber que las mismas podrían brindar múltiples beneficios actuando como antibacterianos o antioxidantes. En tal caso, el presente estudio representa un aporte de información para futuras investigaciones que se enfoquen en formas de tratamiento de medicina alternativa, ya que los extractos de plantas medicinales podrían representar una opción de uso a nivel clínico sin efecto placebo, sino a través de una actividad evidenciable (Departament of Health and Human Services, 2007).

Las diversas enfermedades ocasionadas por diversos agentes patógenos han creado la necesidad de búsqueda de nuevas alternativas para tratamientos contra patógenos resistentes, con una tendencia de volver a las costumbres ancestrales en el uso de plantas para el tratamiento paliativo y la cura de enfermedades, debido a las múltiples ventajas que aportan tanto en el aspecto medicinal como en el económico (Aspajo & Enrique, 2016). Actualmente en la medicina tradicional se utilizan algunos extractos de plantas medicinales para combatir infecciones intestinales, respiratorias y otros cuadros clínicos (León, 2014).

Por otro lado, Castañeda, Ramos, & Ibáñez (2008) manifiestan que la oxidación de moléculas biológicas, membranas y tejidos es inducido por especies reactivas de oxígeno (EROS), las mismas que causan destrucción de las paredes celulares, inactivación de enzimas, alteración del sistema inmunológico y daño del material genético asociándose a la patogénesis de muchas enfermedades tales como la ateroesclerosis, artritis, demencia, y cáncer.

Por tal razón, el uso de antioxidantes actualmente es indicado en el tratamiento de accidentes cerebrovasculares y enfermedades neurodegenerativas; la actividad antioxidante se ha relacionado con plantas medicinales que presentan metabolitos



secundarios capaces de atrapar radicales libres, mejorando la defensa antioxidante y previniendo daños celulares.

En ensayos previos realizados en el laboratorio de Fitoquímica del Proyecto de Plantas Medicinales del Departamento de Biociencias de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca se observó que, variaciones en las condiciones de obtención de extractos de 3 plantas medicinales influyen en los perfiles cromatográficos y los valores de capacidad antioxidante mediante ensayos rápidos de capacidad de captación de radicales libres (datos no publicados).

Dadas estas observaciones, surgió la necesidad de obtener un máximo aprovechamiento de los beneficios y particularidades de cada planta medicinal seleccionada, por ello en el presente trabajo de investigación se evaluó el solvente y método de extracción capaces de obtener un gran rendimiento de las actividades antioxidante y antibacteriana de cada una de ellas.

OBJETIVOS.

Objetivo General: Evaluar el método y solvente de extracción más eficientes para la obtención de metabolitos secundarios responsables de una actividad antioxidante y antibacteriana de 9 plantas medicinales en la ciudad de Cuenca-Ecuador.

Objetivos específicos:

- Evaluar el método extractivo de mayor eficiencia en la obtención de metabolitos secundarios.
- Determinar la condición de solventes de extracción que permita una mayor tasa de recuperación de metabolitos secundarios responsables de una actividad antioxidante y antibacteriana.
- Determinar la actividad antioxidante y antibacteriana de los extractos obtenidos.



CAPÍTULO I

ESTADO DEL ARTE

1.1 PLANTAS MEDICINALES

1.1.1 Antecedentes

A lo largo de la historia las plantas medicinales han formado parte importante de las culturas indígenas como base de su primera medicina. En Ecuador se estima que el 80 % de la población depende de las plantas o productos naturales para la atención primaria de salud y bienestar (Aspajo & Enrique, 2016). Por otro lado, numerosos compuestos puros de plantas medicinales obtenidos gracias a investigaciones científicas han probado ser útiles para la medicina moderna, mencionando también que los productos naturales de uso actual provienen de plantas medicinales usadas tradicionalmente (León, 2014)

1.1.2 Actividades atribuidas a las 9 plantas medicinales seleccionadas.

Jerves et.al (2014) mencionan que el extracto metanólico de *Otholobium mexicanum* (trinitaria) presenta una buena actividad antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus*; a su vez extractos alcohólicos de hojas de: *Urtica urens* (ortiga), *Tagetes terniflora* (chil chil), *Chenopodium ambrosioides* (paico) y *Malva officinalis* (malva blanca) demostraron ser moderadamente activos frente a cepas del mismo microorganismo. (Aspajo & Enrique, 2016; Abdala & Baigorí 2003). Según Arévalo & Chumbe (2016) el *Plantago major* (llantén) presenta una notable actividad antibacteriana frente a *S. aureus*; un estudio realizado por Espadero (2018) demostró que el extracto metanólico de *Taraxacum officinale* (diente de león) presenta una actividad antioxidante comparable con la N-acetil cisteína, (antioxidante utilizado en la industria farmacéutica); también estableció que la infusión de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) presenta una actividad antioxidante relativamente baja, dicho estudio comparó diversos métodos y solventes. Benítez, Astudillo, D, Echeverría, Jaramillo & Matute (2016) mencionan en su estudio que una maceración alcohólica de *Borago officinalis* (borraja) presenta una actividad antioxidante de un 96.3 % de acuerdo con el porcentaje de captación de radicales libres por el método 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).



1.1.3 Clasificación y características de las plantas medicinales de estudio.

1.1.3.1 Trinitaria

Familia: FABACEAE

Género: *Otholobium*

Especie: *O. mexicanum*

Nombres comunes: Alpa trinitaria, culén, trinitaria blanca

Características y componentes: Arbusto perenne de tres metros de altura, hojas compuestas trifoliadas, peciolos cortos, foliolos de forma lanceolada, borde entero y ápice acuminado, flores color violeta agrupadas en especies terminales. Los metabolitos secundarios más importantes de *Otholobium mexicanum* comprenden: taninos, furocumarinas (psoraleno), terpenoides, el mono terpeno fenólico más abundante es el bakuchiol (León, 2014 & Zamora, 2019).

Usos medicinales: La infusión de las hojas se utilizan para tratar la diarrea, acidez estomacal, indigestión o empachos, flatulencias e infecciones intestinales; otras propiedades que se le atribuyen son: antidiabética, astringente, emenagoga (Zamora, 2019).

1.1.3.2 Diente de león

Familia: ASTERACEAE

Género *Taraxacum*

Especie: *T. officinale*

Nombres comunes: Achicoria amarga, taraxacón

Características y componentes: Planta anual, perenne de hojas lanceoladas con nervadura central, pinnatipartidas de márgenes dentados y agudos, flores dispuestas en capítulos solitarios formadas por diminutas flores liguladas de color amarillo. Dentro de su composición química las hojas poseen: lactonas sesquiterpénicas, flavonoides (apigenina, luteolina), hidroxicumarinas (cichorina, esculina), ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico, potasio y otros minerales, vitamina A, E, C, D, K (Muñoz, 2014)



Usos medicinales: En infusión las hojas del diente de león ayudan a reducir el colesterol y ácido úrico. Usado como diurético y hepatoprotector porque aumenta la producción y eliminación de la bilis, se considera laxante suave y es capaz de mejorar ulceras estomacales (Asqui, 2012).

1.1.3.3 Borraja

Familia: BORAGINACEAE

Género: *Borago*

Especie *B. officinalis*

Nombres comunes: Borago, lengua de buey

Características y componentes: Planta anual densamente cubierta por pelos ásperos, hojas lanceoladas, rugosas, nervaduras muy gruesas de 4,5 a 10 cm de longitud y de 1,5 a 5 cm de ancho, flores azules de forma estrellada agrupadas en inflorescencias. Su composición química consiste en: mucílagos, terpenos, taninos, flavonoides (querctol y kaempferol), potasio, una fitohormona similar a las prostaglandinas, ácidos orgánicos (alantoína, azúcares y aceites esenciales) (Jitala, 2017).

Usos medicinales: Combate la fiebre, aumenta la excreción de sudor, diurético, calmante de la tos. Es utilizada como infusión en combinación con otras plantas medicinales para cuadros gripales e infecciones respiratorias, antiinflamatorio de vías urinarias y depurativo (Jitala, 2017)

1.1.3.4 Manzanilla

Familia: ASTERACEAE

Género: *Matricaria*

Especie: *M. chamomilla*

Nombres comunes: Manzanilla de castilla

Características y componentes: Posee un tallo erecto, redondeado de aproximadamente 60 cm y ramificado con hojas bipinnatífidas en pequeña cantidad,



sus cabezuelas florales poseen centros huecos, cónicos y amarillos, rodeadas por un círculo de florecillas blancas inclinadas de dentro hacia fuera. Su composición química consiste en aceite esencial proveniente de la cabezuela de la planta (rico en sesquiterpenos y lactonas sesquiterpénicas) posee además taninos, ácidos fenólicos, ácido ascórbico, flavonoides (luteolol, apigenol, querctol, petuletina y rutina) (Arreaza, 2016).

Usos medicinales: Se utiliza como tónico estomacal con acción carminativa, antimicrobiana y antiinflamatoria, la infusión se utiliza como antidiarreica en lactantes, la decocción de las inflorescencias posee actividad diaforética y emenagoga (Arreaza, 2016).

1.1.3.5 Ortiga

Familia: URTICACEAE

Género: *Urtica*

Especie *U. urens*

Nombres comunes: Ortiga menor, ortiga negra

Características y componentes: Crece en suelos húmedos, planta de tallo erguido cuadrangular, ramificado recubierto de pelos urticantes, hojas ovaladas, rugosas fuertemente aserradas, verde oscuras y con pelos urticantes, flores verde amarilloosas colgantes de hasta 10 cm. Su composición química abarca ácidos fenólicos como el ácido cafeico, clorogénico, neoclorogénico, ferúlico, carotenoides (betacaroteno), su contenido en flavonoides oscila entre el 0,7 al 1,8 % y son principalmente: rutina, isoquerцитrina, kaempferol, querctina, isoramnetina, astragalina y ramnetol, sus hojas además poseen ácidos orgánicos como (butírico, acético, fórmico, cítrico, fumárico), sales minerales, taninos, esteroles (sitosterol), provitamina A, B, C y K (Borbor, 2015).

Usos medicinales: Posee actividad anticonceptiva, su actividad diurética se aprovecha para contrarrestar dolores de gota, favorece la circulación al reducir los niveles de colesterol y levemente los niveles de azúcar en la sangre. La infusión de las hojas se usa como anti anémica y laxante suave porque estimula la motilidad del estómago y vesícula biliar. Combate afecciones de la piel como acné, forúnculos, eczemas, erupciones y úlceras cutáneas (Bejar, 2018).



1.1.3.6 Paico

Familia: CHENOPODIACEAE

Género: *Chenopodium*

Especie: *C. ambrosioides*

Nombres comunes: Pazote, epazote, hierba de Santa María

Características y componentes: Planta perenne de tallo pubescente con una altura máxima de 1 m, hojas lanceoladas con bordes serrados entre 1.7 y 7 cm de longitud y 0,5 a 2,5 cm de ancho, posee flores verdes pequeñas en panículas terminales con 5 sépalos cada uno. El componente activo de mayor responsabilidad de las propiedades de la planta es el ascardiol, que en el aceite esencial está presente en un 90 %, posee además otros 4 monoterpenos hidroxiperoxidados y pequeñas proporciones de ácidos fenólicos (estrágol, timol y carvacrol) (Charpentier, 2013).

Usos medicinales: Excelente reconstituyente estomacal tras indigestiones y demás afecciones intestinales a causa de debilidad, en infusión se utiliza para los resfriados, cólicos, diarreas, combate los helmintos y mejora la anemia ocasionada por estos (Coy, Hernández, & López, 2006).

1.1.3.7 Malva blanca

Familia: MALVACEAE

Género: *Malva*

Especie: *M. officinalis*

Nombres comunes: Malva blanca, malva común.

Características y componentes: Planta de aproximadamente 2m de altura, raíz profunda y tallo grueso, hojas verde oscuras en forma de palma de mano y con bordes ondeados, las flores son blancas con 5 pétalos hendidos y soldados por la base (Quilo, 2013). Contiene taninos, flavonoides; principalmente antocianinas, destacándose la malvidina, contiene una importante cantidad de mucílagos, vitamina A, B, C y pequeñas cantidades de vitamina E (Cholota, 2011).



Usos medicinales: Inflamación intestinal, renal, genital, complicaciones urinarias oliguria, cistitis, úlceras gastroduodenales, aftas bucales, heridas, abscesos, forúnculos, conjuntivitis, posee actividad expectorante y se usa para combatir resfriados (Cholota, 2011).

1.1.3.8 Llantén

Familia: PLANTAGINACEAE

Género: *Plantago*

Especie: *P. major*

Nombres comunes: Llantén de agua, llantén hembra

Características y componentes: Planta perenne de 50 cm de altura, hojas aovadas pecioladas de bordes continuos con 3 a 5 nervaduras prominentes, lámina de color verde claro, glabra y algo suculenta, las flores son regulares agrupadas en espigas alargadas cilíndricas de 30 cm. de largo, el fruto es una cápsula ovoide de 3 mm de largo dehiscente transversalmente (Coy et al., 2006).

Posee flavonoides con excelente actividad antioxidante (luteolina y noscapina), contiene ácido ursólico, cafeico y clorogénico, ácido salicílico, una gran cantidad de potasio, sustancias azucaradas, fibra y vitamina C (Cholota, 2011).

Usos medicinales: Se usa como desinfectante de heridas, favorecedor de la coagulación externa e internamente, promueve la regeneración de la piel, acelerando la cicatrización. La infusión es aprovechada para tratar afecciones de las vías respiratorias ya que posee propiedades antiinflamatorias, antibacterianas y expectorante suave (Cholota, 2011). Coy et al. (2006) mencionan que la decocción de sus hojas combate gastritis crónica, úlceras intestinales y cáncer.

1.1.3.9 Chil chil

Familia: ASTERACEA

Género: *Tagetes*

Especie: *T. terniflora*



Nombres comunes: Caléndula de limón

Características y componentes: Planta herbácea anual de tallos estriados y hojas pinadas, la flor es una cabezuela solitaria, inflorescencia que a su vez contiene ocho flores individuales de forma ligular en la periferia del disco floral; esta inflorescencia diferencia a *T. terniflora* de las demás especies (Quiñones, Qui-Zapata, Rincón & Serrato, 2012).

Su composición química de importancia biológica son los carotenoides luteína y zeaxantina (88 y 92 %) presentes en su mayoría en las flores, además de monoterpenos como el geraniol, limoneno, linalol, mentol, ocimeno, beta-felandreno, dipenteno, alfa y beta-pineno y tagetona y los flavonoides comferitrín, camferol (Solorzano, 2011).

Usos medicinales: La infusión es usada para enfriamientos y enfermedades respiratorias, las hojas cocidas se usan para los cólicos y meteorismo, machacadas con agua o vino poseen actividad diurética, diaforética y se utilizan para contrarrestar el vómito, fiebre y edema (Castro Ramírez, 1994).

Según Rincón et al. (2012) la presencia de carotenoides en *Tagetes* spp es capaz de inhibir el crecimiento de células cancerosas de colon, también afirma que se tiene información empírica de que *Tagetes terniflora* controla enfermedades respiratorias de origen bacteriano.

1.2 METABOLITOS SECUNDARIOS RESPONSABLES DE UNA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIBACTERIANA

Las plantas son capaces de producir metabolitos secundarios, estos son compuestos químicos que cumplen funciones esenciales en la adaptación vegetal y la defensa contra la acción de factores bióticos como hongos, virus y bacterias, además de mecanismo de atracción o defensa contra insectos, otras plagas y depredadores herbívoros (Gaona, Sánchez & Vélez 2014).

Los metabolitos secundarios proceden de la biosíntesis del metabolismo primario, generalmente se presentan en el citoplasma de las células vegetales y poseen actividades analgésicas, antibacterianas, antioxidantes, antivirales, fungicidas, anti hepatotóxico, entre otras; sin embargo, la presencia o ausencia de dichas actividades



dependerá en gran medida del tipo de planta y el tipo de metabolito secundario (Hernández & et al 2018).

1.2.1 Metabolitos secundarios con actividad antioxidante.

Son considerados metabolitos de actividad antioxidante las sustancias fenólicas y sus derivados, los flavonoides, taninos y cumarinas, debido a la capacidad que tienen estos compuestos de atrapar o inhibir la producción de radicales libres. Otros compuestos presentes de manera natural, que desempeñan dicha actividad son los carotenoides y compuestos nitrogenados como los alcaloides, aminoácidos y aminas (Bravo, 2018; National, Pulvento, Troisi, Vega 2014).

1.2.1.1 Compuestos fenólicos.

Los fenoles o también conocidos como polifenoles, son compuestos que poseen una estructura aromática con uno o más grupos hidroxilo, libres o sustituidos y presentan en su estructura molecular uno o varios anillos fenólicos. Estos metabolitos secundarios cumplen funciones fisiológicas indispensables tanto en el crecimiento o desarrollo vegetal, así como en su defensa contra la acción de depredadores, algunos son compuestos protectores que absorben la radiación ultravioleta (Sierra, 2018).

Las plantas necesitan captar la radiación solar para la fotosíntesis pues su exposición a la radiación ultravioleta (UV-B) es inevitable, estas desarrollan mecanismos para proteger y reparar los posibles daños causados por UV-B a pesar de que raramente muestran signos de daño en ambientes naturales. Los efectos que produce la radiación en las plantas son evidenciados como cambios fisiológicos y modificaciones en el desarrollo. La exposición a altos niveles de radiación UV puede provocar daños en el ADN, proteínas, lípidos o inhibir reacciones de fotosíntesis, además de producir radicales libres (especies reactivas de oxígeno ROS) que generan daños oxidativos a diferentes macromoléculas; las plantas para protegerse frente a los ROS poseen un sistema de defensa antioxidante que involucra mecanismos enzimáticos (por acción de enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT), peroxidasa (POX) y glutatióen reducida (GR)) como no enzimáticos. Esta radiación tiende a estimular la biosíntesis de metabolitos secundarios especialmente los compuestos fenólicos los cuales absorben la radiación ultravioleta que se acumulan en las vacuolas de las células epidérmicas. Así también los



flavonoles junto con algunos compuestos fenólicos protegen a las plantas mediante la absorción de UV lo que limita su penetración en los tejidos de las hojas (Berli, 2011).

Algunos compuestos fenólicos ejercen una función de señalización celular en condiciones de estrés abiótico, estabilizan las membranas celulares, otros interactúan con fosfolípidos o actúan reduciendo los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) en los cloroplastos, lo cual permite mantener tanto la estructura y función de las membranas tilacoidales (Jorda, 2017).

En la actualidad el estudio de los fenoles es de gran interés debido a sus propiedades antioxidantes, antibacterianas, antidiarreicas y sus posibles beneficios en el tratamiento y prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades inflamatorias. Los polifenoles vegetales comprenden además las quinonas fenólicas, cumarinas, flavonoides, ligninas y taninos (Sierra, 2018).

Offarm (2004) considera a los ortodifenoles buenos antioxidantes, además menciona que el hidroxitiroсол o la aleuropeína tienen la capacidad de captar radicales libres, por otro lado indica que la capacidad antioxidante de los monofenoles como el tiroсол es más baja que los anteriores. En el catecol y pirogallo la actividad antibacteriana se relaciona con el número de grupos hidroxilos que poseen.

1.2.1.1.1 Fenoles y su capacidad antioxidante.

Cantero (2009) menciona que el mecanismo de acción antioxidante de los fenoles es diverso, además que cada fenol puede actuar por uno o más mecanismos dependiendo de las características que posean cada uno de ellos. Entre los mecanismos mencionados están:

- Los fenoles al combinarse con los radicales hidróxilo previenen la iniciación de la cadena de reacciones de oxidación.
- Los alcoholes fenólicos pueden descomponer los peróxidos y convertirlos en especies no radicales.
- Los fenoles actúan como secuestradores de radicales libres. Dichos radicales actúan sobre el colesterol, ácidos grasos poliinsaturados, ADN y lípidos, siendo estos últimos los más susceptibles a la sustracción de un electrón por parte del radical. Los antioxidantes actúan como fuentes de hidrógeno y se oxidan en



lugar de los componentes antes mencionados, de esta manera protege a las células del daño que causan los radicales libres.

- Al unirse de manera indirecta con agentes quelantes de iones de metales de transición, reducen la capacidad de estos para producir radicales libres mediante reacciones de Fenton.
- Por la solubilidad que poseen, los polifenoles se pueden localizar en la superficie de las estructuras celulares, disminuyendo de esta manera el consumo de antioxidantes propias de estas.

1.2.1.2 Taninos

Los taninos son polímeros polifenólicos considerados como agentes antioxidantes, antimicrobianos y astringentes, tienen la capacidad de formar complejos con las proteínas y en ciertas ocasiones con iones metal, aminoácidos y polisacáridos. Los taninos se caracterizan por ser solubles en agua, alcohol y acetona, insolubles en disolventes orgánicos apolares y posee peso molecular alto. En las plantas los taninos están presentes en las vacuolas celulares, en combinación con alcaloides y proteínas (Gaona & et al., 2014).

1.2.1.3 Cumarinas

Son compuestos fenólicos simples, derivadas de benzo 2-pirona o benzo α-pirona, poseen un anillo aromático unido a un heterociclo oxígeno, se les considera compuestos fenólicos, cuando el grupo hidroxilo se une al esqueleto de estructura cumarina. Interviene en defensa contra ciertos microorganismos e insectos herbívoros, además actúan como inhibidores de germinación, son consideradas moléculas con actividad antimicrobiana (Bravo, 2018). El mecanismo antimicrobiano se da por la interacción con el ADN eucariote (Liscano & et.al, 2008).

Dentro de las cumarinas, la umbeliferona posee una considerable actividad antioxidante, así como propiedades antibacterianas (Peñarrieta, 2014).

1.2.1.4 Flavonoides

Los flavonoides son de naturaleza fenólica, contienen 15 átomos de carbono, poseen dos anillos aromáticos bencénicos conectados entre sí por un puente de tres carbonos. Los flavonoides contienen al menos 3 hidroxilos que están combinados con azúcares



en forma de glucósidos, se encuentran en concentraciones altas en la epidermis de las hojas de plantas medicinales y cáscaras de las frutas (Gaona & et al, 2014).

Martínez (2002) y Quispillo (2013) mencionan que la actividad antioxidante de los flavonoides se debe a que actúan retirando el oxígeno reactivo en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos, bloqueando de esta manera la acción tóxica de dichas sustancias sobre las células, evitando el desarrollo de enfermedades y promoviendo la estimulación del sistema inmune; Gaona & et al (2014) establecen que dicha capacidad se debe a sus propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición.

Por otro lado, Bravo (2018) establece que los flavonoides son capaces de inhibir enzimas tanto hidrolíticas como oxidativas, y que además poseen propiedades antibacterianas y antiinflamatorias.

Martin (2017) clasifica a los flavonoides como antocianinas, antocianidinas, flavonas (apigenol, luteolina, apigenina), esta última capaz de destruir radicales libres, isoflavonoides (fitoalexinas) y flavonoles (kaempferol, quer cetina, isorramnetina y miricetina), también menciona a las chalconas, que poseen actividades antifúngicas, antitumorales y antiinflamatorias; clasifica al rosmaridifenol como derivado diterpénico caracterizado por presentar grupos fenólicos los cuales seguramente le atribuyen tal actividad.

Martínez (2014) menciona que las flavononas no presentan actividad antioxidante significativa debido a que no existe sustitución por parte del grupo hidroxi en el carbono 3.

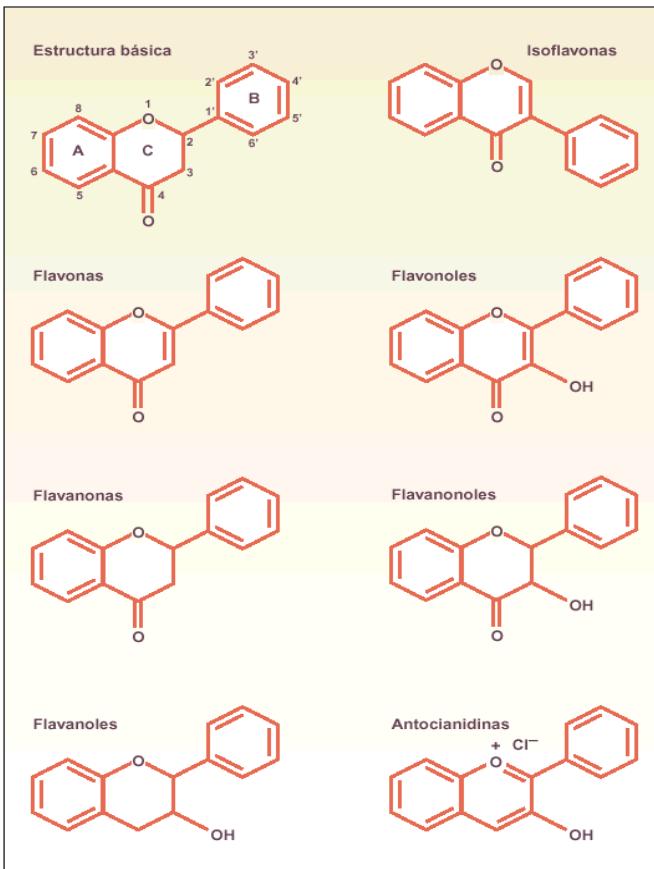


Imagen 1. Estructura química básica de los Flavonoides y su clasificación. Fuente:
(Álvarez, 2003)

1.2.2 Metabolitos secundarios con actividad antibacteriana.

Según Troisi, Pulvento, National, & Vega-Galvez (2014) los metabolitos secundarios que exhiben una actividad antibacteriana son los terpenos, dentro de este grupo se encuentran hormonas, pigmentos y aceites esenciales.

Cartaya (2001) menciona que, dentro de los compuestos fenólicos, las flavonas se caracterizan por poseer actividad antimicrobiana y establece que las flavonas de cítricos presentan una actividad antibacteriana elevada frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

1.2.2.1 Fenoles y su capacidad antibacteriana.

Los compuestos fenólicos poseen una actividad antibacteriana y antifúngica que se relaciona con la capacidad para inhibir el crecimiento, reproducción, respiración y otras funciones vitales de los microorganismos. Dichas acciones se dan por mecanismos



como la oxidación de enzimas específicas, la unión a las cadenas de ADN que interrumpen la reproducción o la síntesis de proteínas y otros elementos vitales para los microorganismos (Gordo, 2018). Doss & et al. (2009) menciona que los polifenoles producen una apoptosis celular mediante la ruptura de membranas celulares de algunos microorganismos.

1.2.2.2 Terpenos:

Los terpenos o isoprenoides son compuestos insolubles en agua, son productos volátiles, derivados de las unidades de isopreno (hidrocarburo de 5 átomos de carbono), la combinación de dos unidades combinadas de isopreno conforma la unidad de terpeno (Cambizaca, 2015).

La clasificación de los terpenos se puede evidenciar en la siguiente tabla:

Tabla 1. Clasificación de terpenos según sus unidades de isopreno. **Fuente:** (Bravo, 2018)

Nombre	Número de Carbonos	Unidades de isopreno (C5)	Ejemplos
Monoterpenos	10 C	2	Aceites esenciales, resinas y geraniol.
Sesquiterpenos	15 C	3	Aceites esenciales
Diterpenos	20 C	4	Fitol y Giberilinas
Triterpenos	30 C	6	Esteroides y saponinas
Tetraterpenos	40 C	8	Carotenoides

Entre los metabolitos primarios de los terpenos están las hormonas (giberelinas, ácido abscísico y citoquininas), carotenoides (ubiquinona y plastoquinona), dichos compuestos desempeñan acciones importantes en las plantas como acarreadores de electrones, esteroles (importante en la estructura de membranas). Los terpenos son los metabolitos secundarios que aportan características organolépticas a las plantas (aroma y sabor) además, constituyen la mayor parte de aceites esenciales. Las funciones farmacológicas que desempeñan los terpenos son antitumorales,



insecticidas, antibióticos, analgésicos, antibacterianos, antihepatotóxicos y antioxidantes (Pérez, 2009).

El geraniol es un monoterpeno acíclico denominado iridoides, posee gran actividad antimicrobiana, además se le ha atribuido propiedades antitumorales y antivirales (Espadero, 2018). El rosmarinifeno, derivado diterpénico, posee grupos fenólicos, y de acuerdo con la Farmacopea Americana también se caracteriza por poseer una actividad antioxidante (Martin, 2017).

1.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.

Según la Farmacopea Americana, (USP) United States Pharmacopeia (2007) el proceso de extracción implica la separación de los componentes deseados del material vegetal con la ayuda de solventes acuosos, alcohólicos, hidroalcohólicos y otros solventes adecuados.

Castro (2016) afirma que en los métodos extractivos el rendimiento cualitativo y cuantitativo de la extracción depende en gran medida de la polaridad del solvente utilizado, la composición química de los compuestos a extraer, la cantidad, la posición de los grupos funcionales, el tamaño molecular, la proporción de solvente, la temperatura, el tiempo de contacto, el tamaño de partícula y la relación masa-solvente.

Los métodos de extracción varían según la naturaleza del solvente y, las características y calidad de materia prima. Estos procesos extractivos se clasifican en dos grupos:

- Proceso cuyo resultado es un equilibrio de concentración entre el soluto y el residuo, cuyos ejemplos son la homogenización, infusión, sonicación, maceración.
- Procesos que agotan completamente la droga como es la percolación y la extracción en contracorriente.

1.3.1 Homogenización

Con este método se consigue reducir el tamaño de las partículas dentro de un líquido, permitiendo su homogeneidad y estabilidad, con ello se logra acelerar la liberación de compuestos bioactivos, debido a que se produce un cizallamiento mecánico de alta velocidad por un lapso de 1 a 5 minutos, tiempo que proporciona al homogeneizador



una alta eficiencia de pulverización, en donde no existe efectos indeseables del calor y la presión. Además, el homogenizado proporciona una mezcla completa de la matriz y brinda la mayor oportunidad para que los metabolitos pasen al solvente (Xinran Li & et.al, 2016).

1.3.2 Infusión

Es el proceso en cual se somete a la droga previamente humectada al contacto con el solvente a una temperatura igual a la de ebullición del agua por 15 minutos. Con la infusión se logra extraer una gran cantidad de sustancias activas, la alteración en su estructura química es pequeña y, además se logra conservar al máximo sus propiedades medicinales. Durante la infusión, el solvente de extracción se retira del fuego y se vierte sobre las partes de la planta para evitar la concentración de las partículas, mientras que el tapado y reposo en la infusión permite que se disuelvan todos los principios activos. Las sustancias extraídas por este método son generalmente sustancias hidrosolubles (Linares, 2013).

1.3.3 Sonicación o extracción asistida por ultrasonido:

Es un método que permite la extracción de los compuestos bioactivos del material vegetal, en la sonicación las partículas del medio ya sea sólidos y/o líquidas, vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, permitiendo la difusión rápida del soluto desde la fase sólida al disolvente, la droga se somete a ondas ultrasónicas que generan burbujas microscópicas, el hundimiento y ruptura hacia adentro de las burbujas de cavitación producen micro turbulencias y colisiones entre partículas a grandes velocidades, acelerando así la difusión interna, estas se expanden y colapsan contra las células vegetales causando la ruptura de la membrana, se expanden los poros de la pared celular y mejora la difusión y la transferencia de masa a través de las membranas. La ruptura de las membranas incrementa la permeabilidad del tejido de las plantas facilitando de esta forma la entrada del disolvente a las áreas inertes del material vegetal y la reducción del tamaño de las partículas, favorece la hidratación de la matriz vegetal, debido al espacio limitado que existe entre partículas, el colapso de las burbujas se da de forma asimétrica durante la expansión lo que produce grandes turbulencias y aumento de la circulación de la corriente líquida (Rodríguez, 2014 & Barrera, 2015).



1.3.4 Percolación

Según la Farmacopea Americana (USP 2007) la percolación es un método que consiste en que el menstruo (generalmente alcohólico o mezcla hidroalcohólica) atraviesa la droga triturada en un solo sentido, alcanzando concentraciones crecientes, hasta la extracción exhaustiva de la droga (se obtiene hasta aproximadamente el 95% de los metabolitos secundarios). Este tipo de extracción se realiza en aparatos llamados percoladores. Sharapin (2000) menciona que los factores a tomarse en cuenta al aplicar el método de percolación están el tiempo que la droga este contacto con el solvente y la relación entre la droga y el líquido de extracción. Además, se debe considerar la humectación de la droga, porque facilita el paso del solvente y aumenta el contacto entre droga y solvente y no permite la formación de falsas vías, que podrían perjudicar la eficacia de la extracción. Es importante realizar la humectación fuera del cuerpo del percolador, porque puede existir un hincharimiento exceso de la droga con el solvente, principalmente acuoso, pegándose en las paredes del percolador, dificultando el paso del solvente. El alto consumo del solvente es considerado como la principal desventaja de la percolación.

1.3.5 Maceración

Método que implica el contacto de la droga y el solvente con agitación ocasional (una a tres veces por día, aproximadamente), durante varios días, la Farmacopea Americana (USP 2007) prescriben tiempos que oscilan entre cuatro y diez días. Además, se debe proteger de la luz para evitar posibles reacciones que interfieran en procesos posteriores. Es un proceso que genera un equilibrio de concentración entre la droga y solvente, dicho equilibrio está en función del tamaño de partículas, del grado de hincharimiento de las células vegetal y propiedades del solvente (viscosidad y polaridad). Existen factores indispensables a tomarse en cuenta en el momento de la aplicación de este método, entre ellos están los ligados a la droga son la naturaleza de la planta, el contenido de humedad y el tamaño de partícula, y factores relacionados con el solvente como ejemplo la selectividad y la cantidad. Es importante realizar la humectación del material vegetal previa a la aplicación del método, debido a que el hincharimiento de la droga produce un aumento en la permeabilidad de la pared celular y la difusión del solvente, obteniendo un mejor proceso de extracción (Sharapin, 2000 & Barrera, 2015).



Sharapin (2000) menciona que la extracción incompleta de la droga y la lentitud del proceso extractivo se consideran como desventajas de la maceración, el proceso de maceraciones sucesivas con renovación del solvente permite en lo posible evitar esto, recuperando mayor cantidad de solvente y disminuyendo la cantidad de extracto retenido en el residuo.

1.4 SOLVENTES DE EXTRACCIÓN.

La selección adecuada del solvente de extracción permite extraer mayor cantidad de metabolitos secundarios, se debe tener en cuenta que el rendimiento cuantitativo y/o cualitativo de la extracción dependerá especialmente de la polaridad del solvente utilizado. Existen diferentes tipos de solventes usados en las extracciones de principios activos entre ellos: el etanol, metanol, acetona o la mezcla de estos en proporciones diferentes con agua, por otro lado, varios son los factores que influyen en la extracción de dichos metabolitos siendo ellos: la concentración del solvente, temperatura, tiempo de contacto, tamaño de partícula y relación masa-solvente (Rosales & Soto 2016).

Rodas (2004) menciona que un solvente acuoso permite la extracción de amidas, saponinas, mucílagos, taninos, compuestos reductores, alcaloides, Sotelo (2010) establece que las mezclas de metanol en agua (solventes hidroalcohólicos) son eficaces para la extracción de compuestos polifenólicos, en cambio los solventes alcohólicos tienen la capacidad de extraer taninos, compuestos reductores, leucoantocianinas, cumarinas, flavonoides, esteroides, triterpenos, lactonas insaturadas antraquinonas, entre otros.

1.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

1.5.1 Oxidación celular

La mayor parte de los seres vivos utilizamos el oxígeno para respirar y obtener energía, es así como este gas representa la fuerza motriz para el mantenimiento del metabolismo y la viabilidad celular, al mismo tiempo entraña un peligro potencial debido a sus especiales características paramagnéticas que le hace responsable de la formación de intermediarios altamente reactivos conocidos como especies reactivas de oxígeno (EROS) (San Miguel, 2009)



Las especies oxígeno reactivas comprenden un primer grupo: los radicales: ión superóxido (O_2^-), radical hidroxilo ($OH\cdot$), alcoxilo ($ROO\cdot$) y el óxido de nitrógeno ($NO\cdot$), dentro de un segundo grupo están las especies no radicálicas: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HClO$), oxígeno singlete (O_2^+) y el peroxinitrito ($ONOO^-$), las especies no radicálicas se vuelven reactivas ante la presencia de metales de transición como el hierro, cobre u otros EROS (López & Velencia, 2009).

San Miguel (2009) menciona que cuatro son las características básicas de un radical que determinan su toxicidad: reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad. Afirma que el radical hidroxilo es el que posee más difusibilidad entre el ión superóxido y el peróxido de hidrógeno, y que a su vez este último tiene mayor difusibilidad que el ion superóxido. Según este autor el radical superóxido carece de reactividad suficiente, por lo que no ataca directamente a las moléculas, sino que actúa como oxidante débil o reductor; mientras que el radical hidroxilo es altamente reactivo y su electrón desapareado puede reaccionar inespecíficamente con cualquier molécula causando incluso propagación del daño oxidativo ya que puede atravesar membranas celulares y producir reacciones en cadena. López & Velencia (2009) señalan que el peróxido de hidrógeno no posee electrones desapareados; sin embargo, tiene la capacidad de inactivar enzimas, atravesar membranas celulares y reaccionar con átomos de hierro y cobre para generar radical hidroxilo.

1.5.2 Radicales libres

Según Jiménez (2016) un radical libre es “una especie química con uno o más electrones desapareados en un nivel energético superior, con capacidad de existencia independiente y con propiedades paramagnética, lo que le confiere una alta e indiscriminada reactividad”

Jiménez (2016) clasifica las fuentes endógenas de radicales libres de la siguiente manera:

- Cadena respiratoria, por la reducción monovalente de oxígeno se producen especies radicálicas.
- Monocitos, neutrófilos, macrófagos al utilizar el sistema NADPH oxidasa genera un ion superóxido (O_2^-) que puede o no combinarse con óxido de nitrógeno



sintetizado como mecanismo de defensa para generar peroxinitrilo que será capaz de inducir peroxidación lipídica en las lipoproteínas.

- Activación catalítica de enzimas del metabolismo intermedio (hipoxantina, xantina oxidasa, mono amino oxidasa, ciclooxygenasa, lipooxygenasa).
- Auto Oxidación de compuestos reducidos de carbono como aminoácidos, proteínas, lípidos, glúcidos y ácidos nucleicos.

De acuerdo con el mismo autor las fuentes exógenas de radicales libres que pueden incrementar el nivel de EROS son: ciertos tipos de radiaciones (electromagnéticas, luz solar, ozono), toxinas fúngicas, pesticidas, ciertos aditivos alimentarios.

“Un exceso de radicales libres provoca daños letales en la célula por la oxidación de lípidos, proteínas, DNA y enzimas ocasionando reacciones en cadena que perpetúan la producción de más radicales libres y aumenta el daño de tejidos, este exceso de radicales libres está asociado con enfermedades crónicas y neurodegenerativas como la arterioesclerosis, diabetes, problemas cardiovasculares, cáncer (debido a las mutaciones producidas en el ADN lo que favorece la proliferación celular y altera los factores de transcripción), igualmente la oxidación celular neuronal puede promover una excesiva muerte celular y ocasionar enfermedades neuro protectoras como el Parkinson y Alzheimer “ (Arellanes, Cortés, & García, 2011)

1.5.3 Sistema de defensa antioxidante.

El mecanismo de defensa antioxidante se lleva a cabo a través de dos procesos; el sistema de defensa endógeno o enzimático y el sistema de defensa exógeno en el cual las moléculas antioxidantes ingresan gracias a la cadena alimentaria.

El primero de ellos comprende el sistema enzimático de la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión S-transferasa, tioredoxina-reductasas y sulfocimetionina reductasas; en el segundo mecanismo las moléculas antioxidantes exógenas brindan soporte al primer mecanismo, y comprenden las vitaminas A, E, C, flavonoides (queracetina, catequina, entre otros) antocianinas, carotenoides, ácidos fenólicos (ácido cafeico, clorogénico, entre otros), y oligoelementos principalmente el zinc, selenio, hierro y manganeso forman parte del núcleo activo de las enzimas antioxidantes (Coronado, Gutiérrez, Vázquez & Vega 2015).



Gran parte de la flora ecuatoriana posee sustancias con propiedades biológicas, por consiguiente, la mayoría o todos los antioxidantes exógenos antes mencionados son encontrados en estas especies, y que al ser aprovechados ofrecen un beneficio extraordinario al ser humano, porque actúan inhibiendo o aplazando las reacciones de transformación que causan daño a las biomoléculas (Arana et al., 2015).

Arellanes et al. (2011) menciona que “el uso de antioxidantes sintéticos está restringido por su potencial carcinogénico”, por cuanto el empleo de antioxidantes de origen natural a dosis adecuadas seguramente ayudaría a prevenir los daños ocasionados por la oxidación celular. Es importante identificar y cuantificar este tipo de moléculas en plantas medicinales dado que su presencia podría contribuir enormemente a la medicina convencional.

1.5.4 Métodos de determinación de la capacidad antioxidante

Las técnicas de 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), miden la capacidad de un antioxidante en la reducción de un oxidante, el cual cambia de color cuando es reducido y, se basan en la capacidad de transferencia de electrones (Castro, 2016).

1.5.4.1 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Fundamento: El DPPH es un radical de color azul-violeta, con un electrón desapareado capaz de reaccionar con un antioxidante. Este último proporciona un átomo de hidrógeno al radical y al ocurrir la reacción el DPPH cambia a una coloración amarillo pálido. Estudios cinéticos muestran que este proceso ocurre a través de una reacción de seudo primer orden, y puede seguirse midiendo la disminución de la absorbancia en función del tiempo (generalmente suele ser entre 30 y 60 minutos) (Naspud, 2018).

1.5.4.2 Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

Fundamento: La metodología FRAP evalúa la capacidad de transformación del complejo de la tripiridiltriazina férrica a complejo ferroso, mediante la adición de un antioxidante, la reacción tiene lugar en un medio ácido y el cambio de coloración es medida con un espectrofotómetro a 593 nm durante los primeros 30 minutos, tiempo en el que todos los compuestos habrán reaccionado, los resultados son expresados en Trolox (García & et.al 2011).



Así la capacidad de reducir el hierro se considera como un índice de poder antioxidante por parte de la muestra. Ventajosamente este método emplea un tiempo corto para su ejecución, sin embargo; algunos polifenoles han descrito reacciones más lentas, llegando incluso a completar 30 min hasta completar la reacción del complejo (Lacalle, 2007).

1.6 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

1.6.1 Antecedentes

Es amplio el uso de plantas medicinales en el tratamiento de enfermedades infecciosas comunes; investigadores de todo el mundo no solamente pretenden brindar un conocimiento con bases científicas a la medicina tradicional. A pesar de la compleja y extensa diversidad estructural de las plantas buscan aislar metabolitos secundarios de extractos vegetales con propiedades biológicas que puedan ser usados directamente como agentes terapéuticos, material de inicio para la síntesis de medicamentos, o bien podrían servir de modelos para compuestos farmacológicamente activos en la síntesis de medicamentos.

La obtención de metabolitos secundarios con actividad biológica antibacteriana representa una importante probabilidad de combate contra diferentes cepas bacterianas, puesto que podrían inhibir la multiplicación bacteriana por mecanismos distintos al de los antibióticos convencionales, incluso tal mecanismo podría tener valor clínico en el tratamiento de cepas resistentes (Orozco, 2004).

1.6.2 Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana es un problema de salud a nivel mundial, el surgimiento de nuevos mecanismos bacterianos provoca una alerta epidemiológica por la ineffectividad de los antibióticos (Peralta, 2019). La OPS en América, año 2014, realizó una recopilación de datos de resistencia en 21 países de la región, cuyos resultados fueron: una mayor resistencia de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* a las cefalosporinas de tercera generación, y un 90 % *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, otro estudio realizado en Ecuador por el Ministerio de Salud Pública a través del Instituto Nacional de Investigación (INSPI) en el año 2015 evidenció un 48,5 % de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la cefoxitina (Díaz & Vásquez, 2018).



Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (SARM) es un microorganismo resistente a los antibióticos betalactámicos, descrito en la década del 60, luego de la introducción de la meticilina, su prevalencia se ha incrementado desde entonces. La resistencia antibiótica hace difícil el control de SARM en los hospitales y el hecho que este sea resistente a la meticilina se asocia con peores desenlaces (Peralta, 2019). Así según (Aspajo & Enrique, 2016) personas infectadas con cepas de SARM tienen un 64% más de probabilidad de morir que aquellas infectadas por cepas no resistentes.

Por otro lado, Díaz & Vásquez (2018) definen a los antibióticos como sustancias capaces de inhibir la proliferación bacteriana por su acción bacteriostática o erradicar al microorganismo por su acción bactericida, y establecen que la resistencia bacteriana es la disminución o pérdida de susceptibilidad de un microorganismo a la acción de un antibiótico.

García (2006) menciona que cepas patógenas resistentes surgen principalmente en los hospitales como consecuencia del amplio uso de antibióticos; las dosis utilizadas, tiempo de tratamiento y la eliminación de la mitad de la droga que no se alcanza a metabolizar en su totalidad, entre otros elementos que influyen son las altas posibilidades de transmisión y un estado inmunocomprometido de la persona. Establece también que la fácil y frecuente colonización de un microorganismo a los diferentes tejidos provoca su exposición a todas las terapias con antibióticos, induciendo de esta manera el desarrollo de microorganismos resistentes cuyas cepas se pueden diseminar muy rápidamente por contacto directo en las poblaciones humanas, tal es el caso de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) que presenta resistencia a la primera línea de antibióticos (ampicilina, penicilina) y *S. aureus* resistente a la vancomicina (SARV). Dado lo anterior, las opciones de tratamiento antimicrobiano para cepas con resistencia múltiple están seriamente limitadas, es por ello que actualmente nos encontramos frente a la búsqueda de drogas alternativas provenientes de otras fuentes como las animales y vegetales.

1.6.3 Características de la cepa en estudio

Staphylococcus aureus es la más virulenta de todas las especies de *Staphylococcus*, sigue siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad, capaz de producir infecciones de la comunidad y nosocomiales que afectan a individuos sanos e inmunocomprometidos; su fácil adaptabilidad a los tejidos causa síndromes patológicos



que van desde abscesos en la piel, infección de heridas hasta procesos más complicados como la osteomielitis, endocarditis, neumonía, meningitis, bacteriemia, síndrome de shock tóxico, además es responsable del 99% de los casos de intoxicación alimentaria por toxinas estafilocócicas García (2006).

Una de las características más importantes que posee *S. aureus* es su habilidad para producir toxinas, cuyo blanco son las células de la sangre humana, estas toxinas incluyen la hemolisina-β, hemolisina-Y, β-modulina y la leucocidina de Panton Valentine (Cervantes, Estrella & Salazar, 2014).

La elevada virulencia de *S. aureus* meticilino resistente (SARM) está asociado en gran parte a la leucocidina de PANTON Valentine (LPV), toxina que induce necrosis y apoptosis en leucocitos. Reportes clínicos y epidemiológicos indican una fuerte correlación entre la LPV y las infecciones graves de tejidos blandos y piel, fascitis y neumonía necrotizante (Adriano et al., 2016 & García 2006).

1.6.3.1 Clasificación taxonómica

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *S. aureus* (Adriano et al., 2016)

Reino	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
Bacteria	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Staphylococcus	<i>Staphylococcus aureus</i>

1.6.3.2 Características morfológicas

Staphylococcus aureus es un coco grampositivo con un diámetro de 1 a 3 mm, agrupados como células únicas, pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos, sus colonias se observan lisas, de consistencia cremosa y pigmentación que va de amarillo a dorado, poseen forma esférica, levemente elevadas y convexas, de bordes enteros, microorganismo carente de movilidad y con capacidad de crecer en condiciones aerobias y anaerobias (Adriano et al., 2016 & D, 2010).

Produce una zona amarilla ácida y opaca alrededor de la colonia por precipitación de lípidos debido a la lipovitelinlipasa. El tiempo de incubación luego de la siembra es de



18-24 h a 37 °C, excepto cuando se usan los medios selectivos en donde el período de incubación es de 48-72 h antes de descartarse como negativo (D, 2010).

La mayoría de las cepas producen β hemólisis o hemólisis total alrededor de las colonias cuando se cultivan en agar sangre. *S. aureus* se diferencia de las demás especies por su capacidad de coagular el plasma y de fermentar el manitol (medio selectivo, con alto contenido de sal que inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas), *Staphylococcus aureus* al igual que el género *Micrococcus* es catalasa positivo pero a diferencia de este no fermenta la glucosa, es resistente al calor, desecación y puede crecer en medios con concentraciones de NaCl de hasta un 7.5 % (Cervantes, García & Salazar, 2014).

1.6.4 Metodología para evaluar la actividad antimicrobiana

Marín & Ramírez (2009) afirman que diferentes métodos pueden ser usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad bacteriana ante agentes microbianos, estos autores clasifican a los métodos en cuatro grupos: métodos de difusión, métodos de dilución, métodos de bioautografía y el análisis conductimétrico.

La susceptibilidad bacteriana frente a sustancias con potencial antimicrobiano permite medir el potencial de las sustancias, la susceptibilidad que un microorganismo puede tener frente a concentraciones conocidas de una droga vegetal y la cantidad de microorganismos inhibidos (Abad, 2009).

1.6.4.1 Método de dilución: Comprende dos técnicas: dilución en agar y dilución en caldo. Las técnicas de dilución determinan cuantitativamente la actividad antimicrobiana. En este método una cantidad de extracto de planta o compuesto activo es mezclado con una cantidad de medio de cultivo, puede realizarse en medio sólido o líquido. La concentración final deseada debe ser considerada p/v o v/v con respecto al medio de cultivo, para la expresión de resultados, luego de la incubación, se utiliza la técnica de la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual define la concentración mínima capaz de inhibir el crecimiento visible del microorganismo (Marín & Ramírez 2009; Rivas et al., 2016).

1.6.4.2 Técnica de microdilución en placa.

Técnica fundamentada en la metodología general del método de dilución. La aplicación de esta técnica permite evaluar la inhibición del crecimiento del microorganismo de



prueba frente a concentraciones decrecientes de extracto. Es un método que experimenta una suspensión normalizada de bacterias con diferentes concentraciones de extractos a emplear (Abad, 2009).

En una placa se puede evaluar hasta 11 diluciones seriadas de extracto, se incluye además controles, tanto de esterilidad (pocillo sin inóculo bacteriano), como control negativo (caldo + DMSO) y control positivo (TSB + Antibiótico), la interpretación de los resultados puede ser mediante la utilización de métodos turbidimétricos (se observa visualmente) o colorimétricos. El uso alternativo de los métodos colorimétricos permite la incorporación de indicadores de pH u óxido reducción, con los cuales se puede evidenciar la presencia o ausencia del crecimiento bacteriano tras un cambio de color en el medio de cultivo. La Resazurina es la oxaxona más utilizada como indicador, en estado oxidado es de color azul y al reducirse a resorufina adopta un color fucsia por acción de las oxidorreductasas producidas por las bacterias viables (Marín & Ramírez 2009; Rivas et al., 2016; Abad 2009).

La microdilución en caldo permite determinar cuál es la concentración mínima inhibitoria (CMI) que un agente bacteriano inhibe o mata el posible crecimiento de un inóculo bacteriano estandarizado, es decir, la más baja concentración en la que no se observa crecimiento bacteriano visible (Abad, 2009).

Se reconoce que la micro técnica ahorra material y tiempo; además de reproducibilidad a los resultados, un método muy sensible para cantidades pequeñas, esto resulta ventajoso a la hora de trabajar con productos naturales (Universidad Tecnológica, 2009).



CAPÍTULO II

MATERIALES

2.1 MATERIAL VEGETAL

De acuerdo con la bibliografía citada en la sección 1.1.2 se estudiaron las propiedades antioxidante y antibacteriana de las hojas y flores de las siguientes especies vegetales:

Tabla 3. Especies vegetales de estudio y parte utilizada.

Nombre común	Nombre científico	Parte de la planta utilizada
Llantén	<i>Plantago major</i>	Hojas
Diente de León	<i>Taraxacum officinale</i>	
Ortiga	<i>Urtica urens</i>	
Trinitaria	<i>Otholobium mexicanum</i>	
Borraja Azul	<i>Borago officinalis</i>	
Chinchilla	<i>Tagetes terniflora</i>	
Paico	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	
Malva Blanca	<i>Malva officinalis</i>	
Manzanilla	<i>Matricaria chamomilla</i>	Hojas y flores

2.2 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS (ALCOHÓLICOS, HIDROALCOHÓLICOS Y ACUOSOS)

- Metanol para análisis ($\geq 99\%$ pureza)
- Agua destilada.
- Acetato de etilo.
- Reactivo 1 de productos naturales (Difenil-boryl-oxietil amina al 1 % en metanol)
- Reactivo 2 de productos naturales (Polietilenglicol 4000 al 5 % en etanol).



2.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

2.3.1 Determinación de la actividad antioxidante, técnica del radical 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

- Radical 2,2, Difenil-1-picilhidrazilo
- (R) -(+)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid 96% (Trolox) marca Sigma Aldrich
- Etanol absoluto
- Metanol para análisis
- Agua ultrapura
- Agua destilada

2.3.1.1 Preparación de la solución de DPPH 0,2 mM.

1. En un vaso de precipitación de 10 ml, cubierto con papel aluminio se pesó 0,0078 g del reactivo de DPPH
2. Se aforó con metanol grado análisis en un balón de aforo de 100 ml.
3. Se homogenizó por inversión
4. Para asegurar una disolución completa del reactivo se realizó sonicación por tres minutos en el baño maría con sonicador COLE PARMER ®.

2.3.2 Determinación de la actividad antioxidante, técnica del Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

- Ácido Acético.
- Acetato de Sodio 300 mM.
- Ácido Clorhídrico 40 mM.
- 2, 4, 6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) 10 mM.
- Cloruro férrico 30 mM.
- (R) -(+)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid 96% (Trolox) marca Sigma Aldrich.
- Agua ultrapura



2.3.2.1 Preparación de la solución para el ensayo, técnica FRAP

1. En un frasco ámbar se preparó la solución buffer ácido acético- acetato de sodio 300 mM.
2. En un segundo frasco ámbar se preparó la solución de cloruro férrico en agua 30 mM.
3. En un tercer frasco ámbar se preparó la solución de TPTZ 10 mM diluido en HCl 40 mM.
4. Finalmente se mezcló las tres soluciones en una proporción 10:1:1 y se calentó la mezcla a 40 °C por 10 minutos.

2.3.3 Preparación del estándar de referencia, concentración: 800, 400, 200, 100, 50 y 25 mEq/L

1. En un vaso de precipitación de 10 ml, cubierto con aluminio se pesó 0,0022 g del reactivo de Trolox
2. Se aforó con agua destilada ultrapura calidad HPLC en balón de aforo de 10 ml
3. Para asegurar una disolución completa del reactivo se sonicó el tiempo necesario en el baño maría con sonicador COLE PARMER ®
4. Se transfirió una alícuota de 5 ml a un segundo balón del mismo volumen para obtener una concentración de 400 mEq/L
5. Luego de aforado se homogenizó el balón de por inversión
6. Nuevamente se transfiere una alícuota de 5 ml al siguiente balón y se procede de la misma manera hasta completar las diluciones propuestas.

2.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

2.4.1 Determinación de la actividad antibacteriana, técnica de microdilución en placa

- Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- Tripticasa soya agar (TSA)
- Tripticasa soya caldo (TSB)
- Agua destilada tipo II
- Resazurina (Presto Blue™)
- Dimetil sulfóxido (DMSO)



CAPÍTULO III

MÉTODOS

3.1 OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.

3.1.1 Obtención del material vegetal

Las plantas medicinales se adquirieron en el mercado “10 de Agosto” de la ciudad de Cuenca, en la fecha y hora especificadas en la siguiente tabla:

Tabla 4. Recolección de las especies vegetales.

Planta	Fecha	Hora
<i>Otholobium mexicanum</i> (Trinitaria)	07/05/19	8:30 am
<i>Taraxacum officinale</i> (Diente de león)	07/05/19 02/07/19	8:30 am 11:30 am
<i>Borago officinalis</i> (Borraja)	03/06/19	9:11 am
<i>Matricaria chamomilla</i> (Manzanilla)	03/06/19	9:11 am
<i>Urtica urens</i> (Ortiga)	19/06/19	8:45 am
<i>Chenopodium ambrosioides</i> (Paico)	19/06/19	8:45 am
<i>Malva officinalis</i> (Malva blanca)	02/07/19	8:55 am
<i>Plantago major</i> (Llantén)	02/07/19	8:55 am
<i>Tagetes terniflora</i> (Chil chil)	15/07/19	9:08 am

3.1.2 Preparación del material vegetal

Se seleccionó las hojas y flores de *Matricaria chamomilla* y solamente las hojas de las 8 plantas restantes. Se eliminó el material extraño con agua destilada, previo lavado con agua potable, la eliminación parcial de agua se realizó con el escurridor de ensalada UCSAN M123, y el secado completo de la droga se realizó por liofilización.



Finalmente se trituró la droga seca, se almacenó en fundas de papel pequeñas con bolsas pequeñas de sílica gel en un recipiente hermético para proteger la droga al máximo de la humedad y la luz.

3.2 SOLVENTES Y MÉTODOS DE EXTRACCIÓN:

3.2.1 Solventes de extracción

Para la extracción de los metabolitos secundarios: flavonoides, compuestos fenólicos, cumarinas y taninos, posibles responsables de la actividad antioxidante, y terpenos posibles responsables de la actividad antibacteriana, se utilizó los siguientes solventes:

Tabla 5. Métodos de extracción y proporción de solvente.

Homogenización	Infusión	Sonicación	Percolación	Maceración
100% metanol grado analítico	-----	100% metanol grado analítico	100% metanol grado analítico	100% metanol grado analítico
80% metanol + 20% agua	-----	80% metanol + 20% agua	80% metanol + 20% agua	80% metanol + 20% agua
100% agua	100% agua	-----	-----	-----

3.2.2 Métodos de extracción.

Se pesó 1 g aproximadamente de droga seca para la extracción con todos los métodos, (sonicación, percolación, infusión y maceración), excepto el método de homogenización el cual se trabajó con un peso de 0,1 g.

3.2.2.1 Homogenización

La extracción con este método se realizó con la humectación previa de la droga seca pesada en un tubo de 5 ml, proceso realizado en la campana de extracción y por un lapso de 15 minutos. Posteriormente se colocó en la droga humectada 2 ml de su respectivo solvente indicado en la tabla # 14, a temperatura de refrigeración, se llevó al homogenizador tipo ultraturrax (VWR 200®) y se homogenizó a temperatura ambiente durante 3 ciclos de 1 minuto, dejando en reposo 10 segundos, transcurrido ese tiempo,



con ayuda de las pipetas pasteur el extracto obtenido fue distribuido a tubos eppendorf de 1,5 ml, se lavó el vástago con 1 ml de solvente para evitar pérdida de extracto, posteriormente se centrifugó los tubos eppendorf con extracto por 5 min a 3000 rpm y se recolectó el sobrenadante en viales ámbar de 2 ml. Se adicionó 500 µl más de solvente en el sedimento, se homogenizó con vortex por 1 min y nuevamente se centrifugó el mismo tiempo y a la misma velocidad, el sobrenadante se colocó en sus respectivos viales los cuales se colocaron en el concentrador al vacío a 20 °C por 12 horas, pasado el tiempo de concentración los extractos se secaron por liofilización.

3.2.2.2 Infusión.

Se pesó la droga en un vaso de precipitación de 50 ml cubierto con papel aluminio y se adicionó 20 ml de agua destilada a una temperatura aproximada de 92 °C, una vez cubierto el vaso de precipitación, se colocaron en un frasco hermético por 15 minutos, transcurrido ese tiempo se filtró en un tubo de liofilización de 40 ml, se tapó y se llevó el extracto a -80 °C para su posterior liofilización. Una vez obtenido el extracto seco por liofilización se pesó 2 mg en viales ámbar de 2 ml y el excedente se colocó en viales ámbar de 4 ml.

3.2.2.3 Sonicación.

Se pesó la droga en balones fondo redondo para ebullición, se humectó con su respectivo solvente por 14 horas, posteriormente se añadió 16 ml del solvente correspondiente en cada balón y se llevó al baño maría con sonicador COLE PARMER ®. La sonicación se realizó durante 1 h en tres ocasiones, manteniendo una temperatura entre 20 y 25 °C, luego de cada hora de sonicación se filtró el extracto en tubos para centrífuga con rotor 11030 y se centrifugó por 15 min a 3000rpm, se transfirió el sobrenadante a balones fondo redondo para su concentración en el Rotavapor HEIDOLPH a 37 °C, mientras que el sedimento fue renovado para continuar con el segundo ciclo de sonicación, posteriormente se aplicó el procedimiento general de concentrado y secado descrito a continuación:

Procedimiento general de concentrado y secado para los métodos: sonicación, percolación, maceración:



Se lavó el balón contenido el extracto con metanol grado análisis (8 ml aproximadamente), con la ayuda de un embudo pequeño se colocó el extracto en tubos tapa rosa de 15 ml, posteriormente se secó el extracto con nitrógeno gaseoso hasta obtener un volumen de 2 ml aproximadamente, se trasvasó el extracto a tubos de liofilización de 40 ml lavando el tubo de 15 ml con agua ultrapura grado HPLC, se tapó y se llevó el extracto a -80 °C para su posterior liofilización. Una vez obtenido el extracto seco por liofilización se pesó 2 mg en viales ámbar de 2 ml, el excedente se colocó en viales ámbar de 4 ml.

3.2.2.4 Percolación.

Se pesó la droga en frascos de mermelada, se humectó con su respectivo solvente por 14 h. Transcurrido el tiempo de humectación se armó el equipo de percolación de acuerdo con las condiciones de laboratorio de Fitoquímica, se añadió el solvente y se dejó en maceración por 24 h.

Transcurridas las 24 h de maceración se inició el proceso de percolación a 20 gotas/min hasta el agotamiento total de la droga (aproximadamente 7 horas). Se recogió las gotas inicial y final en un tubo de ensayo de 2 ml con las que se realizó la cromatografía en capa fina (TLC). El agotamiento total de la droga se evidenció mediante TLC. Se sembró con una pipeta automática 0,50 µl de la gota inicial y final del percolado en placas sílica gel de vidrio, como fase móvil se usó acetato de etilo, metanol y agua en una relación 100-13,5-10, la lectura se realizó en el Sistema de foto-documentación TLC Visualizer, para el revelado de la placa se utilizó revelador de productos naturales. Los metabolitos secundarios manifiestos en el TLC y obtenidos por el método de percolación de cada planta medicinal se exponen en el anexo 2.

Una vez obtenido el extracto se concentró en el Rotavapor HEIDOLPH, finalmente se continuó con el procedimiento general de concentrado y secado descrito en el apartado 3.2.2.3.

3.2.2.5 Maceración.

Se pesó la droga en frascos de mermelada, se humectó con su respectivo solvente por 14 h, posteriormente se añadió 16 ml del solvente correspondiente en cada frasco, se agitó por 6 h en el agitador horizontal NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, y posterior



reposo por 18 h más. Transcurrido el tiempo en reposo se trasvasó el extracto a tubos para centrífuga con rotor 11030 y se centrifugó 15 min a 3000rpm, se transfirió el sobrenadante a balones fondo redondo para su concentración en el Rotavapor HEIDOLPH a 37 °C, mientras que el sedimento fue renovado y llevado nuevamente a agitación por 6 h con reposo de 18 h, pasado este último tiempo nuevamente se centrifugó el extracto en igual condición que la primera. Luego de realizadas las maceraciones sucesivas se filtró el extracto en los balones fondo redondo en los que se depositó el anterior macerado y nuevamente se concentró en el Rotavapor HEIDOLPH a 37 °C, para finalizar se aplicó el procedimiento general de concentrado y secado descrito en el apartado 3.2.2.3.

3.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

3.3.1 Preparación de la solución madre a partir del extracto seco.

Se preparó una solución madre de concentración 5 mg/ml, la disolución del extracto seco se realizó en su respectivo solvente de extracción, a excepción de los extractos acuosos los cuales se trabajaron con metanol/agua en una proporción 50/50, cuya finalidad fue facilitar la completa disolución del extracto.

Las disoluciones se homogeneizaron en el Homogenizador Premium Micro (VWR 200®) y en el Homogenizador LABQUAKE por 12 h, posteriormente se sonicó en el baño maría con sonicador por 2 h a una temperatura máxima de 34 °C y se homogenizó con vortex hasta su completa disolución.

Finalmente, en otro vial ámbar de 2 ml se colocó 100 µl de la solución madre y 400 µl de metanol grado análisis para obtener una concentración de 1mg/ml con la cual se trabajó.

3.3.2 Determinación de la actividad antioxidante, técnica del radical DPPH.

Para este ensayo se utilizó el método de Brand Williams (1995), con algunas modificaciones, cuyo fundamento se explica en la sección 1.5.4.1

Se preparó una gradilla para los tubos eppendorf cubriendose con papel aluminio, se colocó los tubos debidamente rotulados y se pipeteó en un mismo tubo: 1 ml de solución 0,2 mM de DPPH, 50 µl de muestra y 200 µl de etanol absoluto, se homogenizó en un vortex y se colocó la gradilla en la oscuridad por 30 minutos, al cabo



de ese tiempo se pipeteó 100 µl de la reacción en las placas e inmediatamente se realizó la lectura en el Lector de Microelisa BIOTEK a 517 nm.

3.3.3 Determinación de la actividad antioxidante, técnica FRAP.

Para este ensayo se utilizó el método de Benzie & Strain (1996), con algunas modificaciones, cuyo fundamento se detalla en la sección 1.5.4.2.

Se preparó una gradilla para los tubos eppendorf cubriendose con papel aluminio, se colocó los tubos debidamente rotulados y se pipeteó en un mismo tubo: 600 µl de la mezcla de reactivos detallada en la sección 2.3.2.1 + 20 µl de muestra, se homogenizó con vortex y se colocó la gradilla en la oscuridad por 30 minutos, al cabo de ese tiempo se pipeteó 100 µl de la reacción en las placas e inmediatamente se realizó la lectura en el en el Lector de Microelisa BIOTEK a 593 nm.

3.3.4 Preparación del estándar de referencia.

El estándar de referencia usado fue el (R)-(+)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado de manera que se han procesado 1068 determinaciones, los extractos metanólicos, hidroalcohólicos y acuosos se procesaron en tres días respectivamente, para cada día se realizó una curva de calibración con las concentraciones de Trolox siguientes:

Tabla 6. Curva de calibración, patrón de referencia Trolox.

Patrón	Concentración mEq/L	Volumen (ml) de solución precedente de Trolox	Volumen (ml) de agua destilada
1	800	Solución madre preparada con 0,002 g de Trolox	10 ml
2	400	5 ml	5 ml
3	200	5 ml	5 ml
4	100	5 ml	5 ml
5	50	5 ml	5 ml
6	25	5 ml	5 ml



3.3.5. Interpretación de la actividad antioxidante empleando las técnicas de DPPH y FRAP.

La interpretación de la actividad antioxidante obtenida por las técnicas DPPH y FRAP se realizó en base a las tablas planteadas a continuación, las mismas se establecieron a partir de los resultados obtenidos en el estudio.

Tabla 7. Interpretación de la actividad antioxidante, técnica DPPH.

Actividad antioxidante	mEq Trolox/ g extracto seco
Baja	0 – 300
Media	300 – 600
Alta	> 600

Tabla 8. Interpretación de la actividad antioxidante, técnica FRAP.

Actividad antioxidante	mEq Trolox/ g extracto seco
Baja	0 – 5000
Media	5000 – 10000
Alta	> 10000

3.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA, TÉCNICA DE MICRODILUCIÓN EN PLACA.

3.4.1 Elaboración del cryostock.

Especificado en el Procedimiento Operativo Estándar No. MB OP 006 del Laboratorio de Microbiología.

3.4.2 Preparación de controles de antimicrobianos.

Especificado en el Procedimiento Operativo Estándar No. MB OP 006 del Laboratorio de Microbiología.



3.4.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de extractos y fracciones de plantas medicinales por el método de microdilución en placa.

3.4.3.1 Preparación de los extractos vegetales.

Dentro de la cámara de flujo laminar tipo II previamente sanitizada con etanol al 70% y en relación con su peso se disolvieron los extractos de estudio en DMSO para llegar a una concentración de 20mg/ml, se dejó por un lapso de 24 h en el homogenizador LABQUAKE Ser. No. 1834110944728, posteriormente se sonicó en el baño maría con sonicador COLE PARMER ® Ser. No. 3510R-DTH por 1 h, para asegurar su completa disolución.

3.4.3.2 Preparación de la placa de DMSO.

En la cámara de flujo laminar, se colocó 20 µl de DMSO En la placa de 96 pocillos fondo en “V”, en la columna 2 y 7, y 30 µl del mismo reactivo en las columnas 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 y 11, a continuación se colocó 20 µl del mismo extracto en las columnas 2 y 7 y los siguientes en las filas B,C,D,E, se homogenizó con la pipeta multicanal, luego se transfirió 10 µl de la columna 2,7 a la columna 3,8 empleando el mismo procedimiento hasta llegar a la columna 6,11, en cada paso se realizó homogeneizaciones, obteniéndose al final concentraciones de 64, 16, 4, 1 y 0,25 µg/ml de extracto.

3.4.3.3 Preparación de la placa de agua.

Se colocó 80 µl de agua destilada estéril en una placa de 96 pocillos fondo plano exceptuando las columnas 1 y 12, se transfirió 11,76 µl de DMSO + extracto de la primera placa (fondo en “V”) a su correspondiente pozo, finalmente se homogenizó en orden creciente de concentración.

3.4.3.4 Preparación de la placa Test.

Se transfirió 10 µl de la placa de agua a sus respectivos pozos en una tercera placa fondo plano. Adicionando 200 ul de medio estéril (TSB) en la columna 1 en los primeros cuatro pocillos y en subsiguientes se colocó el inóculo bacteriano, en la columna 12 se adicionó 10 µl del control de antibióticos. Por medio de un combitips de 10 ml se colocó 200 µl de inóculo en todos los pocillos exceptuando los pocillos en el que está el medio TSB, se homogenizó en el Agitador - Homogeneizador de placas. Ser. No.1882090372327 y se incubó a 37 °C entre 18 y 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación se determinó la CMI de los extractos mediante la turbidez (turbo:



crecimiento bacteriano), además se adicionó 20ul de resazurina e incubó por 45 min, se observó el cambio o no de coloración (coloración inicial es azul: inhibición bacteriana, fucsia: no hay inhibición bacteriana).



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 ESTUDIO ESTADÍSTICO ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, TÉCNICA DEL RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZILO Y TÉCNICA FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER.

El análisis estadístico de la actividad antioxidante se realizó a partir de la media de TROLOX (mEq/ 1 mg extracto seco) de las determinaciones obtenidas por cada método de extracción, se trabajó con un nivel de confianza 95% ($p < 0.005$), la aceptación o rechazo de la hipótesis nula (H_0) dependió de la probabilidad relacionada. Se trabajó con el software estadístico IBM SPSS Statistics ® y el estudio se realizó desde la clasificación solvente de extracción.

En el análisis estadístico se evaluó a más de dos grupos de muestras independientes en el cual se comparó las medias de actividad antioxidante entre los cuatro diferentes métodos de extracción; homogenización, sonicación, percolación y maceración con los solventes de extracción metanol 100 % y metanol: agua 80:20. Se establecieron las siguientes hipótesis:

- **H_0 :** La actividad antioxidante es similar en los cuatro métodos de extracción
- **H_a :** La actividad antioxidante es distinta al menos en un método de extracción.

En la técnica del DPPH los datos (resultados) de la actividad antioxidante evaluada por los cuatro métodos y los dos solventes empleados, presentaron normalidad y homocedasticidad, por lo tanto, se aplicó pruebas paramétricas. Bajo el mismo criterio de normalidad y homocedasticidad se aplicó una prueba paramétrica en la metodología FRAP, pero únicamente con el solvente metanol: agua 80:20, debido a un incumplimiento de estos criterios se aplicó una prueba no paramétrica para las extracciones realizadas con el solvente Metanol 100 %.

Tabla 9. Estudio estadístico, media de la actividad antioxidante, métodos:
homogenización, sonicación, percolación, maceración.

Técnica Solvente	DPPH	FRAP
Metanol 100 %	ANOVA con un factor INTER sujetos	H Kruskal Wallis $p=0.720$



	$p=0.823$	
Met/H ₂ O 80:20	ANOVA con un factor INTERsujetos $p=0.959$	ANOVA con un factor INTERsujetos $p=0.658$

Los valores de p descritos en la Tabla 9 permitieron la aceptación de la hipótesis nula y rechazo de la hipótesis alternativa, demostrándose que la actividad antioxidante es similar en los cuatro métodos de extracción: homogenización, sonicación, percolación y maceración, tanto para la técnica de DPPH como de FRAP.

El siguiente análisis estadístico de la actividad antioxidante correspondió a dos grupos de muestras independientes en el cual se comparó las medias de actividad antioxidante entre los métodos de extracción; homogenización e infusión, con el solvente de extracción H₂O 100 %. Se establecieron las siguientes hipótesis:

- **H₀:** La actividad antioxidante es similar entre los métodos de extracción homogenización e infusión.
- **H_a:** La actividad antioxidante difiere entre los métodos de extracción: homogenización e infusión.

El incumplimiento de los criterios de normalidad y homocedasticidad permitieron el empleo de pruebas no paramétricas.

Tabla 10. Estudio estadístico, media de la capacidad antioxidante, métodos:
homogenización e infusión.

Técnica Solvente	DPPH	FRAP
H ₂ O 100 %	U Mann-Whitney $p=0.003$	U Mann-Whitney $p=0.004$

Los valores de p descritos en la Tabla 10, permitieron el rechazo de la hipótesis nula y aceptación de la hipótesis alternativa, demostrándose de esta manera que la actividad antioxidante difiere entre los métodos de extracción: homogenización e infusión tanto para la técnica de DPPH como de FRAP.

4.2 ESTUDIO ESTADÍSTICO ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA TÉCNICA DE MICRODILUCIÓN EN PLACA.



El estudio estadístico de la actividad antibacteriana se realizó a partir de la relación: Concentración Mínima Inhibitoria de extractos obtenidos con metanol 100 % vs distintos métodos de extracción, se trabajó con un nivel de confianza 95% ($p < 0.005$), la aceptación o rechazo de la H_0 dependió de la probabilidad relacionada.

Para el análisis estadístico de la actividad antibacteriana se plantearon las siguientes hipótesis:

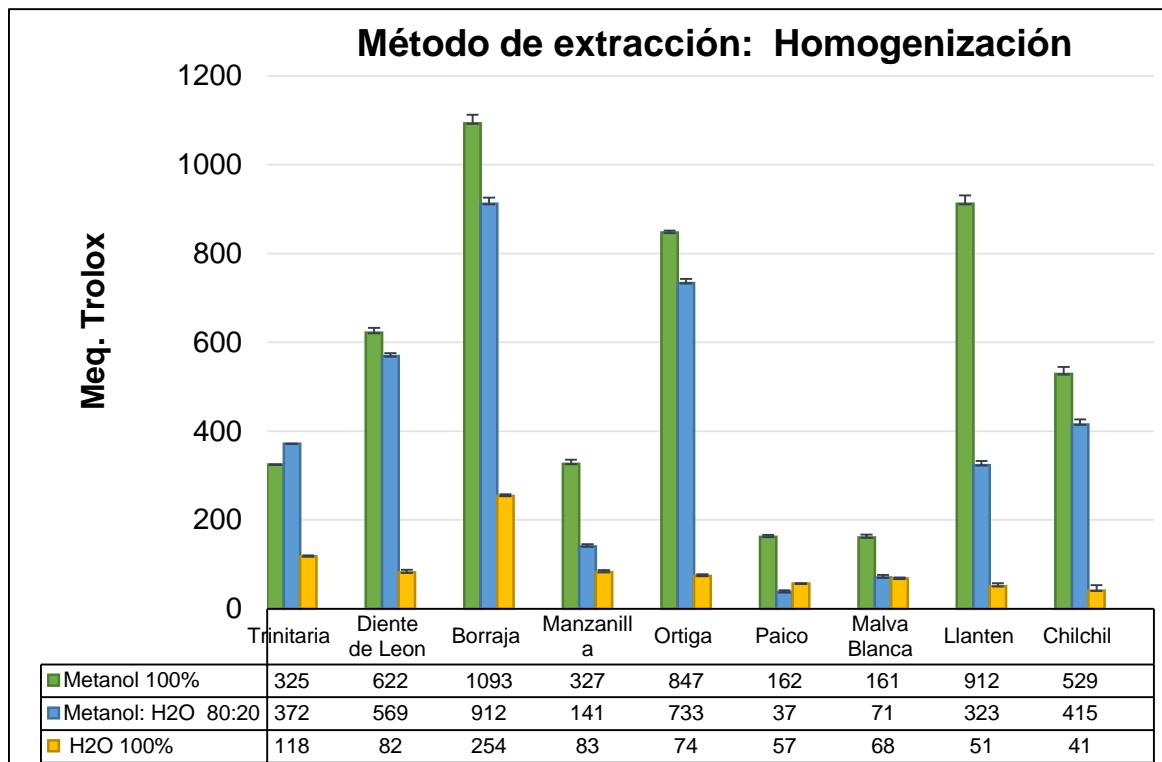
- **H_0 :** La Concentración Mínima Inhibitoria CMI difiere entre los extractos obtenidos por los diferentes métodos de extracción.
- **H_a :** La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es similar en cada uno de los extractos conforme el método de extracción.

Se utilizó el software estadístico IBM SPSS Statistics ®, la elección de la prueba estadística dependió de la naturaleza de las variables, además se tomó en cuenta que se trataba de más de dos grupos de muestras independientes, por ello se trabajó con la prueba X^2 de homogeneidad en donde se obtuvo un $p = 0.422$, permitiendo de esta manera la aceptación de la hipótesis nula y rechazo de la hipótesis alternativa, la cual establece que la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) depende del método de extracción.

4.3 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, TÉCNICA DEL RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZILO (DPPH).

En las siguientes gráficas se puede observar los resultados obtenidos de capacidad antioxidante de cada planta medicinal según el método de extracción.

Aplicando el método de extracción: homogenización y los 3 solventes: metanol 100%, metanol: agua 80:20 y agua 100%, se observó que los extractos metanólicos de *Borago officinalis* (borraja), *Plantago major* (llantén) y *Urtica urens* (ortiga) presentaron una alta capacidad de captación de radicales libres conforme el apartado 3.3.5, a continuación se detalla en la Gráfica 1.



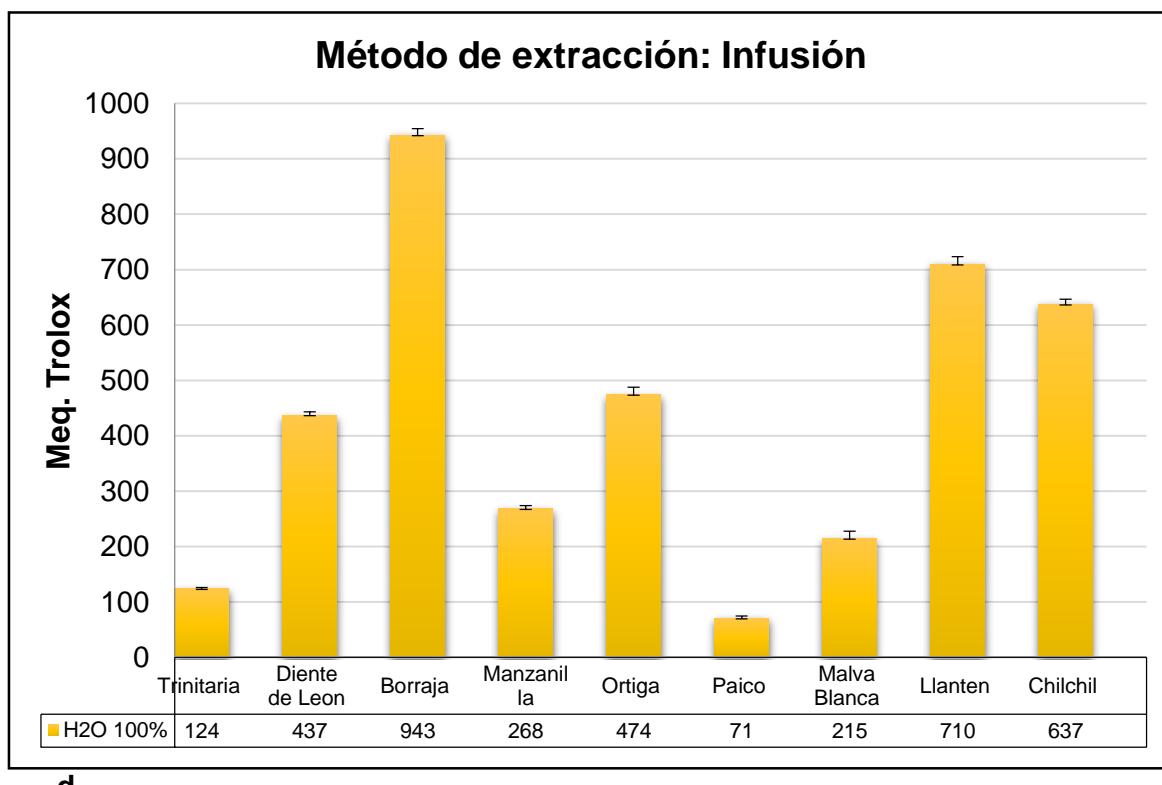
Gráfica 1. Capacidad antioxidante obtenida por la técnica del DPPH, método de homogenización.

La homogenización es un método que produce el cizallamiento de la droga vegetal, se debe considerar la forma y contextura de las hojas para indicar que existe o no un correcto cizallamiento de las mismas, en este caso con las hojas delgadas de *Borago officinalis*, *Plantago major* y *Urtica urens*, existió un eficaz cizallamiento, esto se evidenció por las altas concentraciones de actividad antioxidante, además se puede referir que existió buena difusión del solvente y una posible extracción de metabolitos secundarios responsables de esta actividad. Un estudio realizado por Rubio (2014) manifiesta que la gran capacidad antioxidante de *Urtica urens* se debe a su contenido en flavonoides con alto poder antioxidante, menciona que entre ellos se encuentran el kaempeferol, quercetina y astragalina, en nuestro análisis al no realizarse la cuantificación de dicho metabolito solamente contribuirán para indicar que dicha planta puede poseer una actividad antioxidante.

De acuerdo con la Gráfica 1 y el apartado 3.3.5, se observó que *Taraxacum officinale* presenta una moderada captación de radicales libres con metanol 100 % y con

metanol: agua 80:20, lo que se corroboró con el estudio de extractos alcohólicos de diente de león realizado por Castro (2017), quien reportó que esta planta posee una actividad antioxidante moderadamente activa, además identificó metabolitos responsables de la actividad antioxidante como flavonoides y compuestos fenólicos. La cuantificación de metabolitos secundarios realizada por Espadero (2018) en extractos metanólicos, etanólicos y acuosos de *Taraxacum officinale* le permitieron identificar en su estructura, flavonoides, taninos y saponinas, dicho estudio podría explicar la actividad identificada de esta planta en nuestro análisis.

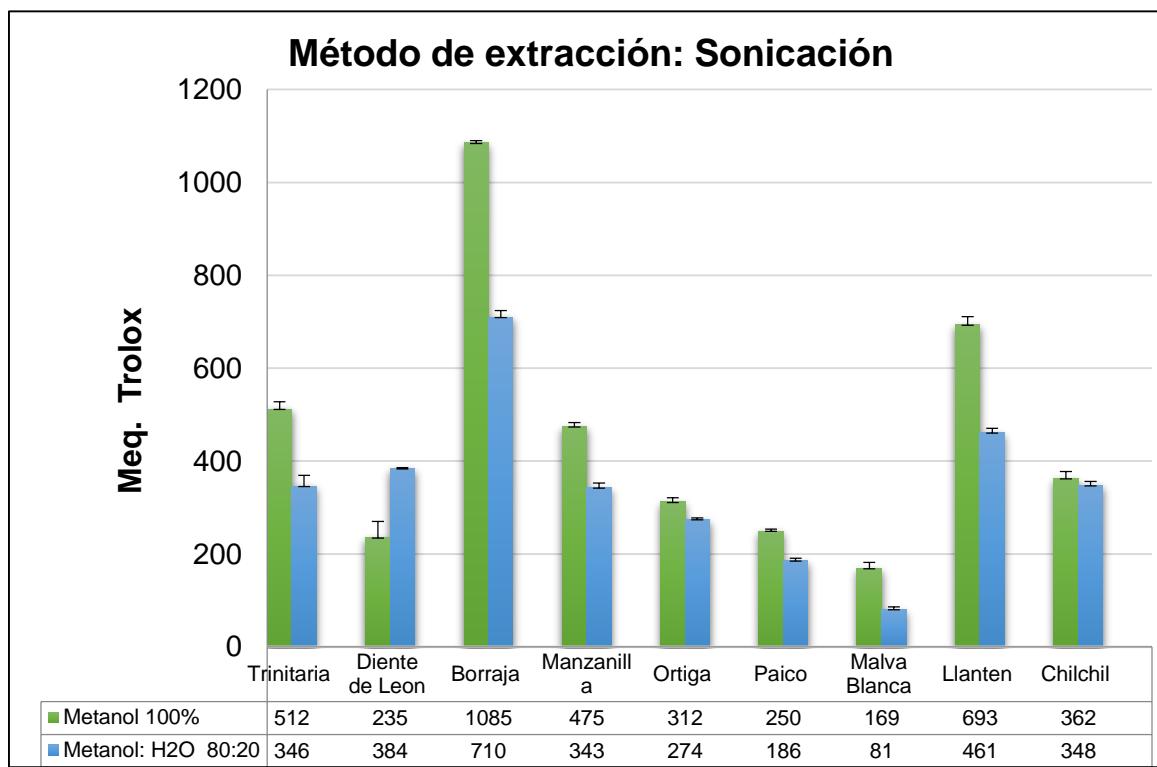
En la Gráfica 2 se presenta la actividad antioxidante de las 9 plantas medicinales, se observó que los extractos acuosos de *Borago officinalis*, *Plantago major* y *Tagetes terniflora* podrían estar enriquecidos con una mayor cantidad de metabolitos secundarios responsable de la actividad antioxidante, a diferencia de los extractos acuosos de *Otholobium mexicanum* y *Chenopodium ambrosioides* que pueden ser considerados extractos termolábiles, esto se evidenció por las bajas concentraciones de capacidad de equivalencia a Trolox®.



Gráfica 2. Capacidad antioxidante obtenida por la técnica del DPPH método de Infusión.

La aplicación de altas temperaturas en ciertas ocasiones puede ser eficaz en la extracción de metabolitos secundarios, así como en la conservación de sus propiedades medicinales, Jumbo (2016) menciona que la extracción de los metabolitos tiende a aumentar de manera efectiva cuando se les somete a una temperatura entre 60 y 80 °C, menciona que si se excede los 100 °C existe una pérdida por descomposición de dichos compuestos por la acción del calor.

En la Gráfica 3 se observó que *Borago officinalis* capta mayor cantidad de radicales libres con metanol 100 %, se evidenció también una buena extracción con metanol: agua 80:20, en el caso de *Plantago major* mostró un 64% de capacidad antioxidante en relación con la mayor capacidad antioxidante obtenida por este método (extracto de *Borago officinalis*).



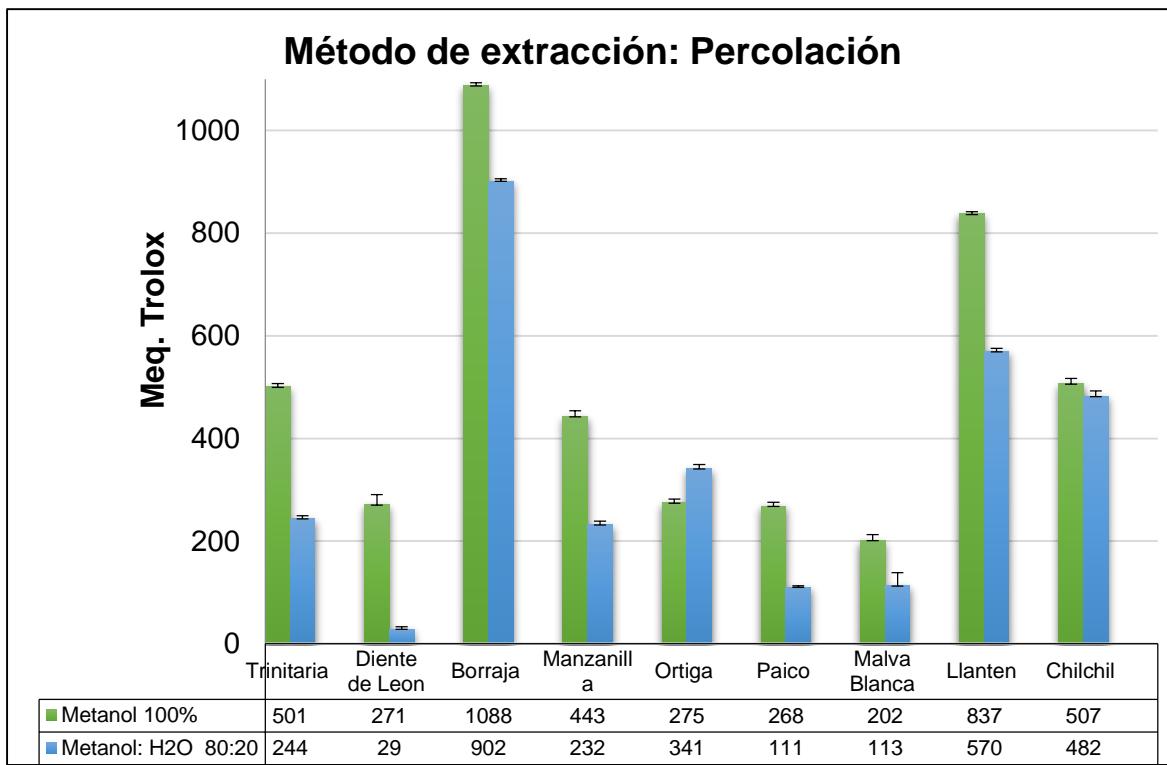
Gráfica 3. Capacidad antioxidante obtenida por la técnica del DPPH método de Sonicación.



Al someter la droga a ondas ultrasónicas se produce una ruptura de la membrana vegetal, esta ruptura según Rodríguez (2014) & Barrera (2015) incrementa la permeabilidad del tejido de las plantas facilitando de esta forma la entrada del disolvente a las áreas inertes del material vegetal y favoreciendo la hidratación de la matriz, lo que facilita la extracción de los metabolitos secundarios, se puede indicar que dicha ruptura, hidratación y difusión del solvente es verídica por medio de los resultados mostrados en la Gráfica 3.

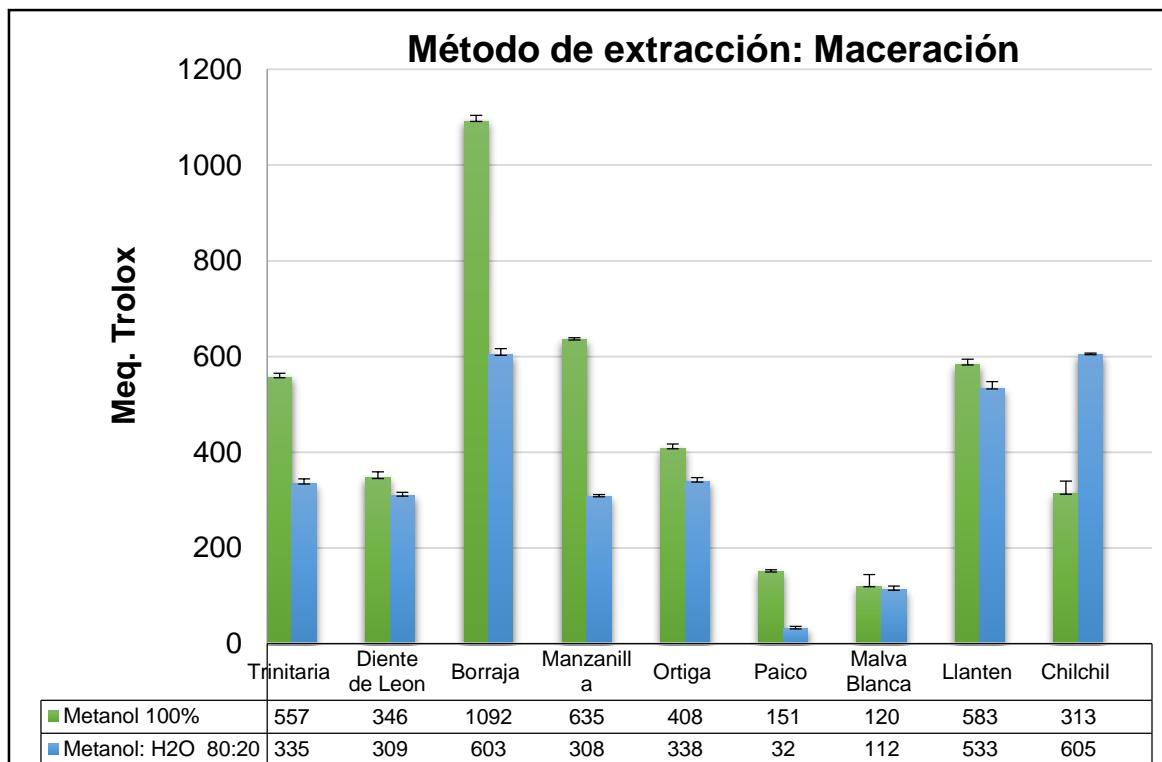
En la presente investigación, la capacidad antioxidante de *Borago officinalis* y *Plantago major* coincidió con el estudio realizado por Palacios (2018) quien cuantificó los flavonoides de *Plantago major* por cromatografía capilar en sílica gel y reporta 895,07 mg flavonoides /100 g de hoja, por lo que estableció que esta planta posee gran cantidad de estos metabolitos, refiere además que esta planta medicinal posee flavonoides como la luteolina y la noscapina, siendo metabolitos responsables de la actividad antioxidante nuestro estudio no se basó en la cuantificación de metabolitos secundarios pero sirve como referencia para indicar que los mismos pueden atribuir dicha actividad a estas plantas. Es así como Álvarez (2013) menciona que estos compuestos ejercen su acción a través de la ruptura de la cadena de radicales libres por la donación de un átomo de hidrógeno, donde la capacidad de secuestrar radicales libres y de inhibición del proceso oxidativo tienden a aumentar.

Al igual que en los otros métodos de extracción, *Borago officinalis* y *Plantago major*, presentaron una gran capacidad para captar radicales libres con el método de percolación, empleando metanol 100 % como solvente de extracción, *Malva officinalis* y *Otholobium mexicanum* mostraron un 19 y 25 % de actividad antioxidante respectivamente en relación con *Borago officinalis* según la Gráfica 4.



Gráfica 4. Capacidad antioxidante obtenida por la técnica del DPPH método de Percolación.

En la Gráfica 5, empleando la maceración como método de extracción, se observó que el extracto metanólico de *Borago officinalis*, *Matricaria chamomilla* y los extractos hidroalcohólicos de *Borago officinalis* y *Tagetes terniflora* conforme el apartado 3.3.5 (tabla 7) presentaron una alta capacidad para captar radicales DPPH.



Gráfica 5. Capacidad antioxidante obtenida por la técnica del DPPH método de Maceración.

En los métodos de extracción maceración y percolación es indispensable la humectación de la droga y el tiempo de contacto entre la droga vegetal y el solvente, todo ello produce una mejor extracción de los metabolitos secundarios. Sharapin (2000) & Barrera (2015) mencionan que la humectación del material vegetal genera un hincharcimiento de la droga, el cual produce un aumento en la permeabilidad de la pared celular y la difusión del solvente, obteniendo un mejor proceso de extracción.

4.4 RESUMEN DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES CON MAYOR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, TÉCNICA DEL RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZILO (DPPH)

De acuerdo con la Tabla 11, en 4 de las 9 plantas medicinales el método de homogenización proporcionó resultados de actividad antioxidante más altos en comparación con los otros métodos, lo cual indica una mayor extracción de metabolitos



secundarios responsables de esta actividad, tales extractos correspondieron a: *Taraxacum officinale*, *Urtica urens*, *Plantajo* y *Borago officinalis*, el extracto de esta última planta presentó una moderada actividad antioxidante por el método de infusión. También se observó que la mayor capacidad antioxidante en *Malva officinalis* y *Tagetes terniflora* se obtuvo con extracciones realizadas por el método de infusión; en *Chenopodium ambrosioides* las extracciones realizadas por el método de percolación presentaron mayor capacidad antioxidante, mientras que en *Matricaria chamomilla* y *Otholobium mexicanum* se obtuvieron valores mayores por el método de maceración. En todos estos casos se observó que las desviaciones estándar de cada uno de los extractos se encuentran dentro de un nivel de confianza del 95%.

Tabla 11. Resumen de la capacidad antioxidante representada por cada planta medicinal según la técnica DPPH.

Planta medicinal	Método de extracción	Solvente de extracción	Capacidad antioxidante Meq. Trolox ± Desviación estándar
<i>Otholobium mexicanum</i> (Trinitaria)	Maceración	Metanol 100 %	556.6 ± 14.1
<i>Taraxacum officinale</i> (Diente de león)	Homogenización	Metanol 100 %	621.6 ± 18.4
<i>Borago officinalis</i> (Borracha)	Homogenización	Metanol 100 %	1093.7 ± 9.1
<i>Matricaria chamomilla</i> (Manzanilla)	Maceración	Metanol 100 %	635.1 ± 6.2
<i>Urtica urens</i> (Ortiga)	Homogenización	Metanol 100 %	847 ± 7.1
<i>Chenopodium ambrosioides</i> (Paico)	Percolación	Metanol 100 %	268.3 ± 12.4
<i>Malva officinalis</i> (Malva blanca)	Infusión	H ₂ O 100%	214.7 ± 3.8
<i>Plantago major</i>	Homogenización	Metanol 100 %	912 ± 9.7



(Llantén)			
<i>Tagetes terniflora</i> <i>(Chil chil)</i>	Infusión	H2O 100 %	637.2 ± 17.3

Los extractos 100 % metanólicos presentaron una gran capacidad de captación del radical DPPH en 7 de 9 plantas siendo aquellas: *Taraxacum officinalis*, *Borago officinalis*, *Plantago major*, *Otholobium mexicanum*, *Chenopodium ambrosioides*, *Matricaria chamomilla* y *Urtica urens*.

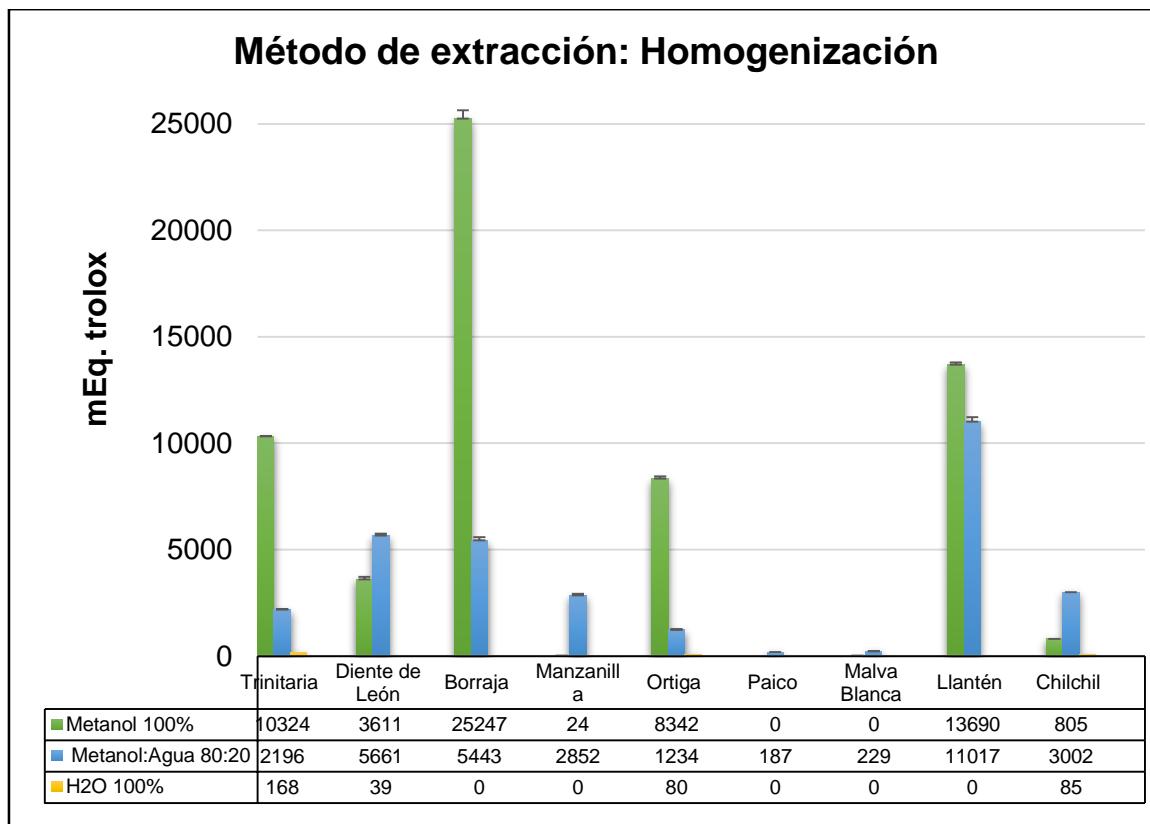
Tomando en cuenta el método y solvente de extracción se observó que los extractos de *Borago officinalis*, presentaron la mayor capacidad para captar radicales DPPH en relación con las demás plantas medicinales, siendo la homogenización el método que otorga la mayor capacidad antioxidante a esta planta, además se evidenció que la borraja según la interpretación el apartado 3.3.5 (tabla 7) presenta una actividad antioxidante media por de método de infusión.

Finalmente se estableció que los extractos metanólicos, hidroalcohólicos y acuosos de *Malva officinalis* y *Chenopodium ambrosioides* presentan valores bajos de capacidad antioxidante más repetidamente que las demás plantas medicinales, a pesar que, Guerrero (2015) en su estudio reportó que los principales compuestos presentes en *M. officinalis* son los taninos, flavonoides y ácidos triterpénicos (ácidos ursólico y oleanólico), siendo el mismo autor quien atribuyó a los flavonoides actividades antioxidantes, lo cual difiere con nuestro estudio.

4.5 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, TÉCNICA FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER (FRAP).

En las siguientes gráficas se puede observar los resultados obtenidos de capacidad antioxidante según el método de extracción.

Borago officinalis, *Plantago major* y *Otholobium mexicanum* alcanzaron los valores más altos de capacidad antioxidante cuando los metabolitos secundarios responsables de esta actividad han sido extraídos por el método de homogenización y empleando como solvente metanol 100 %, valores representativos de capacidad antioxidante por este mismo método y solvente también se evidenció en *Taraxacum officinale* y *Urtica urens*.



Gráfica 6. Capacidad antioxidante obtenida por la técnica del FRAP método de Homogenización

Jitala (2017) y Borbor (2015) señalan que *Borago officinalis* y *Urtica urens* poseen un metabolito secundario común: la quercentina. Meyer, Gil, Cano, & Sosa (2010) establecen que la quercentina se caracteriza por presentar el mayor potencial antioxidante dentro de la familia de los flavonoides ya que es capaz de reaccionar con iones metálicos, atrapar radicales hidróxilo y superóxido, los mismos autores mencionan que este flavonoide es ligeramente soluble en soluciones acuosas y de igual manera en otros solventes polares como metanol, etanol, DMSO, butanol y acetona.

Si bien el metabolito secundario quercentol está presente también en *Matricaria chamomilla* según Arreaza (2016), la capacidad antioxidante del extracto metanólico de esta planta es apenas el 0.09 % y 0.28 % de *Borago officinalis* y *Urtica urens* respectivamente. Por todo lo anterior se hace necesario y recomendable un tamizaje fitoquímico de los metabolitos que se obtienen de cada planta medicinal por cada



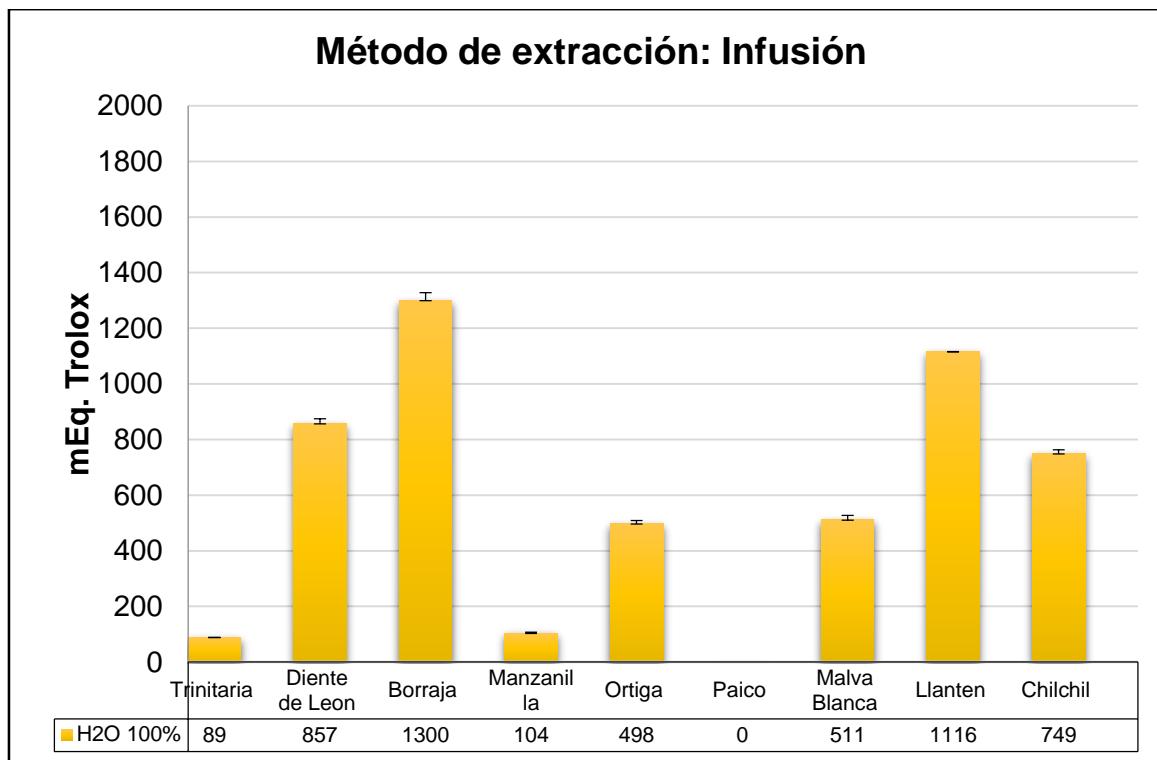
método de extracción, con ello se lograría establecer una comparación más eficaz entre aquellas plantas medicinales que poseen metabolitos secundarios en común.

Por otro lado, la alta actividad antioxidante de *Borago officinalis*, concuerda con lo estudiado por Benítez, Astudillo, D, Echeverría, Jaramillo & Matute (2016) quienes evaluaron la actividad antioxidante de extractos alcohólicos de *Borago officinalis*, los resultados de su estudio demostraron que la actividad antioxidante de esta planta incluso supera a la del ácido ascórbico que usó como muestra control.

El extracto hidroalcohólico de *Plantago major* obtenido por el método de homogenización superó la actividad antioxidante de todas las plantas medicinales, resultado que se interpreta como alto conforme el apartado 3.3.5. Con este método los extractos hidroalcohólicos de *Taraxacum officinale* y *Borago officinalis* presentan una moderada actividad antioxidante casi similar.

La mayoría de los extractos acuosos obtenidos por el método de homogenización poseen actividad antioxidante nula, (Gráfica 6), curiosamente *Otholobium mexicanum* alcanzó el máximo de los valores cuando sus metabolitos se han extraído con un solvente 100 % acuoso, a pesar del espesor de la hoja, los extractos acuosos de *Borago officinalis* y *Plantago major* presentaron nula actividad antioxidante, sin embargo; al realizar la extracción con el mismo solvente pero a una temperatura de 90 °C la capacidad antioxidante de *Otholobium mexicanum* disminuye drásticamente de tal manera que se ve superada por 7 plantas medicinales más (Gráfica 7).

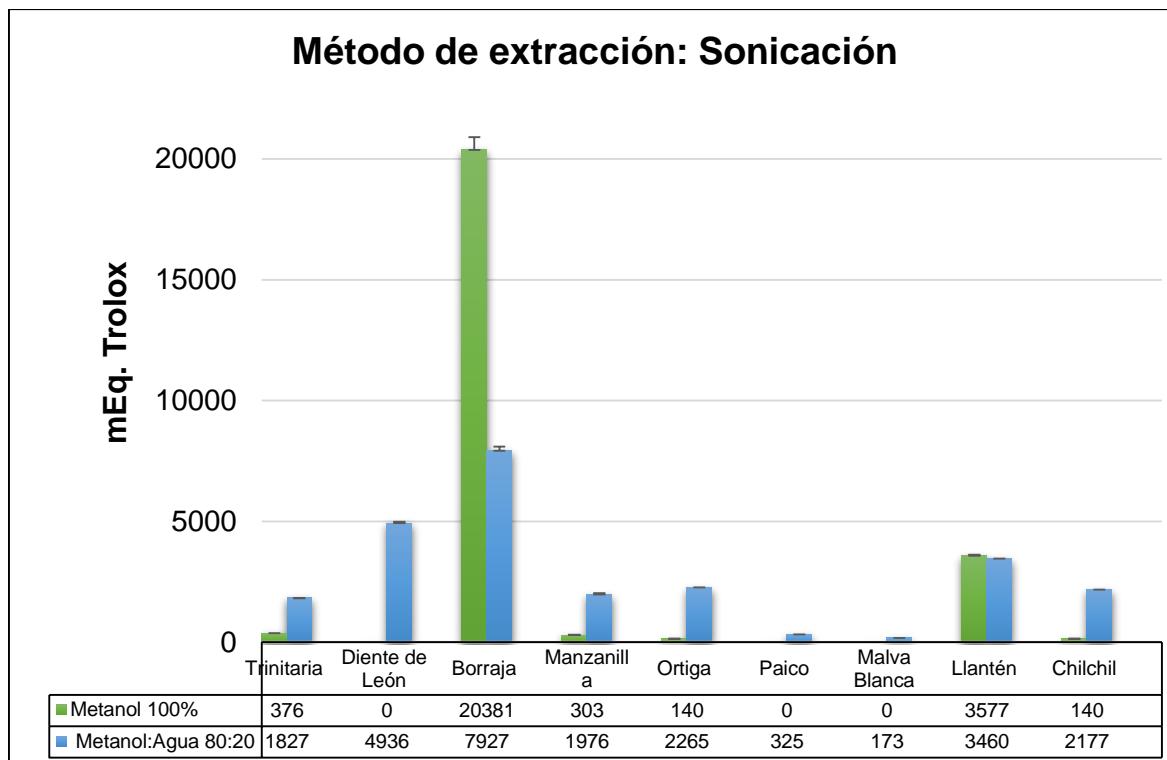
Malva officinalis obtuvo la mayor capacidad antioxidante cuando sus metabolitos se han extraído por el método de infusión (Gráfica 26), sin embargo; la capacidad antioxidante de esta planta medicinal no es la más significativa en comparación con las demás plantas. Al analizar la Gráfica 7 se observó que *Borago officinalis* alcanza el más alto valor de capacidad antioxidante, seguido de *Plantago major*.



Gráfica 7. Capacidad antioxidante obtenida por la técnica del FRAP método de Infusión.

Dentro de la presente investigación no se consideró a *Malva officinalis* como una especie con gran capacidad antioxidante, es precisamente con el método de infusión cuando alcanzó su máxima capacidad antioxidante ya que según Cholota (2011), la malvidina es la antocianina con capacidad antioxidante más abundante en esta planta y es muy soluble en agua, Molero (2017) corrobora con este dato al realizar una cuantificación de metabolitos de extractos metanólicos de *Malva officinalis*, con lo cual demostró poca cantidad de flavonoides, regular cantidad de taninos y terpenos, y ausencia de cumarinas.

Borago officinalis superó nuevamente la capacidad antioxidante de las demás plantas medicinales cuando sus metabolitos han sido extraídos por el método de sonicación. Si bien en el método de homogenización (Gráfica 6) *Borago officinalis* superó la capacidad antioxidante de *Plantago major* en un 45 % en este método lo hizo con un 82 %.



Gráfica 8. Capacidad antioxidante obtenida por la técnica del FRAP método de Sonicación.

La mayoría de los extractos metanólicos alcanzaron una baja capacidad antioxidante cuando sus metabolitos han sido extraídos por el método de sonicación.

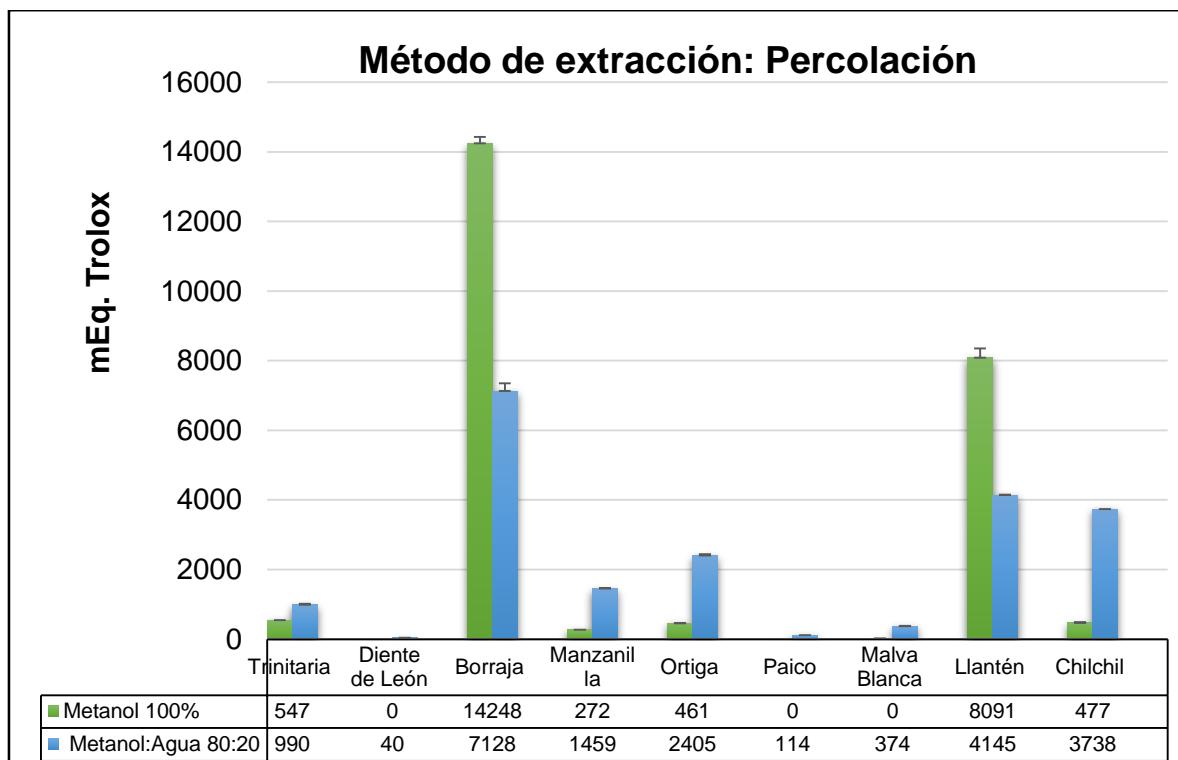
El extracto metanólico de *Borago officinalis* obtenido por el método de sonicación superó la capacidad antioxidante de las restantes 8 plantas medicinales con más del 50 %, la extracción fue incluso más eficiente que la percolación, método declarado como oficial por la (USP 2007). No se puede realizar la misma comparación con el método de homogenización ya que este superó con un 19 % la capacidad antioxidante del extracto de *Borago officinalis* obtenido por ondas ultrasónicas.

Al emplear un solvente hidroalcohólico para la extracción por el método de sonicación, se observó que *Taraxacum officinale* es la planta con mayor actividad antioxidante después de *Borago officinalis*, superando incluso a otra de las plantas más destacadas en la investigación: *Plantago major*, con este método la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de esta última se interpreta como baja a diferencia de la obtenida por el método de homogenización en donde la actividad antioxidante se considera alta; algo similar ocurre con *Taraxacum officinale* cuyo extracto pasa de una

actividad antioxidante alta a una moderada obtenida por el método de sonicación , esto significa que las ondas ultrasónicas son menos eficientes que la homogenización en cuanto a la extracción de metabolitos secundarios,

El extracto hidroalcohólico de *Taraxacum officinale* en la proporción trabajada posee un 62 % de la capacidad antioxidante de *Borago officinalis* planta con mayor actividad antioxidante en la presente investigación, no es raro encontrarnos con una destacada actividad antioxidante por parte de *Taraxacum officinale*, ya que, Espadero (2018) establece que esta planta medicinal posee una actividad antioxidante del 98 % en relación con la N-acetilcisteína.

Borago officinalis y *Plantago major* obtuvieron la mayor capacidad antioxidante cuando sus metabolitos han sido extraídos por el método de percolación y con el solvente metanol 100 %, se detalla a continuación en la Gráfica 9.

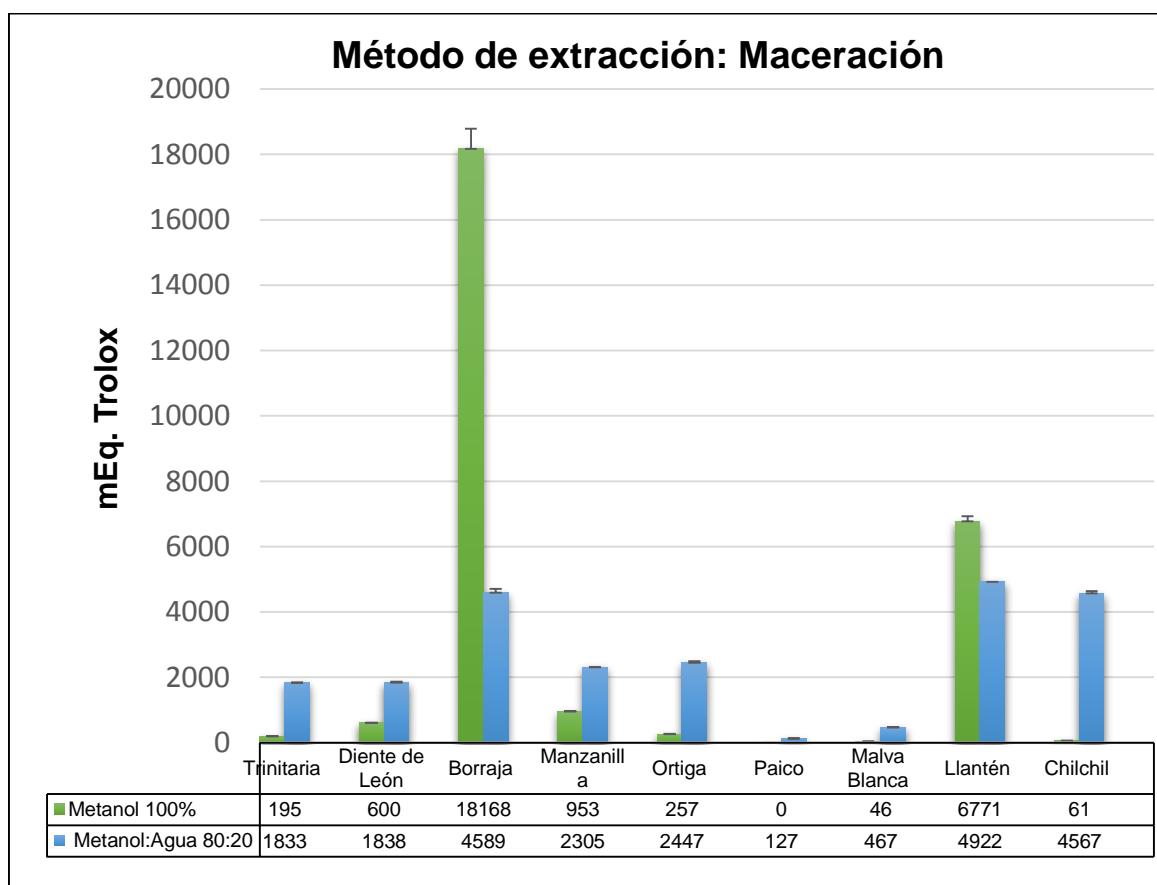


Gráfica 9. Capacidad antioxidante obtenida por la técnica del FRAP método de Percolación.

Con este método de extracción nuevamente se comprobó que *Borago officinalis* y *Plantago major* presentan metabolitos con gran capacidad antioxidante, extraíbles con un solvente 100 % metanólico y con un solvente hidroalcohólico.

La utilización de este método de extracción y el solvente hidroalcohólico otorgaron una actividad antioxidante baja de todas las plantas medicinales excepto en *Borago officinalis* planta que obtuvo una actividad antioxidante moderada.

Los metabolitos secundarios responsables de la capacidad antioxidante de *Borago officinalis* y *Plantago major* (por FRAP) nuevamente representan los dos más altos valores cuando han sido extraídos con metanol 100 % y por el método de maceración.



Gráfica 10. Capacidad antioxidante obtenida por la técnica del FRAP método de Maceración.

A pesar que *Matricaria chamomilla* ocupa el tercer lugar en cuanto al más alto valor de actividad antioxidante de extractos macerados, solvente metanol 100 %, la clasificación



de este resultado se ubica dentro de una actividad antioxidante baja de acuerdo a los especificado en el apartado 3.3.5, los resultados indican una variación significativa en cuanto a la capacidad de reducir el ión Fe^{3+} a Fe^{2+} entre los dos macerados metanólicos más destacados y *Matricaria chamomilla*, puesto que los valores de FRAP de estos primeros se clasifican como extractos con moderada y alta capacidad antioxidante de acuerdo con el apartado antes mencionado.

Cabe mencionar que la actividad antioxidante más destacada de *Matricaria chamomilla* se observó cuando los metabolitos secundarios responsables de esta actividad se obtuvieron al realizar maceraciones sucesivas con metanol 100 %.

El método de maceración también proporcionó la más alta capacidad antioxidante a *Tagetes terniflora*, pero cuando sus metabolitos han sido extraídos con un solvente hidroalcohólico. Esta planta medicinal no representó en ningún caso ni el máximo ni el mínimo valor de capacidad antioxidante, su extracto metanólico obtenido por el método de homogenización correspondió a un 3.18 % del extracto metanólico de mayor capacidad antioxidante obtenido por este mismo método, (extracto metanólico de *Borago officinalis*). Una comparación similar se realizó para el extracto hidroalcohólico, el cual correspondió a un 27.25 % del extracto hidroalcohólico de mayor capacidad antioxidante, (extracto hidroalcohólico de *Plantago major*) obtenido también por el método de homogenización. En la infusión *Tagetes terniflora* mostró un 57.61 % de capacidad antioxidante en relación con la mayor capacidad antioxidante perteneciente a *Borago officinalis*. Solorzano (2011) realizó la cuantificación de metabolitos secundarios de extractos alcohólicos de *Tagetes sp*, y la reacción de Shinoda para flavonoides demostró una moderada cantidad de estos metabolitos en el extracto, lo que nos indica que en esta especie los flavonoides: comferitrín y caemferol son ligeramente solubles en solventes alcohólicos, de la misma manera Camacho, Perez, Vadavia, & Ramirez (2018) demostraron que extractos acuosos de esta especie presentan bajo contenido de flavonoides.

4.6 RESUMEN DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES CON MAYOR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, TÉCNICA FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER (FRAP).

En la metodología FRAP se observó que en 6 de 9 plantas medicinales el método de homogenización arroja resultados más altos de capacidad antioxidante, entre ellas están *Otholobium mexicanum*, *Taraxacum officinale*, *Borago officinalis*, *Matricaria*



chamomilla, *Urtica urens*, *Plantago major*; en 1 de 9 plantas medicinales la capacidad antioxidante es mejor si los extractos se obtienen por los métodos de sonicación, infusión y maceración, siendo aquellas *Chenopodium ambrosioides*, *Malva officinalis* y *Tagetes terniflora*, respectivamente (Tabla 11).

Desde el punto de vista solvente de extracción, se observó una mayor capacidad antioxidante cuando la extracción ha sido realizada con metanol 100 %, entre las plantas medicinales que destacaron están: *Otholobium mexicanum*, *Borago officinalis*, *Urtica urens* y *Plantago major*. En 4 de 9 plantas medicinales la capacidad antioxidante por la técnica del FRAP fue mayor con extractos hidroalcohólicos, estas plantas abarcan: *Taraxacum officinale*, *Matricaria chamomilla*, *Chenopodium ambrosioides* y *Tagetes terniflora*, finalmente 1 de 9 plantas medicinales presenta mayor capacidad antioxidante si sus metabolitos han sido extraídos con agua y calor, tal es el caso de *Malva officinalis*.

Tabla 12. Resumen de la capacidad antioxidante representada por cada planta medicinal según la técnica FRAP.

Planta medicinal	Método de extracción	Solvente de extracción	Capacidad antioxidante Meq. Trolox ± Desviación estándar
<i>Otholobium mexicanum</i> (Trinitaria)	Homogenización	Metanol 100%	10324.4 ± 14.5
<i>Taraxacum officinale</i> (Diente de león)	Homogenización	Metanol: agua 80:20	5660.5± 132.4
<i>Borago officinalis</i> (Borracha)	Homogenización	Metanol 100 %	25247.1 ± 551.7
<i>Matricaria chamomilla</i> (Manzanilla)	Homogenización	Metanol: agua 80:20	2851.6 ± 109.3
<i>Urtica urens</i> (Ortiga)	Homogenización	Metanol 100 %	8341.6 ± 140.1
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Sonicación	Metanol: agua 80:20	324.9 ± 5.7



(Paico)			
<i>Malva officinalis</i> (Malva blanca)	Infusión	Aqua 100 %	510.8 ± 22.4
<i>Plantago major</i> (Llantén)	Homogenización	Metanol 100 %	13689.8 ± 144
<i>Tagetes terniflora</i> (Chil chil)	Maceración	Metanol:agua 80:20	4566.8 ± 94

Si bien *Borago officinalis* es la planta medicinal con la más alta capacidad antioxidante en todos los métodos extractivos, con el solvente metanol 100 %, es necesario recordar que la mejor extracción de los metabolitos responsables de la capacidad antioxidante se ha recuperado por el método de homogenización. Todo lo contrario sucedió con *Chenopodium ambrosioides*, planta medicinal que demostró una nula capacidad antioxidante de su extracto metanólico, aún por todos los métodos extractivos empleados, según Charpentier (2013) esta especie no posee un amplio contenido de metabolitos con capacidad antioxidante a diferencia de la variada lista de flavonoides que *Borago officinalis* posee, este autor menciona que *Chenopodium ambrosioides* tiene como metabolito principal el terpenoide ascardiol, cuya actividad es más antihelmíntica que antioxidante.

Por todo lo anterior expuesto se establece que los valores más altos de actividad antioxidante se consiguieron con el método de homogenización y con el solvente metanol 100 %

4.7 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA, TÉCNICA DE MICRODILUCIÓN EN PLACA.

Para la determinación de la actividad antibacteriana se utilizó 4 extractos metanólicos de cada planta medicinal obtenidos por los métodos de extracción: homogenización, percolación, sonicación y maceración, analizándose un total de 36 extractos metanólicos.

4.6.1 Determinación de la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria).

Tabla 13. Determinación de la CMI de nueve extractos metanólicos con diferentes métodos de extracción.



Planta	Solvente	Método de extracción	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	Interpretación CLSI
<i>Otholobium mexicanum</i> (Trinitaria)	Metanol 100 %	Homogenización	16	Ligeramente activo
		Sonicación	16	Ligeramente activo
		Percolación	16	Ligeramente activo
		Maceración	>64	Inactivo
<i>Taraxacum officinale</i> (Diente de león)	Metanol 100 %	Homogenización	>64	Inactivo
<i>Borago officinalis</i> (Borraja)		Sonicación		
<i>Matricaria Chamomilla</i> (Manzanilla)		Percolación		
<i>Urtica urens</i> (Ortiga)		Maceración		
<i>Chenopodium ambrosioides</i> (Paico)				
<i>Malva officinalis</i> (Malva blanca)				
<i>Plantago major</i> (Llantén)				
<i>Tagetes terniflora</i> (Chil Chil)				

Tabla 13. Interpretación de los resultados de la CMI frente a *Staphylococcus aureus*.

Interpretación	CMI ($\mu\text{g/ml}$)
Inactivo	>30
Ligeramente activo	5 – 30
Activo	<5

Fuente: PNT MB OP 006. Laboratorio de Microbiología. Universidad de Cuenca.

Se observó que los extractos metanólicos de *Otholobium mexicanum* (Tabla 13) obtenidos por los métodos homogenización, percolación, sonicación presentaron una CMI = 16 $\mu\text{g/ml}$, interpretándose como una actividad limitada frente *S. aureus* conforme el PNT MB OP 006. del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Cuenca (Tabla 13), este resultado se corroboró con un estudio similar realizado por León (2014), en el cual se demostró una actividad antibacteriana moderada e inactiva de extractos metanólicos e hidroalcohólicos respectivamente, todo ello demuestra que extractos metanólicos de *Otholobium mexicanum* poseen una ligera actividad antibacteriana frente a *S. aureus*; sin embargo no se puede decir lo mismo del extracto metanólico obtenido por maceración ya que se consideró como inactivo, CMI >64 $\mu\text{g/ml}$, probablemente la extracción de los metabolitos secundarios (terpenos, compuestos fenólicos) no fue completa.

Los extractos metanólicos de las 8 plantas restantes: *Taraxacum officinale*, *Borago officinalis*, *Matricaria chamomilla*, *Urtica urens*, *Chenopodium ambrosioides*, *Malva officinalis*, *Plantago major* y *Tagetes terniflora* se consideran inactivos, se observa en la Tabla 13.

En 8 de 9 plantas medicinales los extractos metanólicos son inactivos frente a *Staphylococcus aureus*. Ortega (2014) realizó un estudio de la actividad antibacteriana de extractos alcohólicos de *Taraxacum officinale* frente a *S. aureus* por métodos de difusión y demostró que ninguno de los extractos presentó actividad antibacteriana frente a este microorganismo en base al diámetro de su halo de inhibición.

Pacha (2018) estudió la actividad antibacteriana por microdilución en placa de extractos metanólicos de *Matricaria chamomilla* frente a *S. aureus*, el método de extracción empleado fue maceración y diluciones de 8, 4, 1, 0.5, 0.25 y 0.06 $\mu\text{g/ml}$, los



resultados de CMI fueron en 0.06 µg/ml indicando una buena actividad antibacteriana. Mohamed (2013) indica que el α -bisabolol es el responsable de la acción antibacteriana del extracto metanólico de la manzanilla, y según Seddik (2013) los flavonoides, compuestos polifenólicos y taninos son los responsables de tal actividad. Una concentración de extracto, inferior a (0.25 µg/ml) sería incapaz de realizar una inhibición bacteriana, según lo establecido por Pacha (2018), dado que no se trabajó con concentraciones inferiores de extracto se atribuyó una nula actividad antibacteriana a *Matricaria Chamomilla* frente a *S aureus*.

Failoc (2010) en su estudio, en cambio trabajó con una técnica de macrodilución y demostró que extractos etanólicos de *Plantago major* (Llantén) obtenidos por maceración, muestran una CMI de 6 mg/ml, interpretándose como un extracto de actividad antimicrobiana moderada frente a *Staphylococcus aureus*, este estudio está estrechamente relacionado con lo que plantea Vásquez (2018), quien menciona que el llantén posee metabolitos como mucílagos, pectinas, flavonoides y taninos, en gran cantidad. Alvarado & Rodas (2009) investigaron la actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* en extractos hidroalcohólicos (etanol agua 70:30), de *Malva officinalis* y *Urtica urens*, obtenidos por percolación, para la determinación de la actividad antibacteriana emplearon el método de dilución seriada en tubo con concentraciones de 8, 4, 2 y 1 mg/ml, demostraron que *Urtica urens* posee una actividad antibacteriana frente a *S. aureus* en la mayor dilución con una CMI de 8 mg/ml; sin embargo no presentó actividad frente a *E. coli*, el mismo autor indica que *Urtica urens* posee el flavonoide patuletina, metabolito considerado como agente antimicrobiano. Encontraron que en *Malva officinalis* la actividad antibacteriana es más baja, ya que obtuvieron una CMI de 2 mg/ml. Curitima (2015) estudió la actividad antimicrobiana frente al mismo microorganismo, y por el mismo método que Alvarado & Rodas (2009) en extractos hidroalcohólicos (etanol/agua 70:30) de *Chenopodium ambrosioides*, obtenidos por el método de maceración, determinaron que la CMI de dicha planta fue de 4 mg/ml, esto indica que se disminuye o inhibe el crecimiento de *S. aureus* a partir de esta concentración, también indicaron que *Chenopodium ambrosioides* presenta un alto contenido de metabolitos secundarios que pueden inhibir el crecimiento bacteriano, esto debido a que el etanol arrastra una gran cantidad de compuestos polares como taninos, flavonoides, saponinas y terpenos,



considerados como compuestos antibacterianos, pues inhiben la síntesis de ADN o ARN o pueden dañar la pared celular

Las concentraciones empleadas en nuestra investigación fueron en µg/ml extracto, realizándose una técnica de microdilución y el solvente usado fue metanol 100%, la variación en estos aspectos puede ser considerados para indicar que nuestros resultados sean negativos. Pues Guamán (2018) menciona que la actividad antibacteriana va a depender tanto del género de la planta, como del solvente a utilizarse en la extracción, el método de determinación y de las cepas antibacterianas a evaluarse.



CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- Los resultados más altos de actividad antioxidante en la mayoría de las 9 plantas medicinales se alcanzaron cuando los metabolitos secundarios responsables de dicha actividad se extrajeron con el solvente metanol 100 % y por el método de homogenización, tanto en la técnica del radical DPPH como del FRAP
- Los extractos metanólicos de *Borago officinalis* evaluados tanto por la técnica de DPPH como de FRAP, presentaron el máximo de los valores de capacidad antioxidante en relación con las 8 plantas medicinales restantes, además se evidenció que *Chenopodium ambrosioides* y *Malva officinalis* no poseen actividad antioxidante significativa.
- Los extractos metanólicos obtenidos por los métodos: homogenización, sonicación, percolación y maceración de las plantas medicinales estudiadas fueron inactivos frente a *S. aureus* ATCC 25923 a excepción de *Otholobium mexicanum*, cuyos extractos obtenidos por los métodos antes mencionados (exceptuando el método de maceración) mostraron una actividad antibacteriana limitada frente a este mismo microorganismo.

5.2 RECOMENDACIONES.

- Se recomienda realizar el tamizaje fitoquímico de las plantas medicinales estudiadas para facilitar una mejor correlación de resultados.
- Continuar el estudio de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos, hidroalcohólicos y acuosos, empleando técnicas complementarias tales como ORAC, ABTS, entre otras, que sirva de comparación con los otros métodos aplicados en este estudio y la determinación de la mejor técnica.
- Continuar con el estudio de la actividad antibacteriana de los extractos hidroalcohólicos y acuosos frente a *S aureus* y otras cepas bacterianas, que permitan comparar y complementar con el estudio realizado.
- Emplear diferentes métodos de extracción, solventes y proporciones de solvente para la extracción de metabolitos secundarios de *Malva officinalis* y



Chenopodium ambrosioides, que permitan determinar si dichas plantas poseen o no una actividad antibacteriana empleando solventes y proporciones de diferente naturaleza.



BIBLIOGRAFÍA:

- Abdala, L. R. Baigorí, M. D. & Tereschuk, M. L., (2003). Antibacterial activity of *Tagetes terniflora*. *Fitoterapia*, 74(4), 404–406. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(03\)00043-1](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(03)00043-1)
- Abad, X. (2009). *Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos totales de 4 especies vegetales de la provincia de Loja y Zamora chinchipe, empleando los métodos de Difusión en placa y Concentración mínima inhibitoria y la Inhibición del crecimiento radial*. Obtenido de Universidad Técnica Particular de Loja. http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/1862/3/UTPL_Abad_Alban_Ximena_del_Cisne_616X244.pdf
- Adriano, Q. F. C., Arévalo, A., Jessy, B., & Chumbe, V. (2016). Evaluación de la actividad antibacteriana *In Vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Plantago major* (*Llantén*) frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, por el método de difusión en disco y microdilución.
- Alvarez, O. (2013). *Evaluación de la capacidad Antioxidante y antirradical del extracto metanólico de "Ardisia sp"*. Obtenido de <https://es.slideshare.net/ObedAlgo/actividad-antioxidante>
- Arana, L. M., Monsalve, Z., Mesa-Vanegas, A. M., Rojano, B. (2015) Zapata, I. C., & Zapata-Uribe, S. Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(1), 1–10.
- Arellanes, M. A. J., Cortés, N. R. R., & Garía, I. (2011). Actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto hexánico y compuestos puros del rizoma de *Aristolochia taliscana*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 42(3), 35–41.
- Argoti, Altaneros, & Insuasty. (2007). Caracterización fisicoquímica preliminar de la resina del mopa- mopa (*Elaeagia pastoensis* Mora), BARNIZ DE PASTO, (33), 365–368.
- Arreaza, K. (2016). *Evaluación del rendimiento extractivo absoluto de Manzanilla alemana (Matricaria chamomilla L.) en función del tiempo de maceración dinámica para su aplicación en la Industria Cosmética*.
- Aspajo, B. S., & Enrique, S. (2016). Actividades antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (*Paico*) por el método de macrodilución en caldo frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.
- Asqui, M. de J. (2012). *Actividad hepatoprotectora del extracto de diente de león (Taraxacum officinale) en ratas (Rattus norvegicus) con hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono [Tesis de Bachiller]*.
- Barrera, F. (2015). *Métodos alternativos para la extracción y purificación de productos naturales de interés para la industria farmacéutica*. Obtenido de Tesis Doctoral. Universidad Nacional de



Cordoba:<https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/2555/Tesis%20Fernanda%20Barrera%20Vazquez.pdf?sequence=1>

Balouiri, M. S. (2016). *Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review.* *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71–79.

Bejar, A. & O. M. (2018). “*Efecto Sinérgico cicatrizante de los geles a base de los extractos hidroalcohólicos de Pencas de Tuna (*Opuntia ficus indica(L)Mill*) y hojas de Ortiga (*Urtica urens.L*) en ratas albinas.*” Retrieved from http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/2681/TESIS_KARINA_AYBAR_Y_VICTOR_ALFREDO.pdf?sequence=3&isAllowed=y

Benítez, R., Astudillo, D Armas, Echeverría, A. H., Jaramillo, L. & Matute, N. (2016). Evaluación de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios de extractos de diecisés plantas medicinales. *Revista Ciencia UNEMI*, 9, 29–35.

Bermeo, M. & Cambizaca, L. (2015). Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/27001/1/tesis.pdf>

Borbor, G. & C. J. (2015). Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria de la mezcla hidroalcohólica de *Matricaria chamomilla* y *Urtica urens* en ratas wistar.

Bravo, F. (2018). Comparación de la capacidad antioxidante de 4 metabolitos secundarios presentes en la planta amazónica Ayahuasca frente a *N- ACETIL CISTEÍNA*. Obtenido de Universidad Politécnica Salesiana de Cuenca: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16243/1/UPS-CT007895.pdf>

Buenaño-Allauca, M. P., Jiménez-Romero, E., Mancera-Rodríguez, N. J., & Zambrano-Intriago, L. F. (2015). *Universidad y Salud. Universidad y Salud* (Vol. 17). [s.n.]. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-71072015000100009&lng=en&nrm=iso&tlang=es

Cambizaca, B. G. (2015). *Relación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de *Jungia rugosa* Less en extractos metanólicos y de diclorometano.* Obtenido de Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Químicas.

Camacho, C. C., Perez, H. Y., Vadivia, A. A., & Ramirez, P. H. (2018). Phytochemical and antibacterial properties of extracts of *Tagetes erecta* L. (Asteraceae). *S Cielo*. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/ind/v31n1/2224-5421-ind-31-01-53.pdf>

Cantero, S. (2009). *Estudio de la capacidad antioxidante y la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva.* Obtenido de Universidad de Lleida. Departamento de Tecnología de Alimentos: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8394/Tasc1de1.pdf;jsessionid=A4747050A24750BC38DDD56983663F1D?sequence=1>

Carrión Jara, Ana Victoria & García Gómez, C. R. (2010). “PREPARACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES: DETERMINACIÓN DE EFICIENCIA DE METÓDICA.”

Castañeda, B., Ramos, E., & Ibáñez, L. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Revista Horizonte Médico*, 8(1), 56–72.

Castro, M. S. G. & M. R. (2016). EFFECT OF SOLVENT AND SOLVENT-TO-SOLID



RATIO ON THE PHENOLIC EXTRACTION AND THE ANTIOXIDANT CAPACITY OF EXTRACTS FROM *Pinus durangensis* AND *Quercus sideroxyla* BARK, 18(4), 701–714. <https://doi.org/10.4067/S0718-221X2016005000061>

Castro Ramírez, A. E. (1994). Origen, naturaleza y usos del cempoalxóchitl. *Revista de Geografía Agrícola*, (20), 179–189.

Cervantes, Estrella, & Salazar. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*, 61(1), 28–40.

Charpentier, A. D. (2013). *EFECHO DE LA IRRADIACIÓN UV-C SOBRE EL COLOR, FLORA NATIVA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL PAICO (Chenopodium ambrosioides) Y DE LA ORTIGA (Urtica dioica) DE LA ZONA ANDINA DE COTACACHI.*

Cholota, M., & Javier, M. (2011). “*OBTENCIÓN DE TÉ MEDICINAL NUTRACÉUTICO A PARTIR DE PLANTAS ANCESTRALES MENTA (Mentha arvensis) MANZANILLA (Matricaria chamomilla) LLANTÉN (Plantaginaceae) MALVA (Malváceas o malvaceae).*” Retrieved from <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3103/1/PAL252.pdf>

Coronado, Martha; Gutierrez, Rey; Radilla, C; Vazquez, Marcela; Vega, Salvador (2015). Antioxidantes : perspectiva actual para la salud humana, 42(7). Retrieved from <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchnut/v42n2/art14.pdf>

Coy, G. M. R., Hernández, N., & López, R. (2006). *Manual de uso y manejo de plantas aromáticas y medicinales en diferentes procesos productivos.*

Curitima, S. y. (2015). “*ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA in vitro DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE Chenopodium ambrosioides (Paico) POR EL MÉTODO DE MACRODILUCIÓN EN CALDO FRENTE A Staphylococcus aureus y Escherichia coli.*” Obtenido de UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA: http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/3864/Sergio_Tesis_Titulo_2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y

D, R. A. D. y S. (2010). Universidad de Cuenca, 1–65.

Diaz, Carla & Vasquez, K. (2018). Resistencias bacterianas en muestras de pacientes Hospitalizados en el Instituto de Seguridad Social José Carrasco Arteaga. Enero - Diciembre 2016. Proyecto. Retrieved from <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/31969/1/tesis.PDF.pdf>

Espadero Bermeo, S. G. (2018). “*Comparación de la capacidad antioxidante de cuatro metabolitos secundarios presentes en Taraxacum officinale (Diente de León) frente a N- ACETIL CISTEÍNA un antioxidante natural.*” Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16225/1/UPS-CT007881.pdf>

Failoc, I. y. (2019). *Efecto inhibitorio, in vitro del extracto etanólico de Plantago Major “Llantén” frente a cepas de staphylococcus aureus y streptococcus β-hemolíticos.*” Obtenido de Unidad de Investigación para la Generación y Síntesis de Evidencias en Salud, Universidad San Ignacio de Loyola, Lima, Perú: https://www.researchgate.net/publication/334376700_Efecto_inhibitorio_in_vitro



_del_extracto_etanolico_de_Plantago_Major_Llanten_frente_a_cepas_de_staphylococcus_aureus_y_streptococcus_b-hemoliticos

Gaona, R. C., Sánchez-Guerrero, H & Vélez-Terranova, M. (2014). *USO DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE LAS PLANTAS PARA REDUCIR LA METANOGÉNESIS RUMINAL.* 12.

García, C. y. (2010). "PREPARACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES: DETERMINACIÓN DE EFICIENCIA DE METÓDICA". Recuperado el Cuenca - Ecuador, de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2483/1/tq1005.pdf>

Garcia, N. E. (2002). "DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA *in vitro* DE *Chenopodium ambrosioides 'Paico'* En *Ascaris suum*, y *Trichuris trichiura*." Retrieved from http://repositorio.unsm.edu.pe/bitstream/handle/11458/801/TPQV_766_G25.pdf?sequence=1

Gómez, R. L. (2017). *EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LOS EXTRACTOS OBTENIDOS POR CO₂ SUPERCRÍTICO DE DOS ESPECIES VEGETALES Plantago major (PLANTAGINACEAE) Y Arnica montana L (ASTERACEAE)*.

Gordo, M. (2018). *The phenolic compounds: an approach to your biosynthesis, synthesis and biological activity*. Obtenido de Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC). Revista de investigación Agraria y Ambiental: <http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/1968/2366>

Gracia, R. & et. a. (2011). Quantification of polyphenols and capacity antioxidant in commercialized peaches in Ciudad Juárez, Mexico. @BULLET Mayo-Agosto, Vol. V, No(2), 67–75. Retrieved from http://tecnociencia.uach.mx/numeros/v5n2/data/Cuantificacion_de_polifenoles_y_capacidad_antioxidante_en_duraznos_comercializados_en_Ciudad_Juarez_Mexico.pdf

Guija-Poma, E. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-PicrilHidrazilo (DPPH) para determinar la capacidad antioxidante, 2(1), 0–3. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v16n1/v16n1a15.pdf>

Hernández-Alvarado, J., Zaragoza-Bastida, A., López-Rodríguez, G., Peláez-Acero, A., Olmedo-Juárez, A., Rivero-Pérez, N. Rivero-Perez, N. (2018). Actividad antibacteriana y sobre nematodos gastrointestinales de metabolitos secundarios vegetales: Enfoque en Medicina Veterinaria. *Abanico veterinario*, 8(1), 14–27. <https://doi.org/10.21929/abavet2018.81.1>

Indira Sotelo, N. C. (Agosto de 2010). *Borojo(Borojoa patinoi): Fuente de Polifenoles con actividad antimicrobiana*. Obtenido de VITAE, Revista de la Facultad Química Farmacéutica Colombia. 330 - 335: <https://www.redalyc.org/html/1698/169815641011/>

Jerves Andrade Lourdes, Leon Tamariz Fabian, E. al. (2014). Medicinal plants used in South Ecuador for gastrointestinal problems: An evaluation of their antibacterial potential. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(45), 1310–1320. <https://doi.org/10.5897/JMPR2014.5656>

Jiménez, J. P. (2016). RESUMEN DE LA TESIS "METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE INGREDIENTES FUNCIONALES ANTIOXIDANTES. Efecto de



Fibra Antioxidante de Uva en status antioxidantie y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos.

Jiménez, M. (2012). *OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO CAPTACIÓN DEL RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZILO (DPPH) PARA EVALUAR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN BEBIDA DE CAFÉ*. Obtenido de Universidad de Murcia. Espana: file:///C:/Users/Usuario/Downloads/188731-Texto%20del%20art%C3%ADculo-681611-1-10-20131217.pdf

Jitala, A. (2017). *ESTUDIO DEL CONSUMO DE LA BORRAJA EN LAS PERSONAS DE LA TERCERA EDAD, COMO MEDICINA ALTERNATIVA PARA TRATAR LAS AFECCIONES DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS ALTAS (TOS), EN LA PARROQUIA DE OTÓN DEL CANTÓN CAYAMBE 2016 – 2016*.

Lacalle, A. (2007). *ANTIOXIDANTES EN ALIMENTACIÓN: DIFERENTES FORMAS DE EXPRESAR SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE. TIPOS DE UNIDADES Y METODOS DE ANALISIS* (p. 73). Barcelona: 20, junio. Retrieved from http://www.anme.com.mx/libros/Antioxidantes_en_alimentaci%F3n.pdf

León, D. (2014). *Evaluación antimicrobiana y aislamiento de metabolitos secundarios de la especie vegetal Otholobium mexicanum J.W Grimes*. Retrieved from <http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/9065/1/Leon Lopez Diana FIN DE TT.pdf>

Liofilización de Alimentos—Google Libros. (s. f.). Recuperado 21 de agosto de 2019, de https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=hNCkTLfmPl4C&oi=fnd&pg=PP1&dq=lio filizaci%F3n+&ots=pnXb1zCfKa&sig=4mttEmd_NaDWYEBfeABuLY9ZSdo#v=onepage&q=li ofilizaci%F3n&f=false

Linares, N. (Junio de 2013). *PLANTAS MEDICINALES. Taller de farmacia de la naturaleza*. Madrid. Obtenido de http://www.fademur.es/_documentos/ponencias/Ponencia_Fademur_farmacia_OK.pdf

Lizcano, V. (2008). *EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y/O ACEITES ESENCIALES DE LAS ESPECIES VEGETALES Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Passiflora mannicata FRENTE A MICROORGANISMOS PATÓGENOS Y FITOPATÓGENOS*. Obtenido de Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá.

Luisa Rojas, C. J. (2015). *Métodos analíticos para la determinación de Metabolitos secundarios de Plantas*. . Obtenido de Universidad Técnica de Machala: file:///C:/Users/Usuario/Downloads/20%20METODOS%20ANALITICOS%20PARA%20L

López, A, Palou, E & Reyes, F. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8, 68–78. Retrieved from <http://web.udlap.mx/tsia/files/2015/05/TSIA-81-Reyes-Jurado-et-al-2014.pdf>

López, P.;Velencia, B. (2009). *Oxidación/Antioxidación en el envejecimiento*.



- PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA. Retrieved from <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8394/tesis360.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Luzuriaga, T. (2018). *La Universidad Católica de Loja*. Universidad Técnica Particular De Loja. Retrieved from http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/20.500.11962/21915/1/Luzuriaga_Gahona_Tatiana_Soledad.pdf
- Martin, D. (2017). *THE PHENOLIC COMPOUNDS: AN APPROACH TO THEIR BIOSYNTHESIS, SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY*. Obtenido de Revista de Investigación Agraria y Ambiental : <https://doi.org/10.22490/21456453.1968>
- Marín, Darwin & Ramírez, L. (2009). Methodologies for evaluating the In vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin, 42, 6. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/849/84916714049.pdf>
- Martínez, F. G. (2002). *NUTRICIÓN HOSPITALARIA: Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes*. Obtenido de Departamento de Fisiología, Universidad de León y Hospital de León. España: <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>
- Mesa-Vanegas, A. M., Zapata-Uribe, S., Arana, L. M., Zapata, I. C., Monsalve, Z., & Rojano, B. (2015). Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(1), 1–10.
- Meyer, T. G., Gil, D., Cano, L., & Sosa, Y. (2010). Evaluación de la capacidad antioxidante de la quercetina a partir del extracto natural de cebolla roja ocaña (allium cepa l) y manzana roja (pyrus malus l var. red delicius) en aceite de palma refinado tipo industrial en condiciones de calentamiento. *Publicaciones e Investigación*, 4(1), 13. <https://doi.org/10.22490/25394088.575>
- Investigación, 4(1), 13. <https://doi.org/10.22490/25394088.575>
- Molero, M. A. E. (2017). “ESTUDIO COMPARATIVO DE PLANTAS GASTROPROTECTORAS CULTIVADAS EN PERÚ Y CHINA.” Universidad Inca Garcilaso de la Vega. UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA. Retrieved from <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/1696#.XSrzydAYIZY.mendeley>
- Muñoz, J. C. (2014). “Estudio bibliográfico de las propiedades medicinales y nutricionales del diente de león.” Retrieved from http://dspace.ucacue.edu.ec/bitstream/reducacue/6530/1/Estudio_bibliográfico_de_las_propiedades_medicinales_y_nutricionales_del_diente_de_león.pdf
- Naspud, M. (2018). Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos alcohólicos del fruto de mora (*Rubus glaucus* Benth) obtenidos con tres pretratamientos térmicos.
- National, I., Pulvento, C., Troisi, J., Vega-Gálvez, A. (2014). *ESTADO DEL ARTE DE LA QUINUA EN EL MUNDO EN 2013*. (October). <https://doi.org/10.13140/2.1.1568.5129>



- Oranday, M., Rivas, C. & Verde, M. J. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica. Investigación en plantas de importancia médica.* <https://doi.org/10.3926/oms.313>
- Orozco, C. (2004). Elección de las condiciones más adecuadas para la obtención de extractos de plantas superiores con actividad sobre una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente, 86–90. Retrieved from <http://eprints.uanl.mx/6668/1/1080123958.PDF>
- Peralta, S. (2019). Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Médicas Posgrado de Medicina Interna Factores asociados a infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina , Hospital Vicente Corral Moscoso ., 47. Retrieved from <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/31969/1/tesis.PDF.pdf>
- Peñarrieta. (2014). *PHENOLIC COMPOUNDS IN FOOD.* Obtenido de Revista Boliviana de Química : scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602014000200006
- Pérez, A. y. (2009). *Metabolismo Secundario de las plantas .* Obtenido de Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal). Facultad de Biología. Universidad Complutense. Madrid.: https://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf
- Quilo. Maria. (2013). ESTUDIO DE PLANTAS MEDICINALES EN LOS SECTORES RUMIÑAHUI Y ATAHUALPA E IMPLEMENTACIÓN DE UN HUERTO DEMOSTRATIVO, PIJAL- IMBABURA 2010. Tesis, 1–100. Retrieved from <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Quispillo, J. (2013). *SEPARACIÓN, PURIFICACIÓN Y POSIBLE IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DEL Escobillón Rojo (*Callistemon speciosus*)*. Obtenido de Escuela Politécnica Superior del Chimborazo. Riobamba - Ecuador.
- Rincón, G., Quiñones, E., Qui-Zapata, J., & Serrato, M. (2012). Efectividad Biológica de Extractos de *Tagetes* spp sobre Bacterias Fitopatógenas. *Snicos-Sinarefi, Ciatej,* 43. Retrieved from https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/225097/Folleto_tagetes_vs_bacterias_fitopatogenas_VF.pdf
- Rodríguez, R.-M. J. (Marzo de 2014). *Revista CENIC. Ciencias Químicas. Vol 45.* . Obtenido de Empleo de la radiación ultrasónica para la extracción de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales. : <https://pdfs.semanticscholar.org/a271/497cd2a0eff2e6bd98d222f0165eee0a7a6b.pdf>
- Rodrigo, J. (2011). *Quantification of polyphenols and capacity antioxidant in commercialized peaches in Ciudad Juárez, Mexico.* Obtenido de @BULLET Mayo-Agosto, Vol. V, No(2), 67–75.: http://tecnociencia.uach.mx/numeros/v5n2/data/Cuantificacion_de_polifenoles_y_capacidad_antioxidante_en_duraznos_comercializados_en_Ciudad_Juarez_Mexico.pdf
- Rojas, W. (2015). *Inmunología de Rojas.* Medellín: Fondo Editorial.
- Rosales-Castro, M. & Soto-García, M., (2016). Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxyla*.



Maderas. Ciencia y tecnología, 18(4), 701–714. <https://doi.org/10.4067/S0718-221X2016005000061>

San Miguel, A. (2009). IMPORTANCIA DE LAS ESPECIES REACTIVAS AL OXÍGENO (RADICALES LIBRES) Y LOS ANTIOXIDANTES EN CLÍNICA.]

Rodas, I. M. (2004). IDENTIFICACIÓN DE FAMILIAS DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN *Myrica cerifera*. Obtenido de Universidad de San Carlos de Guatemala: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2228.pdf

Rubio, D. (2014). "EFECTO DE LA RADIACIÓN UV-C SOBRE LA FLORA NATIVA Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA MEZCLA PARA TÉ COMPUESTO POR TORONJIL (*Melissa officinalis*), ORTIGA (*Urtica dioica*), PEREJIL (*Petroselinum sativum*) Y PAICO (*Chenopodium ambrosioides*) DE COTACACHI. Obtenido de Universidad Tecnologica Equinoccial: http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/5110/1/58287_1.pdf

Services, D. of health and human. (2007).-¿Qué es la medicina complementaria y alternativa ?

Sharapin, N. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Convenio Andrés Bello

Solórzano, A. K. C. (2011). "IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDEOS EN LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE (*Tagetes sp*), (*Tagetes multiflora*) Y (*Tagetes zipaquirensis*) POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS". Biomédica. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i0.530>

Sotelo, C. C. (Agosto de 2010). *Borojo(Borojoa patinoi): Fuente de Polifenoles con actividad antimicrobiana*. Obtenido de VITAE, Revista de la Facultad Química Farmacéutica Colombia. 330 - 335: <https://www.redalyc.org/html/1698/169815641011/>

Universidad Tecnológica, P. (2009). METODOLOGÍAS PARA EVALUAR IN VITRO LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL Methodologies for evaluating the In vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin, (42), 263–268.

Villalobos, L., González, E., Salazar, A., Castro, J., & Juana, R. (2016). The antioxidant epazote effect (*Chenopodium ambrosioides* L.) on raw ground beef. *Nacameh*, 10(2), 35–48. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6015130>

Xinran Li, Fengli Chen, Shuangyang Li, Jun Jia, Huiyan Gu, L. Y. (2016). An efficient homogenate-microwave-assisted extraction of flavonols and anthocyanins from blackcurrant marc: Optimization using combination of Plackett-Burman design and Box-Behnken design, Industrial Crops and Products, 94, 834–847. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669016306628>

Zamora, R. (2019). EFECTO GASTROPROTECTOR DE LA MEZCLA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS Y FLORES DE *Otholobium mexicanum* (CULEN) EN *Rattus norvegicus* var. *Albinus* CON ÚLCERA INDUCIDA. Retrieved from http://repositorio.uladech.edu.pe/bitstream/handle/123456789/11167/EFECTO_GASTROPROTECTOR_ZAMORA_CUZCO_DE_VIZCONDE_ROSSY_KELLY.pdf?sequence=1&isAllowed=y



ANEXOS.

Anexo 1. Materiales y Reactivos

1. Materiales y Reactivos, obtención del extracto seco

- Metanol para análisis

Tabla 14. Características del metanol según Carrión & García (2010).

Metanol Marca Merck Especificaciones fisicoquímicas	
Características	Valor
Pureza	≥ 99%
Densidad	0.79 g/cm ² (0°C)
Solubilidad en agua	Soluble (20 °C)
Masa molar	32.04 g/mol
Punto de fusión	98 °C
Punto de ebullición	64.5 °C

- Agua destilada.

Tabla 15. Características del agua destilada. Según Carrión & García (2010).

Agua destilada Laboratorio del proyecto VLIR de plantas medicinales Especificaciones fisicoquímicas	
Características	Valor
Nitratos y amonio	< 0.2 ppm
Metales pesados	< 1 ppm
Aluminio	< 0.01 ppm m/v
Residuo de evaporación	< 0.001 %
Punto de fusión	-9 °C
Punto de ignición	485 °C



- Acetato de etilo.

Tabla 16. Características Fisicoquímicas del acetato de etilo.

Acetato de etilo Marca Merck Lote No. K46125723447 Especificaciones fisicoquímicas	
Características	Valor
Punto de ebullición	77 °C
Densidad	0,90 g/cm ³
Límite de explosión	2,1-11,5 %
Punto de inflamación	-4 °C
Temperatura de ignición	460 °C
Punto de fusión	-83 °C
Presión de vapor	97hPa (20 °C)
Solubilidad	85,3 g/l

- Reactivo 1 de productos naturales (Difenil-boryl-oxietil amina al 1 % en metanol)
- Reactivo 2 de productos naturales (Polietilenglicol 4000 al 5 % en etanol).
- Escurridor para ensalada UCSAN M123
- Licuadora OSTERIZER® modelo 4655
- Balanza analítica BOECO Ser. No. BBL31
- Balanza de precisión METLER TOLEDO Ser. No. 1129070512
- Circulador de agua y refrigerante OLYMPUS
- Homogenizador Premium Micro (VWR 200®)
- Homogenizador LABQUAKE Ser. No. 1834110944728
- Vortex Mixer VM 300 Ser. No. 912843
- Concentrador al vacío LABCONCO Ser. No. 090502851
- Baño maría con sonicador COLE PARMER ® Ser. No. 08893-21
- Centrífuga SIGMA Ser. No. 120303
- Centrífuga para tubos eppendorf HETTICH Ser. No. 0000761030
- Equipo Manifold SUPELCO



- Sistema de fotodocumentación y cuantificación TLC Visualizer Ser. No. 200239
- Estufa
- Cocineta eléctrica
- Termómetro
- Agitador horizontal NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC Ser. No. 471203
- Rotavapor HEIDOLPH Ser. No. 040819293
- Liofilizador LABCONCO Ser. No. 080587321
- Congelador DIAREI FREEZER
- Tubos de ensayo 5ml
- Tubos de ensayo 2 ml
- Tubos para centrífuga con rotor 11030
- Tubos de 15 ml con tapa rosca
- Tubos de liofilización 40 ml y 80 ml
- Adaptadores para tapones de liofilización
- Tapones de caucho para liofilización
- Pipetas volumétricas 5ml, 10ml
- Pipeta automática BOECO 1000 μ l Ser. No. 8121668
- Pipeta automática EPPENDORF 2-20 μ l Ser. No. 3120000038
- Pipetas pasteur caña corta
- Pipetas pasteur caña larga
- Peras de succión
- Balones fondo redondo para ebullición 100 ml
- Balones fondo redondo 100 ml
- Balones de aforo 100 ml
- Embudos pequeños
- Embudo grande
- Jeringas 20 ml
- Canecas
- Placas sílica gel 9x10 de vidrio 60F₂₅₄
- Cámara cromatográfica de vidrio
- Cubetas de vidrio para cromatografía
- Viales ámbar de 2ml y 4ml
- Tubos eppendorf de 1,5 ml



- Vasos de precipitación 50 ml
- Frascos de mermelada con tapa
- Probeta 100 ml
- Varillas
- Cucharillas
- Cernidor grande
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Rollo de film
- Algodón
- Bolsas pequeñas de sílica gel
- Fundas ziploc medianas
- Fundas de papel pequeñas y medianas
- Recipiente hermético para colocar la droga seca

2. Materiales y reactivos, determinación de la actividad antioxidante por la técnica DPPH.

- Radical 2,2, Difenil-1-picilhidrazilo

Tabla 18. Especificaciones del 2,2-Difenil-1-picrylhidrazilo (Sigma Aldrich 2019)

2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo Marca Sigma-Aldrich Lote No. STQ05724V Especificaciones fisicoquímicas				
Fórmula Química	Estado físico	Masa molar	Densidad	Solubilidad en agua
C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	Sólido cristalino	394.32 g/mol	1.4 Kg /m ³	Insoluble en agua

- (R) -(+)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid 96% (Trolox) marca Sigma Aldrich
- Etanol absoluto.

Tabla 17. Características Fisicoquímicas del etanol absoluto.

Etanol absoluto Marca Merck Lote No. K 48162383630



Especificaciones fisicoquímicas	
Características	Valor
Punto de ebullición	78,3 °C
Densidad	0,790- 0,793 g/cm ³
Límite de explosión	3,1-27,7 %
Punto de inflamación	12 °C
Temperatura de ignición	425 °C
Punto de fusión	-114,5 °C
pH	7,0 (10 g/l, H ₂ O, 20 °C)
Presión de vapor	59 hPa (20 °C)

- Metanol para análisis
- Agua ultrapura
- Agua destilada
- Lector de Microelisa BIOTEK Ser. No. 1610000100147
- Placas de microtitulación
- Pipetas volumétricas 5ml, 10ml
- Pipeta automática BOECO 1000 µl Ser. No. 8121668
- Pipeta automática BOECO 10-100 µl Ser. No. 8076667
- Tubos eppendorf de 1,5 ml
- Balones de aforo 10 ml
- Vasos precipitación 10,100, 250 ml

3. Materiales y reactivos, determinación de la actividad antioxidante por la técnica FRAP

- Ácido Acético.

Tabla 19. Especificaciones del Ácido acético.

Ácido Acético Glacial 100% Lote No. K43516663 221 Especificaciones fisicoquímicas				
Fórmula Química	Estado físico	Masa molar	Densidad	Solubilidad en agua



CH ₃ COOH	Líquido transparente e incoloro	60.05 g/mol	1.05g /m ³ a 20 °C	602.9 g/l soluble
----------------------	---------------------------------	-------------	-------------------------------	-------------------

- Acetato de Sodio 300mM.

Tabla 20. Especificaciones del Acetato de sodio.

Sodium acetate anhydrous for analysis Lote No. A0346568 223 Especificaciones fisicoquímicas			
Fórmula Química	Estado físico	Masa molar	Densidad
CH ₃ COONa	Cristales blancos e higroscópicos	82.03 g/mol	1.53 g/cm ³

- Ácido Clorhídrico 40mM.

Tabla 21. Especificaciones del Ácido clorhídrico fumárico.

Hydrochloric acid fuming 37 % Lote No. K43122517 204 Especificaciones fisicoquímicas				
Fórmula Química	Estado físico	pH	Densidad relativa	Solubilidad en agua
HCl	Líquido	<1	Aprox. 1.19 g /m ³ a 20 °C	a 20 °C soluble

- 2, 4, 6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) 10 mM.

Tabla 22. Especificaciones del 2, 4, 6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine.

2, 4, 6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine for spectrophotometric det. ≥ 98 % Marca Sigma-Aldrich Lote No. BCCB3736 Especificaciones fisicoquímicas					
Fórmula Química	Estado físico	Masa molar	Densidad	Solubilidad en agua	Estabilidad química
C ₁₈ H ₁₂ N ₆	Polvo sólido	312.33 g/mol	1.4 Kg /m ³	Soluble en agua	Estable en condiciones normales



- Cloruro férrico 30mM.

Tabla 23. Especificaciones del Cloruro férrico.

Iron (III) chloride reagent grade 97 % Marca Sigma-Aldrich Lote No. STBH4253 Especificaciones fisicoquímicas				
Fórmula Química	Estado físico	Masa molar	Presión de vapor	Solubilidad en agua
Cl ₃ Fe	Polvo sólido de color marrón	162.20 g/mol	1 mmHg (194 °C)	Soluble en agua

- (R) -(+)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid 96% (Trolox) marca Sigma Aldrich
- Agua ultrapura
- Agua destilada
- Lector de Microelisa BIOTEK Ser. No. 1610000100147
- Placas de microtitulación
- Pipetas volumétricas 5ml, 10ml
- Pipeta automática BOECO 1000 µl Ser. No. 8121668
- Pipeta automática BOECO 10-100 µl Ser. No. 8076667
- Tubos eppendorf de 1,5 ml
- Balones de aforo 10 ml
- Vasos precipitación 10,100, 250 ml
- Frascos ámbar 100, 200 ml
- Cucharillas

4. Materiales y reactivos, determinación de la actividad antibacteriana, técnica de microdilución en placa

- Vortex Mixer VM 300 Ser. No. 912842
- Baño maría con sonicador COLE PARMER ® Ser. No. 3510R-DTH
- Lector de Micro Elisa BIOTEK Ser. No. 1610000100147
- Agitador - Homogenizador de placas. Ser. No.1882090372327
- Pipeta automática 2-20 µl Ser. No. HO8227731
- Pipeta automática 20-200 µl Ser. No. HO822793

- Pipeta automática 100-1000 µl Ser. No. HJO8254
- Distribuidor de multipipetas plus
- Placas estériles de 96 pocillos fondo plano. Marca Costar
- Placas estériles de 96 pocillos fondo "V". Marca Costar
- Combitips de 1ml y 10ml.
- Tubos estériles 15 y 50 ml

Anexo 2. Imágenes: Preparación del material vegetal y extracción de metabolitos secundarios.



Imagen 2. Selección y lavado de la droga vegetal.



Imagen 3. Extracción de metabolitos secundarios, método: Sonicación



Imagen 4. Extracción de metabolitos secundarios, método: Percolación

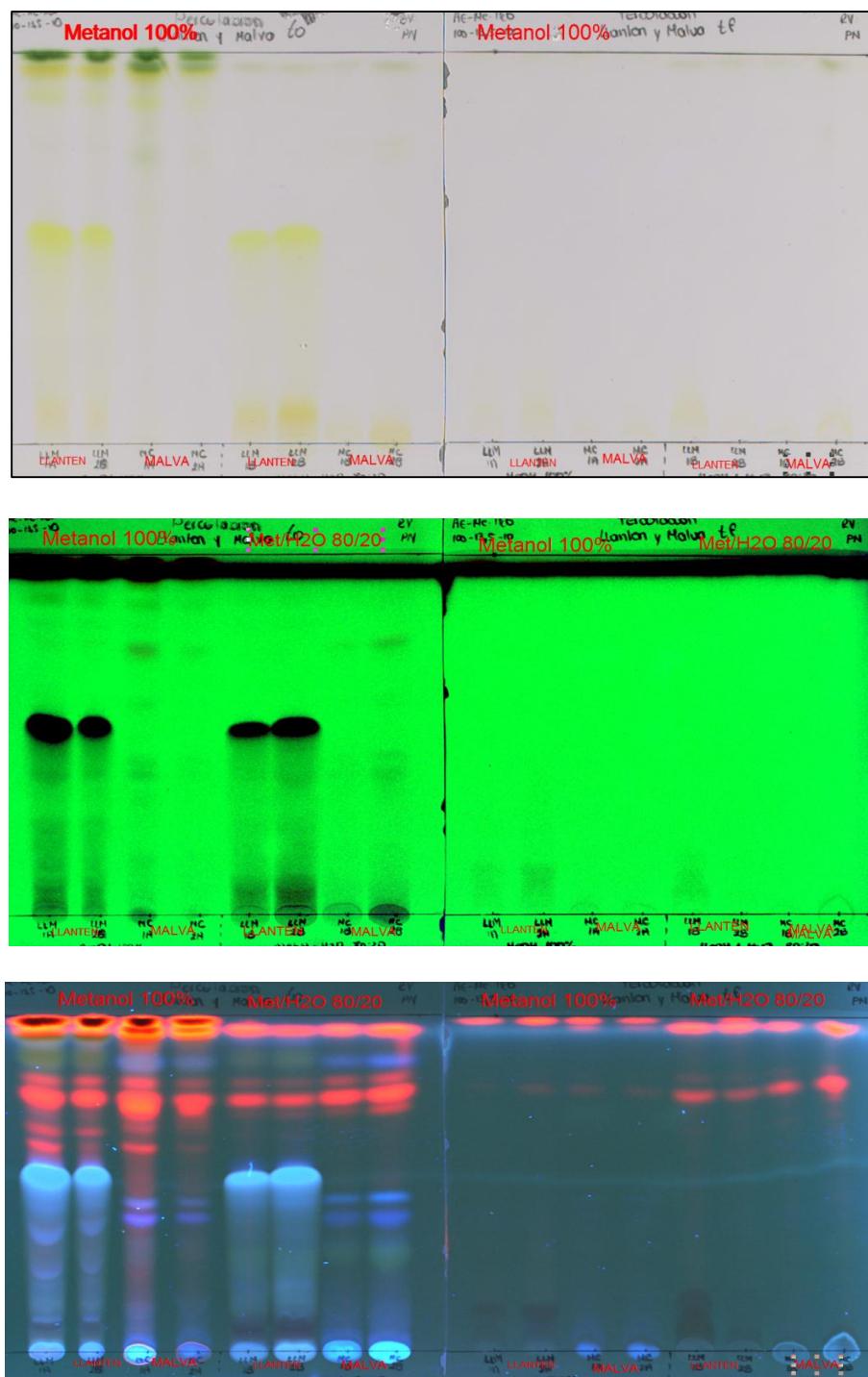


Imagen 5. Corrida cromatográfica: TLC. Método de percolación. Revelado con Productos Naturales.

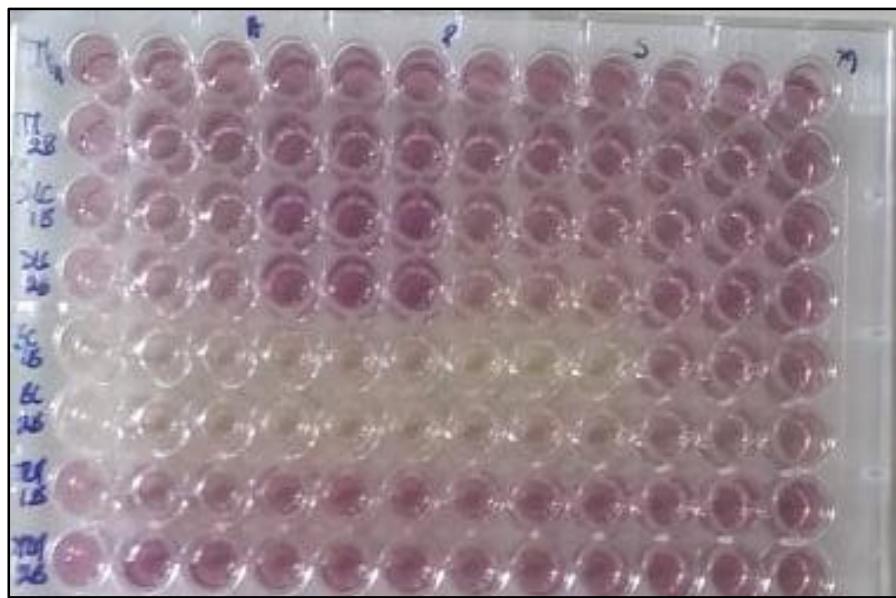
Anexo 3. Imágenes: corrida de actividad antioxidante, técnicas DPPH y FRAP.

Imagen 6. Corrida antioxidante de extractos: metodología DPPH

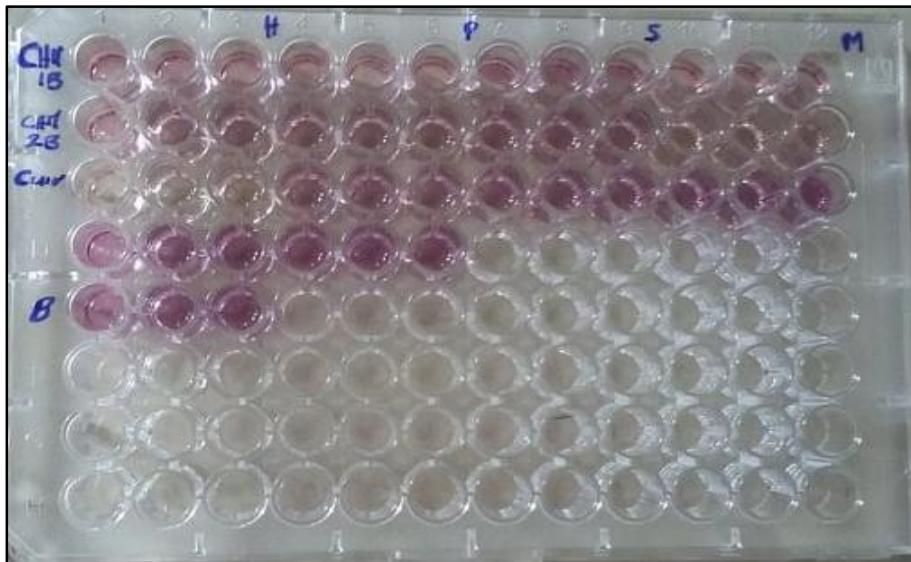


Imagen 7. Corrida antioxidante de extractos y Trolox: metodología DPPH

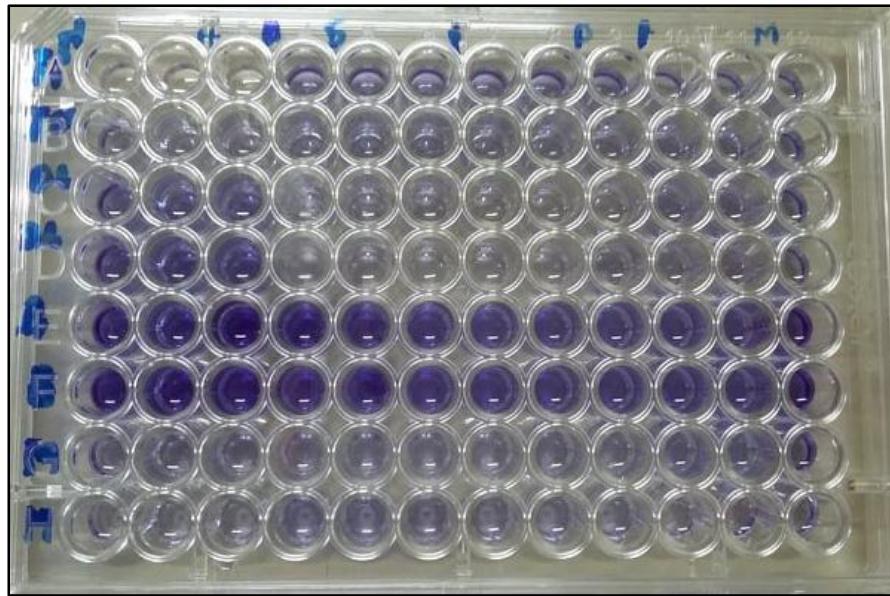


Imagen 8. Corrida antioxidante de extractos: metodología FRAP

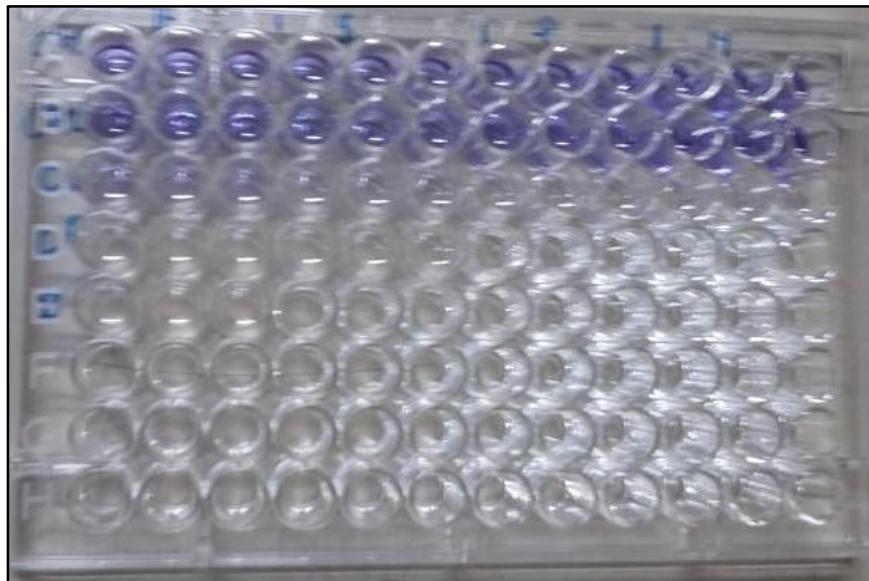


Imagen 9. Corrida antioxidante de extractos y Trolox: metodología FRAP

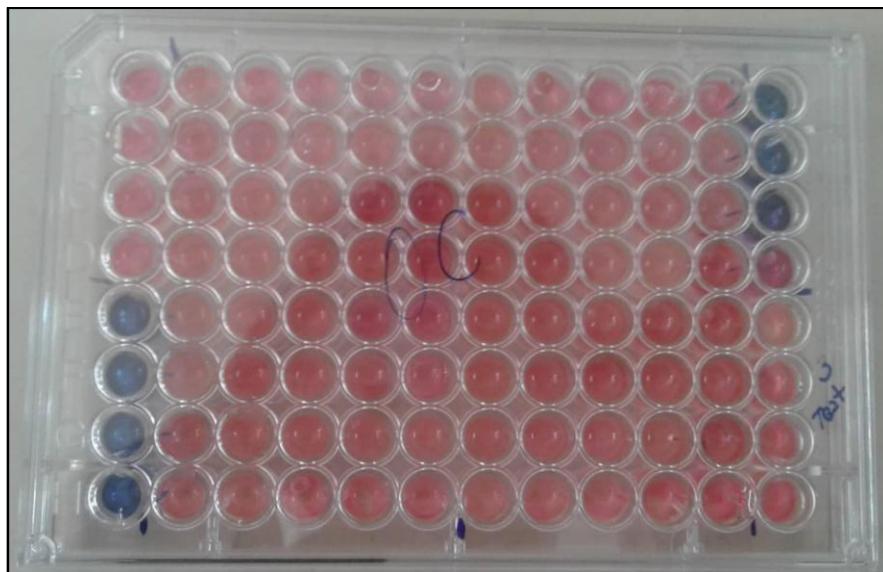
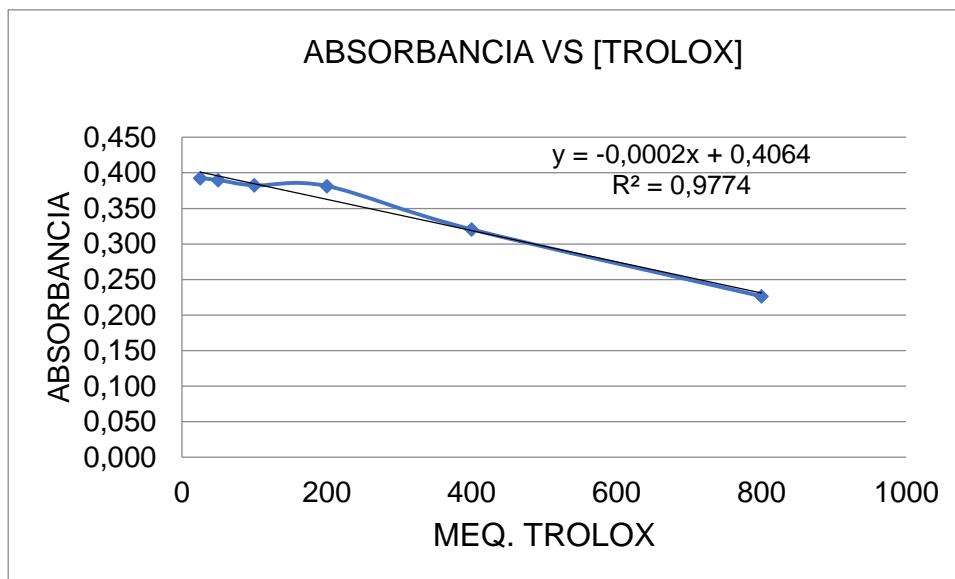
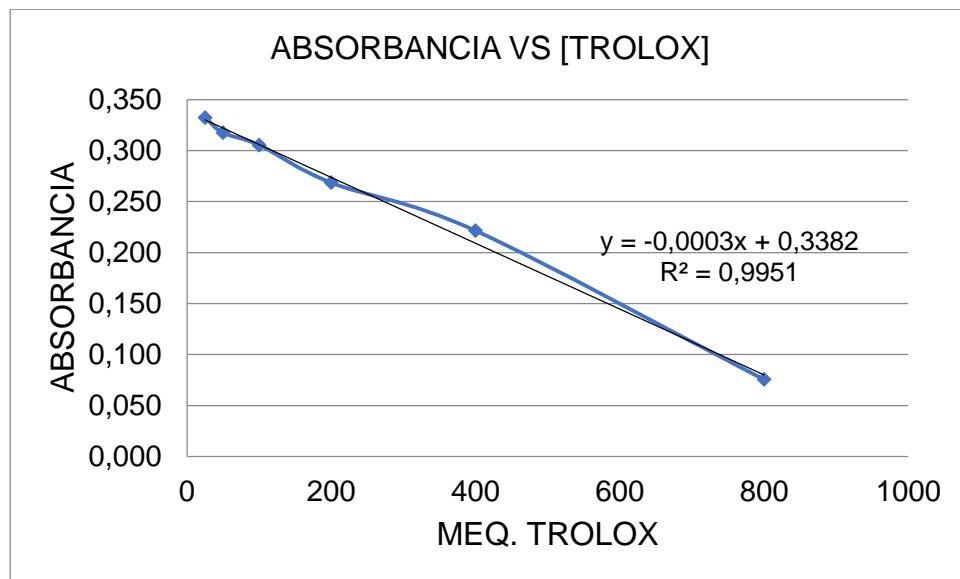


Imagen 10. Corrida antimicrobiana: técnica microdilución en placa.

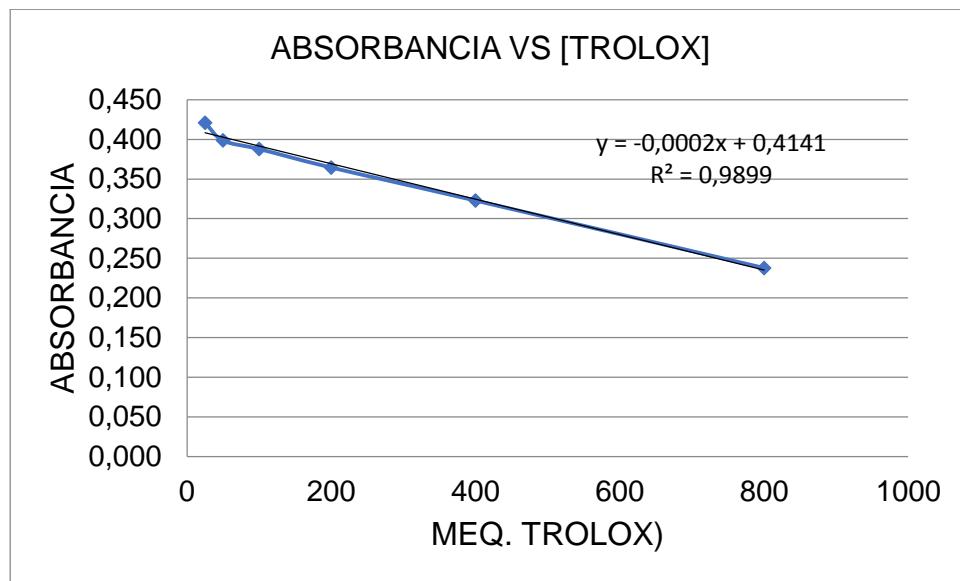
Anexo 4. Graficas: Curvas de calibración, técnicas DPPH y FRAP



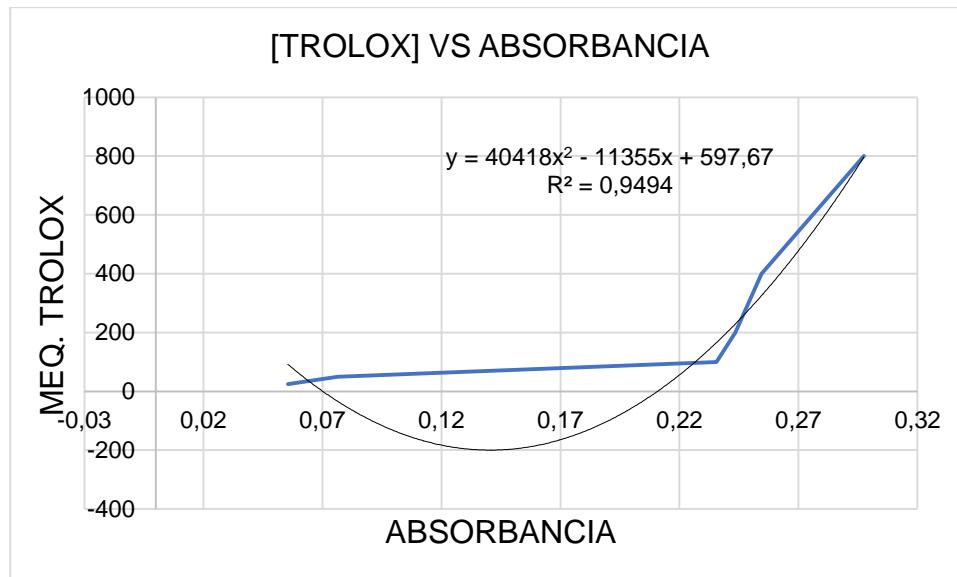
Gráfica 29. Curva de calibración extractos metanólicos, técnica del radical DPPH



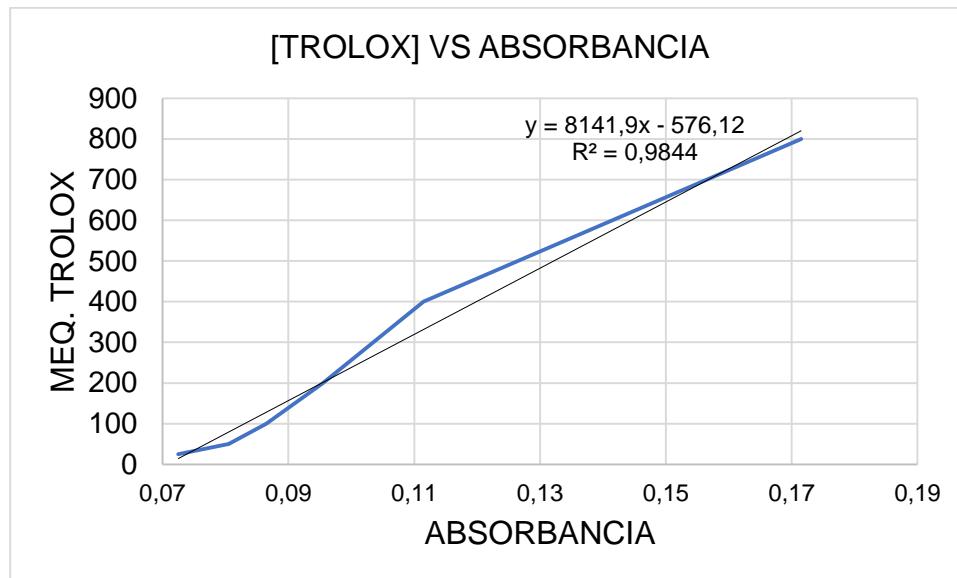
Gráfica 30. Curva de calibración extractos hidroalcohólicos, técnica del radical DPPH



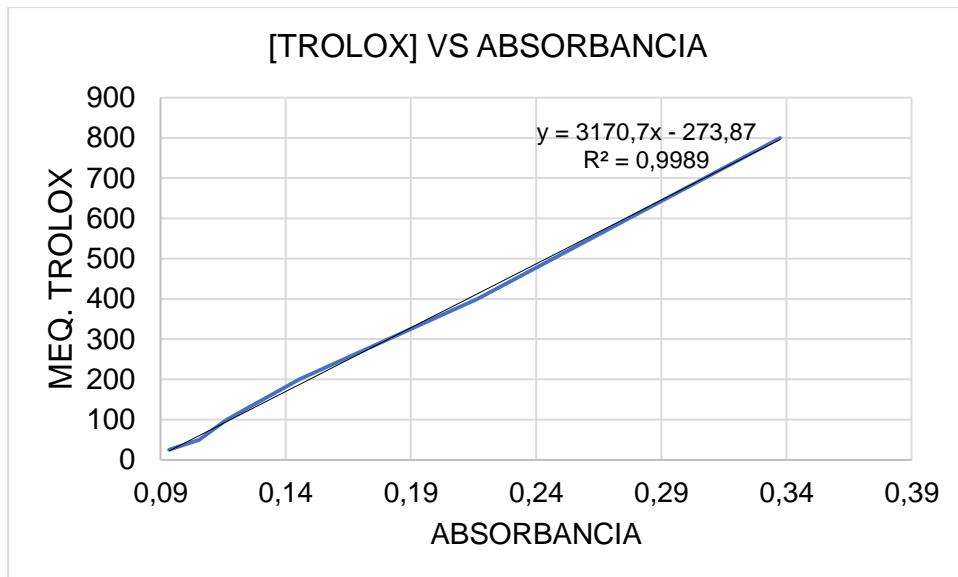
Gráfica 31. Curva de calibración extractos acuosos, técnica del radical DPPH



Gráfica 32. Curva de calibración extractos metanólicos, técnica del FRAP



Gráfica 33. Curva de calibración extractos hidroalcohólicos, técnica del FRAP.



Gráfica 34. Curva de calibración extractos acuosos, técnica del FRAP

**Anexo 5. Tabla resumen: Actividad antioxidante, técnicas DPPH y FRAP.**

Planta	Solvente	Método de extracción	Media de la capacidad antioxidante en Meq. Trolox ± Desviación estándar: Metodología DPPH	Media de la capacidad antioxidante en Meq. Trolox ± Desviación estándar: Metodología FRAP
<i>Otholobium mexicanum</i>	Metanol 100 %	Homogenización	325.1 ± 16.6	10324.4 ± 14.5
	Metanol: H ₂ O 80:20		371.7 ± 17.9	2196.2 ± 3.8
	H ₂ O 100 %		118 ± 3.5	167.9 ± 8.2
	H ₂ O 100 %	Infusión	123.7 ± 4.6	88.6 ± 0.7
	Metanol 100 %	Sonicación	512 ± 27	376 ± 4.5
	Metanol: H ₂ O 80:20		346.2 ± 40.4	1827.1 ± 7.6
	Metanol 100 %	Percolación	500.7 ± 8.8	547.1 ± 0
	Metanol: H ₂ O 80:20		244 ± 9.4	989.8 ± 36.6
	Metanol 100 %	Maceración	556.5 ± 14.1	195.2 ± 9.4
	Metanol: H ₂ O 80:20		334.5 ± 16.5	1832.5 ± 15.3
<i>Taraxacum officinale</i>	Metanol 100 %	Homogenización	621.5 ± 18.4	3611 ± 152.1
	Metanol: H ₂ O 80:20		569 ± 5.8	5660.5 ± 132.4
	H ₂ O 100 %		81.7 ± 2.5	38.9 ± 0.7



	H ₂ O 100 %	Infusión	437.1 ± 3.1	857 ± 24.6
	Metanol 100 %	Sonicación	235.3 ± 4.7	0
	Metanol: H ₂ O 80:20		384 ± 0	4935.9 ± 67.2
	Metanol 100 %	Percolación	270.7 ± 12.5	0
	Metanol: H ₂ O 80:20		29 ± 7	39.9 ± 1.9
	Metanol 100 %	Maceración	346.1 ± 12.6	600.3 ± 16
	Metanol: H ₂ O 80:20		309 ± 10	1837.9 ± 34.5
<i>Borago officinalis</i>	Metanol 100 %	Homogenización	1093 ± 9.1	25247.1 ± 551.7
	Metanol: H ₂ O 80:20		911.7 ± 3.2	5443.4 ± 193.6
	H ₂ O 100 %		254.2 ± 2.5	0
	H ₂ O 100 %	Infusión	943 ± 17	1300.3 ± 38.8
	Metanol 100 %	Sonicación	1084.9 ± 3.4	20381.3 ± 747.7
	Metanol: H ₂ O 80:20		709.8 ± 8.2	7926.7 ± 236
	Metanol 100 %	Percolación	1087.8 ± 7.9	14247.8 ± 261.9
	Metanol: H ₂ O 80:20		901.7 ± 5.4	7128.1 ± 313.7
	Metanol 100 %	Maceración	1092 ± 15	18167.9 ± 873.2
	Metanol: H ₂ O 80:20		603.4 ± 7.8	4588.5 ± 159.2
<i>Matricaria chamomilla</i>	Metanol 100 %	Homogenización	326.5 ± 15.7	23.6 ± 0
	Metanol: H ₂ O 80:20		140.6 ± 7	2851.6 ± 109.3
	H ₂ O 100 %		83 ± 7	0



	H ₂ O 100 %	Infusión	268 ± 10.6	104 ± 4.4
	Metanol 100 %	Sonicación	474.5 ± 14.1	302.9 ± 10.6
	Metanol: H ₂ O 80:20		342.8 ± 17	1976.3 ± 84.4
	Metanol 100 %	Percolación	442.8 ± 19.1	271.8 ± 4.1
	Metanol: H ₂ O 80:20		232.3 ± 11.7	1459.3 ± 17.2
	Metanol 100 %	Maceración	635.1 ± 6.1	952.6 ± 16
	Metanol: H ₂ O 80:20		307.6 ± 6.8	2304.7 ± 15.3
	Metanol 100 %	Homogenización	847 ± 7	8341.6 ± 140.1
	Metanol: H ₂ O 80:20		733.4 ± 16.6	1234.1 ± 33.9
	H ₂ O 100 %		74.2 ± 5.3	80.1 ± 0.7
<i>Urtica urens</i>	H ₂ O 100 %	Infusión	474.2 ± 23.7	497.6 ± 15.6
	Metanol 100 %	Sonicación	312 ± 14.1	140 ± 6.9
	Metanol: H ₂ O 80:20		274.3 ± 5.3	2265.4 ± 1.9
	Metanol 100 %	Percolación	274.5 ± 10.6	460.9 ± 12.1
	Metanol: H ₂ O 80:20		341.2 ± 14	2405.1 ± 57.5
	Metanol 100 %	Maceración	407.8 ± 15.8	257.4 ± 12.1
	Metanol: H ₂ O 80:20		338.1 ± 15.3	2447.2 ± 67.1
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Metanol 100 %	Homogenización	162 ± 7	0
	Metanol: H ₂ O 80:20		37.3 ± 7	187.1 ± 8.6
	H ₂ O 100 %		56.7 ± 1.7	0



	H ₂ O 100 %	Infusión	70.5 ± 7	0
	Metanol 100 %	Sonicación	249.5 ± 7	0
	Metanol: H ₂ O 80:20		185.6 ± 7	324.9 ± 5.7
	Metanol 100 %	Percolación	268.2 ± 12.3	0
	Metanol: H ₂ O 80:20		110.6 ± 3.5	113.9 ± 2.8
	Metanol 100 %	Maceración	150.7 ± 5.3	0
	Metanol: H ₂ O 80:20		31.5 ± 5.8	126.8 ± 1.9
<i>Malva officinalis</i>	Metanol 100 %	Homogenización	160.7 ± 7.5	0
	Metanol: H ₂ O 80:20		70.6 ± 3.3	228.5 ± 7.7
	H ₂ O 100 %		68 ± 3.5	0
	H ₂ O 100 %	Infusión	214.6 ± 3.8	510.8 ± 22.4
	Metanol 100 %	Sonicación	169 ± 2.7	0
	Metanol: H ₂ O 80:20		80.6 ± 0.4	172.9 ± 5.8
	Metanol 100 %	Percolación	201.5 ± 14	0
	Metanol: H ₂ O 80:20		113.4 ± 2.6	374.4 ± 14.4
	Metanol 100 %	Maceración	119.5 ± 5	45.8 ± 0
	Metanol: H ₂ O 80:20		112.3 ± 2.9	467.4 ± 11.5
<i>Plantago major</i>	Metanol 100 %	Homogenización	912 ± 9.6	13689.8 ± 144
	Metanol: H ₂ O 80:20		323.4 ± 7.3	11017.2 ± 288.8
	H ₂ O 100 %		51.3 ± 3.9	0



	H ₂ O 100 %	Infusión	709.6 ± 1.9	1116.4 ± 0
	Metanol 100 %	Sonicación	693.2 ± 4	35577.4 ± 69.8
	Metanol: H ₂ O 80:20		461.2 ± 6.4	3459.5 ± 1.9
	Metanol 100 %	Percolación	837.3 ± 2	8091. 3 ± 371
	Metanol: H ₂ O 80:20		569.8 ± 10.8	4144.8 ± 7.6
	Metanol 100 %	Maceración	583.2 ± 2.5	6771.4 ± 225.5
	Metanol: H ₂ O 80:20		533.1 ± 1.6	4922.3 ± 1.9
	Metanol 100 %	Homogenización	528.6 ± 10	809.5 ± 6
	Metanol: H ₂ O 80:20		415.1 ± 10.4	3002.2 ± 3.8
	H ₂ O 100 %		40.9 ± 15.1	84.9 ± 2.9
<i>Tagetes terniflora</i>	H ₂ O 100 %	Infusión	637.1 ± 19.1	749.2 ± 20.1
	Metanol 100 %	Sonicación	362.4 ± 17.2	140 ± 6.9
	Metanol: H ₂ O 80:20		347.8 ± 0.9	2117.1 ± 0
	Metanol 100 %	Percolación	507 ± 11.5	476.5 ± 4.9
	Metanol: H ₂ O 80:20		482.3 ± 19.5	3738.4 ± 0.9
	Metanol 100 %	Maceración	312.8 ± 2	60.6 ± 2.2
	Metanol: H ₂ O 80:20		604.5 ± 1.9	4566.8 ± 94

