



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA



Determinación del efecto antioxidante y antimicrobiano de extractos de diferentes tipos de ortiga (*Urtica dioica*, *Urtica urens*, *Urtica leptophylla*, *Urtica baccifera*) frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*.

Informe Final de Integración Curricular, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniero Biotecnólogo, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Kevin Daniel Mariño Manzano

Tutor: Msc. María Daniela Garcés Moncayo

Ambato – Ecuador

Marzo - 2023

APROBACIÓN DEL TUTOR

Msc. María Daniela Garcés Moncayo

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final de Integración Curricular ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final de Integración Curricular bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Titulación y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 14 de febrero del 2023

.....
Msc. María Daniela Garcés Moncayo

C.I. 180357158-5

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Kevin Daniel Mariño Manzano, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas bibliográficas.



.....
Kevin Daniel Mariño Manzano

C.I. 180469725-6

AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Por constancia firman:

.....

Presidente de Tribunal

.....

PhD. William Ricardo Calero Cáceres

CI. 1714344885-9

.....

PhD. Liliana Paulina Lalaleo Córdova

CI. 180360185-3

Ambato, 03 de marzo de 2023

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga del presente Informe Final de Integración Curricular o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final de Integración Curricular, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



.....
Kevin Daniel Mariño Manzano

C.I. 180469725-6

AUTOR

DEDICATORIA

A mis padres Víctor y Dora, por su apoyo incondicional en mi camino universitario, por ofrecerme sus consejos de vida y darme la oportunidad de estudiar.

A mis hermanas Karen y Victoria por acompañarme en todo momento y por ser quienes me han impulsado a perseguir mis metas.

A mis abuelitos, Guido y Carmen quienes me han ayudado en todo momento para que este anhelo se haga realidad.

A mis tías, Katy y Ximena por sus consejos y apoyo incondicional

A toda mi familia que ha estado siempre al pendiente de este largo caminar fomentando en mí, el deseo de superación y de triunfo en la vida. Lo que ha contribuido a la consecución de este logro.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme dado la vida y fuerzas para alcanzar una meta más en mi vida.

A mis padres, por guiarme durante todo mi vida

A mis abuelitos por apoyarme y motivarme a seguir adelante

A mi tutora Msc María Daniela Garcés por apoyarme y guiarme en la realización de este proyecto de investigación

Al PhD. Irvin Tubón por compartirme sus conocimientos y ayudarme en la realización de este trabajo de titulación

A mis amigos con los que compartí agradables momentos durante toda la carrera

A mis amadas mascotas, Jack, Beto y Charly que en su momento me brindaron alegrías y sonrisas.

A mis docentes de la FCIAB, por haberme formado profesionalmente con sus conocimientos y enseñanzas compartidas en toda la carrera.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPITULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	1
1.1.1. Flora del Ecuador.....	1
1.1.2. Plantas medicinales.....	1
1.1.3. Especies vegetales (ortigas).....	2
1.1.3. Actividad antimicrobiana.....	6
1.2. Objetivos.....	8
1.2.1. Objetivo general.....	8
1.2.2. Objetivos específicos.....	8
1.3. Hipótesis.....	9
1.3.1. Hipótesis nula.....	9
1.3.2. Hipótesis alternativa.....	9
1.4. Variables.....	9
1.4.1. Variable independiente.....	9
1.4.2. Variable dependiente.....	9

CAPÍTULO II	10
METODOLOGÍA	10
2.1. Materiales.....	10
2.1.1. Material vegetal.....	10
2.1.2. Material biológico	10
2.1.3. Reactivos de laboratorio.....	10
2.1.4. Equipos de laboratorio	11
2.1.5. Instrumentos de laboratorio.....	11
2.1.6. Insumos	12
2.2. Métodos	12
2.2.1. Tipo de investigación	12
2.2.2. Población y muestra	13
2.2.3. Obtención de los extractos	13
2.2.4. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB).....	15
2.2.5. Actividad antioxidante	18
2.2.6. Cuantificación de fenoles totales	19
CAPÍTULO III.....	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
3.1. Análisis y discusión de resultados	20
3.1.1. Rendimiento de los extractos.....	20
3.1.2. Actividad antioxidante.....	21
3.1.3. Compuestos fenólicos totales.....	26
CAPITULO IV	32
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	32
BIBLIOGRAFÍA.....	34

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características morfológicas de los diferentes tipos de ortiga	2
Tabla 2. Concentración Mínima Inhibitoria de extractos de ortiga frente a distintos microorganismos.	6
Tabla 3 Rendimiento de los extractos de los diferentes tipos de ortiga	20
Tabla 4 Porcentaje de inhibición de los radicales de DPPH de los extractos de diferentes especies de ortiga.....	22
Tabla 5 Capacidad antioxidante en equivalentes Trolox de las matrices vegetales	23
Tabla 6 Concentración de extractos necesaria para inhibir el 50% de radicales DPPH.....	26
Tabla 7 Contenido de fenoles totales de los extractos provenientes de cada especie vegetal.	28
Tabla 8 Concentración mínima inhibitoria de los diferentes extractos frente a cuatro cepas bacterianas.....	29
Tabla 9 Concentración mínima bactericida de los diferentes extractos frente a cuatro cepas bacterianas.....	30

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Clasificación taxonómica de las distintas especies de ortiga.	5
Figura 2	Distribución geográfica de las distintas especies de ortiga analizadas....	4
Figura 3	Representación gráfica de la primera fase de la preparación de la placa de microtitulación.....	16
Figura 4	Representación gráfica de la segunda y tercera fase de la preparación de la placa con distintas diluciones.....	16
Figura 5	Representación de la metodología aplicada en la evaluación de la actividad antimicrobiana.....	18
Figura 6	Porcentajes de Inhibición de DPPH a distintas concentraciones de los extractos vegetales	24
Figura 7	Curva de calibración para Trolox	55
Figura 8	Curva de calibración de ácido gálico.....	56
Figura 9 y 10	Macerado de los extractos y extracción Soxhlet	59
Figura 11	Extractos etanólicos	59
Figura 12 y 13	Extracto etanólico y metanólico de <i>U. urens</i>	59
Figura 15 y 16	Soluciones stock para actividad antioxidante y antimicrobiana.....	60
Figura 17	Primera dilución de los extractos etanólicos	61
Figura 18	Primera dilución de los extractos metanólicos	61
Figura 19	Segunda y tercera dilución de los extractos metanólicos.	62
Figura 20	Actividad antioxidante de los extractos etanólicos.....	62
Figura 21	Actividad antioxidante de los extractos metanólicos	63
Figura 22	Cuantificación del contenido fenólico.....	63

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A. Certificado de la identificación taxonómica de las especies vegetales..	43
ANEXO B. Autorización de recolección de especímenes de especies de la diversidad biológica.....	44
ANEXO C. Análisis estadístico para el rendimiento de los extractos.	46
ANEXO D. Análisis estadístico de actividad antioxidante	46
ANEXO E. Análisis estadístico de los compuestos fenólicos totales.	49
ANEXO F. Análisis estadístico de la actividad antimicrobiana.....	49
ANEXO G. Absorbancia de los extractos en la inhibición de DPPH.	52
ANEXO H. Curvas de calibración	55
ANEXO I. Concentración Mínima Inhibitoria.....	56
ANEXO J. Fotografías	59

RESUMEN

Las plantas medicinales se han convertido en una esperanza para el desarrollo de medicinas alternativas, por tal razón, la OMS promueve el estudio de medicamentos a base de fuentes vegetales, ya que con frecuencia generan escasos efectos secundarios, mínima toxicidad y combaten la resistencia antimicrobiana. La familia *Urticaceae* posee un alto índice de moléculas bioactivas. La presente investigación se enfoca en evaluar la actividad biológica de los extractos hidroalcolólicos (EtOH) y metanólicos (MtOH) provenientes de cuatro especies de ortiga. Inicialmente se realizó la extracción, que arrojó rendimientos variables, destacando como mejor resultado el MtOH de *U. dioica* correspondiente a 2,487 por ciento. La capacidad antioxidante se determinó mediante la técnica DPPH, todos los extractos presentan actividad antioxidante considerable, sin embargo, el MtOH de *U. baccifera* inhibió un equivalente a 435,80 micromoles de Trolox por litro. La cuantificación de fenoles totales se midió mediante el ensayo Folin-Ciocalteu, con el cual se demostró que los EtOHs superan a los MtOHs. La extracción hidroalcohólica de *U. dioica* mostró una mayor cantidad de compuestos fenólicos (87,840 miligramos de ácido gálico por gramo). La actividad antimicrobiana se estimó mediante el método de microdilución en placas de 96 pocillos basado en resazurina, con lo cual se determinó la CMI y CMB. Los extractos que inhibieron a una menor concentración fueron: el MtOH de *U. baccifera* y *U. urens* a *E. coli* y *B.cereus*, EtOH de *U. urens* y *U. dioica* a *S. aureus* y *L. monocytogenes*, respectivamente. En conclusión, los extractos vegetales analizados poseen actividad biológica considerable.

Palabras clave: Extractos vegetales, actividad antioxidante, actividad antimicrobiana, fenoles totales, moléculas bioactivas, bacterias.

ABSTRACT

Medicinal plants have become a hope for the development of alternative medicines, for this reason, the WHO promotes the study of medicines based on plant sources, since they frequently generate few side effects, minimal toxicity and combat antimicrobial resistance. The *Urticaceae* family has a high index of bioactive molecules. This research focuses on evaluating the biological activity of hydroalcoholic (EtOH) and methanolic (MtOH) extracts from four nettle species. Initially, the extraction was carried out, which yielded variable yields, highlighting the MtOH of *U. dioica* corresponding to 2.487 percent as the best result. The antioxidant capacity was determined using the DPPH technique, all the extracts present considerable antioxidant activity, however, the MtOH of *U. baccifera* inhibited an equivalent to 435.80 micromoles of Trolox per liter. The quantification of total phenols was measured by the Folin Ciocalteu assay, which demonstrated that EtOHs exceed MtOHs. The hydroalcoholic extraction of *U. dioica* showed a higher amount of phenolic compounds (87,840 milligrams of gallic acid per gram). The antimicrobial activity was estimated by the microdilution method in 96-well plates based on resazurin, with which the MIC and MBC were determined. The extracts that inhibited at a lower concentration were: MtOH from *U. baccifera* and *U. urens* to *E. coli* and *B.cereus*, EtOH from *U. urens* and *U. dioica* to *S. aureus* and *L. monocytogenes*, respectively. In conclusion, the analyzed plant extracts have considerable biological activity.

Keywords: Plant extracts, antioxidant activity, antimicrobial activity, total phenols, bioactive molecules, bacteria.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

1.1.1. Flora del Ecuador

Dieciocho países megadiversos albergan el 70% de todas las especies del mundo (Scarano *et al.*, 2021), entre ellos Ecuador, que con sólo el 0,06% de la superficie terrestre mundial es considerado el país más biodiverso por unidad de superficie del mundo (Mestanza *et al.*, 2020). Incomparablemente, aloja alrededor del 10% de todas las especies vegetales del planeta (Velasquí, 2018), específicamente se han descrito científicamente un total de 25560 especies, de las cuales el 5348 (20,92%) son endémicas (Vargas, 2002). Aproximadamente, 10 000 crecen en la región Andina, 8200 en la Amazonía, 6300 en la región Litoral y 850 en Galápagos (Velasquí, 2018).

1.1.2. Plantas medicinales

Las plantas son fábricas químicas vivientes que biosintetizan una gran variedad de metabolitos secundarios, que constituyen la base de diversos medicamentos comerciales y remedios herbales (Li *et al.*, 2020). De hecho, los alcaloides, los terpenoides y los fenilpropanoides son metabolitos de gran valor para la industria farmacéutica (Sanchita & Sharma, 2018). Dichos componentes químicos son aprovechados principalmente en la fabricación de fármacos y alimentos, dado a que poseen actividad biológica; pero también, son muy valiosos en las industrias de perfumería, agroquímica y cosmética (Rasool, 2012). Por tal razón, se define como planta medicinal a toda especie vegetal que posee propiedades terapéuticas o ejercen un efecto farmacológico beneficioso sobre el organismo humano o animal (Namdeo, 2018).

Las plantas medicinales se han convertido en una esperanza para el desarrollo de medicinas alternativas (Getachew *et al.*, 2022), por esta razón, la Organización Mundial de la Salud (OMS), propone un estudio exhaustivo de medicamentos a base de plantas, ya que con frecuencia generan escasos efectos secundarios, son menos tóxicos (OMS, 2016) y combaten la resistencia a los antibióticos. (Shin *et al.*, 2018). Además se estima

que, de 300000 plantas existentes, únicamente el 15% han sido analizadas con el fin de determinar su potencial farmacológico (Palhares *et al.*, 2015). En Ecuador, se han identificado propiedades medicinales en más 3118 especies de plantas. (Caballero-Serrano *et al.*, 2019)

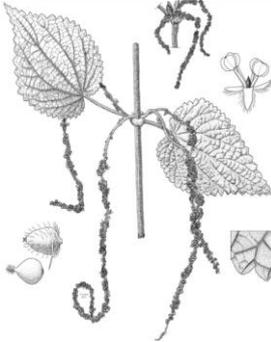
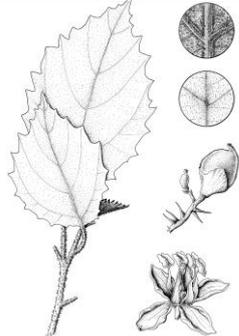
De acuerdo con la OMS, entre el 65% y el 80% de las personas que habitan en países en vías de desarrollo usan plantas medicinales como remedio (OMS, 2019). Además, en todo el mundo se están llevando a cabo estudios que demuestran la eficacia y la importancia de las plantas medicinales (Palhares *et al.*, 2015) esto se ve reflejado en el mercado global de medicamentos derivados de plantas, cuyo tamaño en el 2020, alcanzó los 185 860 millones de dólares y se estima que escale hasta los 430 050 millones de dólares en 2028 (Fortune Business Insights, 2022).

1.1.3. Especies vegetales (ortigas)

1.1.3.1. Descripción botánica

Tabla 1. Características morfológicas de los diferentes tipos de ortiga.

Características	Especies vegetales			
	<i>U. dioica</i>	<i>U. urens</i>	<i>U. leptophylla</i>	<i>U. baccifera</i>
Nombres populares	<ul style="list-style-type: none"> • Ortiga mayor • Ortiga verde 	<ul style="list-style-type: none"> • Ortiga menor • Ortiga blanca 	<ul style="list-style-type: none"> • Ortiga de monte • Ortiga macho 	<ul style="list-style-type: none"> • Ortiga brava
Tamaño	50 cm a 1,5 m.	15 a 50 cm.	40 cm a 1,5 m	1,5 m a 2,5 m
Hojas	<ul style="list-style-type: none"> • Lanceoladas a ovadas, de 5 a 15 cm de largo. • Borde aserrado • Pecíolos de 1 a 3 cm de largo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Opuestas, simples de 4 a 6 cm de largo. • Borde aserrado • Pecíolos de 0,5 a 2 cm de largo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Opuestas, decusadas de 5 a 12 cm de largo. • Borde crenado • Pecíolos de 1 a 3,5 cm de largo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ovadas oblongas, de 200 a 40 cm de largo. • Borde aserrado a dentado. • Pecíolos de 2 a 20 cm.

Flores	<ul style="list-style-type: none"> • Color verde amarillento. • Inflorescencias en panículas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Color verde, blanco o amarillento • Inflorescencias en panículas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Color verde claro o amarillento. • Inflorescencias en espiga. 	<ul style="list-style-type: none"> • Color púrpura rojizo. • Inflorescencias en panículas.
Tallos	<ul style="list-style-type: none"> • Cuadrangulares • Erguidos • Delgados 	<ul style="list-style-type: none"> • Acanalados • Erguidos • Ramificados 	<ul style="list-style-type: none"> • Acanalados • Erguidos • Delgados 	<ul style="list-style-type: none"> • Gruesos • Erguidos • Lisos
Fruto	Aquenio ovado	Aquenio liso	Aquenio liso ovado	Aquenio aplanado ovado
Imagen				

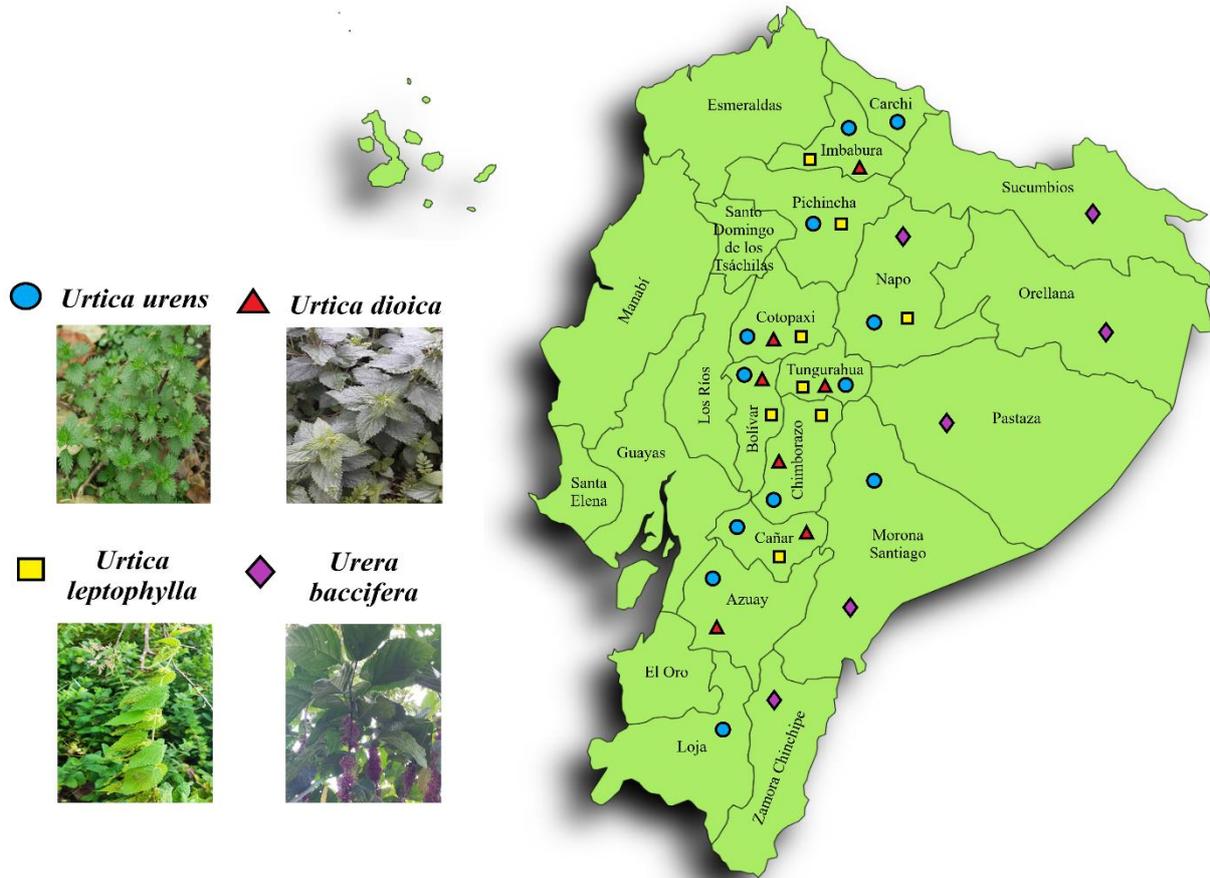
Nota: La presente tabla compara las principales características fisiológicas de las especies mencionadas.

Adaptado de: Gutiérrez *et al.*, (2020); Romoleroux *et al.*, (2016); Pomboza *et al.*, (2016); Guamán, (2015), Weigend *et al.*, (2013); Thomé, (2011).

Los géneros *Urtica* y *Urera*, pertenecen a una misma familia (*Urticaceae*), por lo cual comparten algunas particularidades, como su coloración (verde), la presencia de flores unisexuales (Gutiérrez *et al.*, 2020; Romoleroux *et al.*, 2016; Weigend *et al.*, 2013) y pelos urticantes que las envuelve por completo, aunque en el caso de las *Urticas* estas se presentan como delgadas vellocidades translúcidas (Romoleroux *et al.*, 2016) y en las *Ureras* como espinas (Gutiérrez *et al.*, 2020). Sin embargo, existen características morfológicas en las que difieren totalmente, como las que se detallan en la *tabla 1*.

1.1.3.2. Hábitat

Figura 1 Distribución geográfica de las distintas especies de ortiga analizadas.

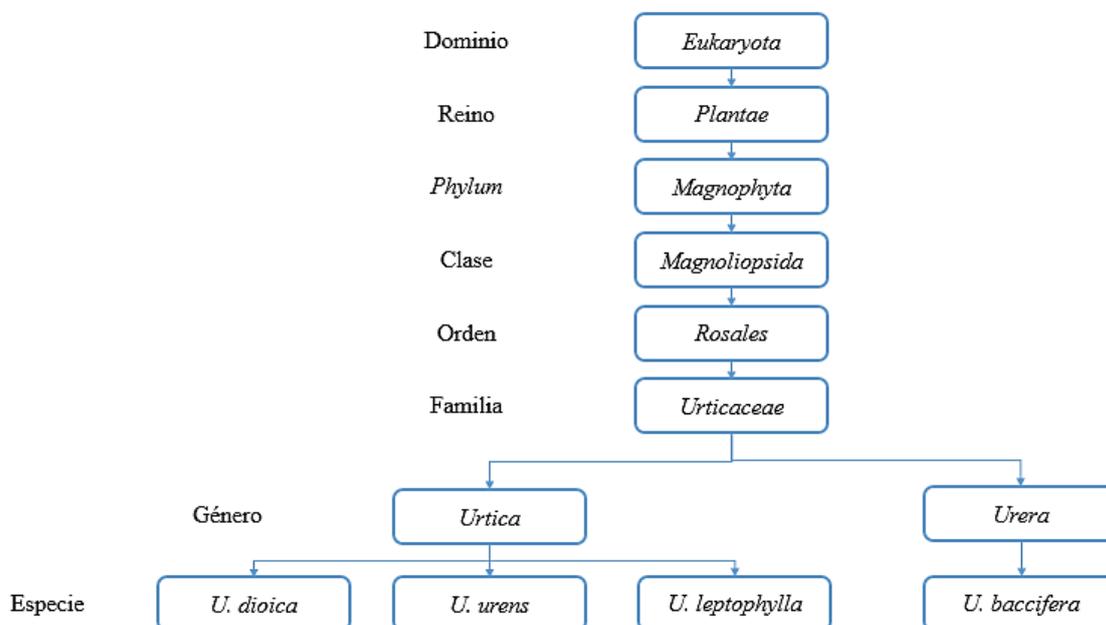


Nota: La figura muestra las provincias en las que se desarrollan las especies de ortiga estudiadas. **Fuente:** Elaboración Propia. **Adaptado de:** ARCSA, (2015); Romoleroux *et al.*, (2016) ; Pomboza *et al.*, (2016).

Las especies del género *Urtica* que habitan en el país, se desarrollan principalmente en la región Andina, en terrenos húmedos ricos en nitrógeno, con un pH variable entre 6.3 y 7.2 y a una altura de 1500 a 4000 msnm. (Pomboza *et al.*, 2016; Romoleroux *et al.*, 2016). Mientras que, el género *Urera* prolifera en zonas húmedas a una elevación de 500-2.800 msnm (MAE, 2015). *U. leptophylla* y *U. baccifera* son plantas nativas del Ecuador (MAE, 2015; Romoleroux *et al.*, 2016), a diferencia de *U. dioica* y *U. urens*, que son especies introducidas, originarias de Europa y Asia (Morales *et al.*, 2016). La distribución geográfica de estas plantas en el Ecuador se puede apreciar en la figura 2.

1.1.3.2. Clasificación taxonómica

Figura 2 Clasificación taxonómica de las distintas especies de ortiga.



Nota: La figura representa la clasificación taxonómica de *U. dioica*, *U. urens*, *U. leptophylla* y *U. baccifera*. Adaptado de: **Romoleroux et al., (2016)**

1.1.3.4. Composición química

Las ortigas poseen diferentes compuestos biológicamente activos (**Kregiel et al., 2018**), destaca la presencia de flavonoides, ácido fórmico, ácidos grasos, proteínas, vitaminas A,B, C, D, E, F, K y P, carotenoides, terpenoides, esteroides, compuestos polifenólicos, aminoácidos esenciales, clorofila, taninos, isolectinas, carbohidratos, polisacáridos y minerales principalmente calcio, hierro, magnesio, fósforo, potasio y sodio. (**Begić et al., 2020; Kregiel et al., 2018; Mzid et al., 2017**). De igual manera, disponen de neuromoduladores, como la acetilcolina, histamina, serotonina y colina (**Begić et al., 2020**).

1.1.3.5. Usos

Estas plantas han sido utilizadas durante años en la medicina tradicional, con el fin de tratar patologías relacionadas con el estrés oxidativo e inflamación, como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes, aterosclerosis, artritis, reumatismo, eccema, hemorragias, hiperplasia prostática benigna y cáncer (**Bourgeois et al., 2016; Carvalho et al., 2017**). Adicionalmente, las hojas son empleadas como antiinflamatorio, antirreumático, diurético, para tratar hemorroides, pérdida del cabello, infecciones urinarias, enfermedades de la piel y trastornos gástricos (**Gutiérrez et al., 2020**). Asimismo, se emplean en la industria cosmética como un completo antienvjecimiento (**Bourgeois et al., 2016**).

1.1.3. Actividad antimicrobiana

Los antimicrobianos son agentes con la capacidad de destruir microorganismo o inhibir su multiplicación y desarrollo (**Girón, 2018**). Investigaciones preliminares revelan que los extractos etanólicos, exánicos, metanólicos y acuosos provenientes de distintas especies de ortiga resultan eficaces al momento de combatir diferentes cepas microbianas (**Kregiel et al., 2018**).

Tabla 2. Concentración Mínima Inhibitoria de extractos de ortiga frente a distintos microorganismos.

Microorganismo	Concentración Mínima Inhibitoria
<i>Escherichia coli</i>	36,21 mg/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	72,43 mg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> SARM	66,66 mg/ml
<i>Bacillus cereus</i>	16,66 mg/ml
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	16,66 mg/ml

<i>Bacillus subtilis</i>	36,21 mg/ml
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4,16 mg/ml
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,08 mg/ml

Nota: La presente tabla muestra la concentración mínima extractos de ortiga necesarios para inhibir el crecimiento bacteriano. **Adaptado de: Jyoti et al., (2016); Kregiel et al., (2018); Mzid et al., (2017); Velasco et al., (2021)**

1.1.4. Actividad antioxidante

Los radicales libres del oxígeno son moléculas inestables y altamente reactivas, que se originan como consecuencia del metabolismo aeróbico fisiológico normal (**Carvajal, 2019**). Estos radicales interactúan directamente con moléculas del sistema biológico, afectando potencialmente el ADN, las proteínas y los lípidos (**Rodrigues et al., 2019**). Además, su acumulación promueve el desarrollo de afecciones metabólicas, cardiovasculares, neurodegenerativas y otras crónicas (**Rodrigues et al., 2019**). Favorablemente, se puede neutralizar estos radicales mediante metabolitos secundarios denominados antioxidantes, tales como los polifenoles, los ácidos fenólicos y los flavonoides provenientes de especies vegetales (**Rets'epile et al., 2020**). En diversas investigaciones, se ha confirmado el valor biológico de las ortigas, destacando su significativa actividad antioxidantes, gracias a su alto contenido de fenoles, polifenoles y taninos (**Begić et al., 2020; Mzid et al., 2017**).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Determinar el efecto antioxidante y antimicrobiano de los extractos de cuatro diferentes tipos de ortiga (*Urtica dioica*, *Urtica urens*, *Urtica leptophylla*, *Urtica baccifera*) frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*.

1.2.2. Objetivos específicos

- Obtener extractos de cuatro especies de ortiga (*U. dioica*, *U. urens*, *U. leptophylla*, *U. baccifera*) mediante extracción Soxhlet y extracción hidroalcohólica.
- Evaluar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos de cuatro especies de ortiga (*U. dioica*, *U. urens*, *U. leptophylla*, *U. baccifera*), por medio de la técnica de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).
- Establecer la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los extractos obtenidos de cuatro especies de ortiga (*U. dioica*, *U. urens*, *U. leptophylla*, *U. baccifera*) mediante el método de dilución en caldo.

1.3. Hipótesis

1.3.1. Hipótesis nula

Los diferentes métodos de extracción (extracción hidroalcohólica y extracción Soxhlet) influyen en las actividades biológicas (antimicrobiana y antioxidante) de los extractos obtenidos de las cuatro especies de ortiga.

1.3.2. Hipótesis alternativa

Los diferentes métodos de extracción (extracción hidroalcohólica y extracción Soxhlet) no influyen en las actividades biológicas (antimicrobiana y antioxidante) de los extractos obtenidos de las cuatro especies de ortiga.

1.4. Variables

1.4.1. Variable independiente

- Métodos de extracción (extracción hidroalcohólica y extracción Soxhlet).
- Especies de ortiga (*U. dioica*, *U. urens*, *U. leptophylla*, *U. baccifera*).

1.4.2. Variable dependiente

- Actividad antioxidante
- Actividad antimicrobiana
- Fenoles totales

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Materiales

2.1.1. Material vegetal

- *Urtica dioica*
- *Urtica urens*
- *Urtica leptophylla*
- *Urtica baccifera*

2.1.2. Material biológico

Cepas bacterianas de:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 12600
- *Escherichia coli* ATCC 11775
- *Listeria monocytogenes* ATCC 19115
- *Bacillus cereus* ATCC 10876

2.1.3. Reactivos de laboratorio

- Medio PCA (Plate Count Agar)
- Agua de peptona
- Resazurina
- Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico)
- Folin-Ciocalteu
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3)
- DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)

- Etanol al 96%.
- Metanol 99%
- Solución salina
- Gentamicina
- Agua destilada

2.1.4. Equipos de laboratorio

- Cámara de flujo laminar
- Incubadora
- Refrigeradora
- Autoclave
- Espectrofotómetro
- Extractor Soxhlet
- Balanza analítica
- Vórtex
- Rotavapor
- Plancha de calentamiento
- Plancha de agitación

2.1.5. Instrumentos de laboratorio

- Pipeta volumétrica (1 mL)
- Embudos de vidrio
- Balones de aforo (10,50, 100 mL)
- Piseta
- Cajas Petri
- Lámparas de alcohol
- Tubos de ensayo con tapa rosca
- Frascos herméticos de vidrio oscuro
- Frascos ámbar con tapa (250 mL)

- Tubos Eppendorf
- Agitadores magnéticos
- Vasos de precipitación (50, 100 mL)
- Micropipeta (100 – 1000 μ L)
- Micropipeta (20 – 200 μ L)
- Puntas estériles
- Película adhesiva
- Asa de Drigalsky
- Asa bacteriológica
- Caja de microtitulación de 96 pocillos
- Gradilla
- Papel filtro
- Espátula
- Pinzas
- Matraz Erlenmeyer (100, 250 mL)

2.1.6. Insumos

- Mandil
- Guantes
- Cepillo de lavar equipos
- Papel aluminio
- Fósforos
- Lápiz graso
- Marcadores

2.2. Métodos

2.2.1. Tipo de investigación

La presente investigación es de carácter cuantitativo, puesto que pretende analizar datos cuantitativos relacionados con diversas variables, dado que se busca identificar la capacidad inhibitoria y antioxidante de cuatro especies distintas de ortiga, de diferentes zonas del país.

2.2.2. Población y muestra

La población considerada para esta investigación son las cuatro especies de ortiga obtenidas en las parroquias Macas y Cotaló.

2.2.3. Obtención de los extractos

2.2.3.1. Obtención de la muestra

La especie *Urtica baccifera* fue recolectada en una propiedad privada ubicada en la parroquia San Isidro, perteneciente al cantón Morona, provincia de Morona Santiago. Las especies *Urtica urens*, *Urtica dioica* y *Urtica leptophylla* fueron recolectadas en una propiedad privada ubicada en la parroquia Cotaló, cantón Pelileo, provincia de Tungurahua. Las especies fueron herborizadas y entregadas al herbario “Misael Acosta Solís” de la Universidad Técnica de Ambato, para confirmar que las especies corresponden a las descritas anteriormente. (ANEXO A). Adicionalmente, se solicitó la autorización de investigación científica al Ministerio del Ambiente y Agua, para poder proceder con la recolección de las especies vegetales. (ANEXO B)

2.2.3.2. Preparación de la muestra

Se seleccionaron las plantas que no presentan daños en sus hojas o tallos. Se cortaron ramas completas (tallos, hojas y flores) cuyo tamaño varió entre los 25 y 50 cm. Las especies recolectadas se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (5%) y agua destilada, se enjuagaron con agua y se secaron en un lugar oscuro a una temperatura aproximada de 25 a 30 °C. Finalmente, el material vegetal seco fue triturado en una licuadora hasta obtener un polvo fino, que se lo almacenó en fundas plásticas.

2.2.3.3. Extracción hidroalcohólica

Se tomaron 50 g del polvo y se lo mezcló con 200 mL de etanol al 96% en un frasco resistente al calor; se dejará reposar en la incubadora a 37 °C por 72 h. Después, se filtró el extracto obtenido con papel filtro. Posteriormente, se evaporó el etanol en el rotavapor a una temperatura de 68°C y 240 revoluciones. Según lo ejecutado por **Salih, (2014)**, el extracto obtenido se secó por completo en una incubadora a 40 °C por 6 h, Este proceso se lo realizó por duplicado y se repitió con todas las especies de ortiga.

2.2.3.4. Extracción Soxhlet

Con papel filtro se formaron cartuchos de 5,5 x 7,5 cm, en el cual se depositará 25 g de material vegetal pulverizado. Luego, se montó el equipo de extracción Soxhlet, en el interior del tubo extractor se colocaron dos cartuchos y en el balón se vertió 300 mL de metanol al 99% junto con 3 perlas de ebullición. Posteriormente, se calentó la plancha a una temperatura de 110 °C y se inició el flujo de agua del condensador. Este proceso se mantuvo durante 18 h hasta que se redujo visiblemente la coloración del solvente más el extracto. Finalmente, se evaporó el metanol en el rotavapor a una temperatura de 68°C y 240 revoluciones. El proceso se lo realizó por duplicado con las cuatro especies de ortiga.

2.2.3.5. Almacenamiento

Los extractos obtenidos se recolectaron en frascos herméticos de vidrio oscuro y se los almacenó en un congelador a una temperatura de -20°C.

2.2.4. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB)

2.2.4.1. Diluciones de los extractos

Las diluciones se realizaron en tubos Eppendorf correctamente esterilizados. Se utilizó agua de peptona como diluyente, la mezcla se homogeneizó en un vórtex a una velocidad de 30 rpm por 5 minutos. Las concentraciones iniciales fueron de 100 µg/mL, 80 µg/mL, 60 µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL. Posteriormente, se realizó una segunda y tercera secuencia de diluciones, dependiendo de los resultados obtenidos para medir la CMI.

2.2.4.2. Activación de las cepas

En lo que respecta a las cepas bacterianas, se realizó la activación de las mismas siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Luego se realizó la siembra en el medio de cultivo PCA (Plate Count Agar), siguiendo la técnica de estriación por el método escocés, con ayuda de un asa bacteriológica. Posteriormente, las cajas Petri correctamente rotuladas se incubarán a 37°C por 24 horas, en forma invertida.

2.2.4.3. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

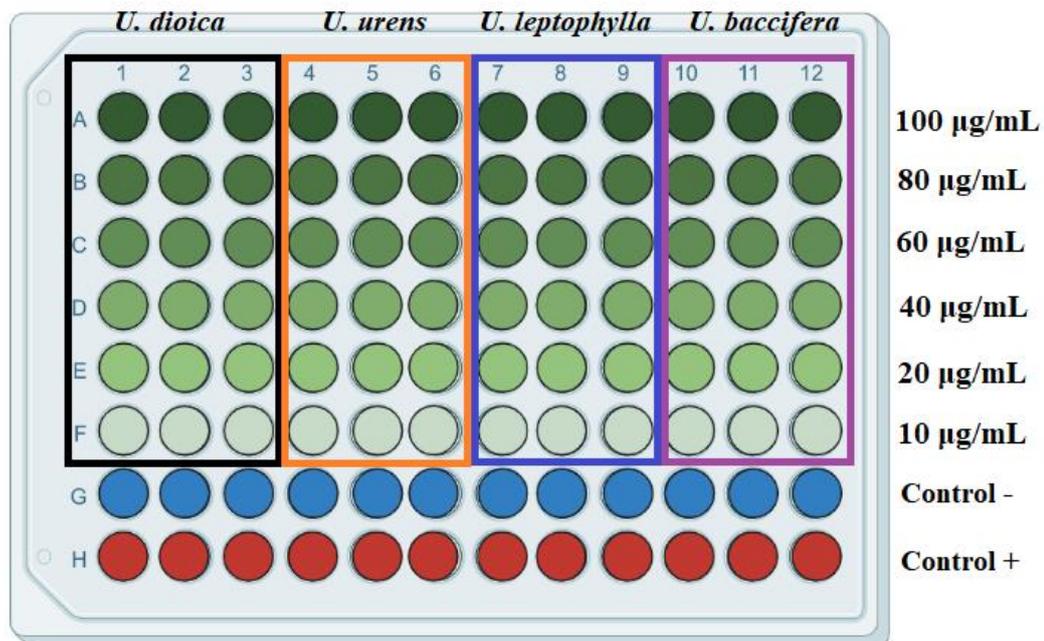
2.2.4.3.1. Preparación del inóculo.

Se realizó la estandarización hasta 0,5 de la escala de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml), siguiendo la metodología planteada por *Alcaide et al., (2017)*.

2.2.4.3.2. Preparación de las placas de microdilución

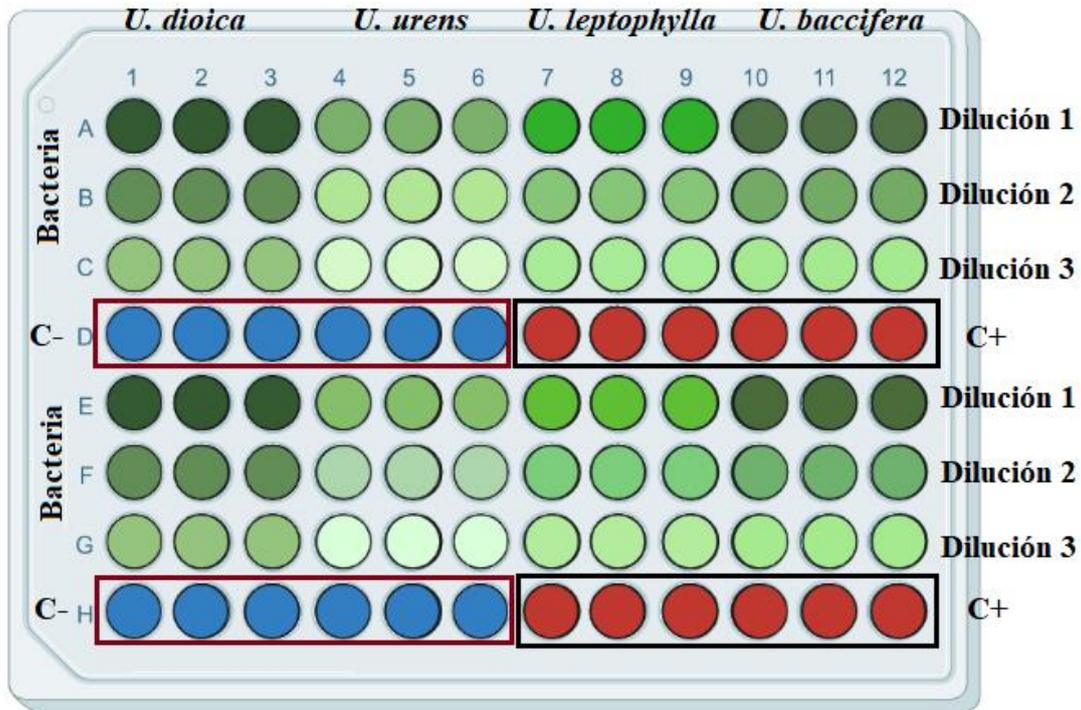
Para el desarrollo de este apartado se utilizó una placa de microtitulación de 96 pocillos (8x12). Se depositaron 100 μL de las diluciones previamente preparadas junto con 100 μL del inóculo estandarizado, como control positivo se utilizó gentamicina y como control negativo agua de peptona, esto se lo puede apreciar en la figura 3. Seguidamente, las placas se cubrieron con su tapa correspondiente y se incubaron a 37°C por 24 horas. Este procedimiento se lo realizó por triplicado con todos los extractos y bacterias. Posteriormente, se colocó en cada pocillo 20 μL de una solución de resazurina al 0.02% y se incubó por 2 horas. Trascurrido este tiempo se observó el cambio de coloración en cada pocillo, lo que indica la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano (Ortega, 2018). Por último, dependiendo de los resultados de la prueba colorimétrica de resazurina se realizaron diluciones a menor escala entre distintos rangos de concentración y se repitió el proceso descrito anteriormente (Figura 4). Esto se lo realizó en dos ocasiones y en la última cuya escala fue menor, se identificó el pocillo que no presentó crecimiento bacteriano, el cual fue considerado para la CMI.

Figura 3 Representación gráfica de la primera fase de la preparación de la placa de microtitulación



Fuente: Elaboración Propia

Figura 4 Representación gráfica de la segunda y tercera fase de la preparación de la placa con distintas diluciones.

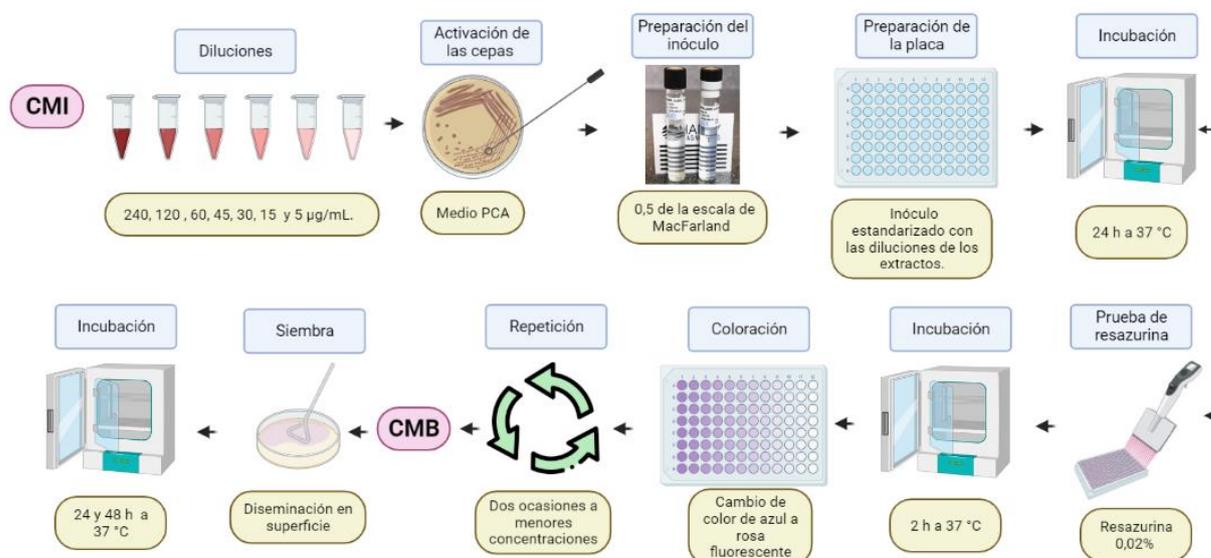


Fuente: Elaboración Propia

2.2.4.4. Concentración Mínima Bactericida (CMB)

En este apartado, primero se prepararon cajas Petri con medio PCA, correctamente rotuladas. Luego, se homogeneizó con la micropipeta el contenido de los pocillos que no presenten turbidez. Se tomó el inóculo homogeneizado de cada pocillo y se realizó una siembra por con un asa bacteriológica sobre las placas preparadas. Consecutivamente, se incubó a 37°C y se leyó a las 24, 48 y 72 horas. Finalmente, identificó en las placas la ausencia de colonias bacterianas. (García *et al.*, 2008, Robalino, 2019).

Figura 5 Representación de la metodología aplicada en la evaluación de la actividad antimicrobiana.



Fuente: Elaboración Propia

2.2.5. Actividad antioxidante

La evaluación de la actividad antioxidante de los diversos extractos se llevó a cabo utilizando 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH). Brevemente, se preparó una solución stock de cada extracto a una concentración 3000 µg/mL, para lo cual se mezclaron 30 mg de extracto con 10 mL de una solución metanol-agua en una proporción 50:50 (v/v). Se realizaron diluciones adicionales en serie, de 2000, 1500, 1000, 500 y 250 µg/mL, a partir de la solución madre. Se preparó una solución de DPPH al 150 µM, utilizando como diluyente una solución metanol-agua en una proporción 80:20 (v/v). Se utilizó una placa de microtitulación de 96 pocillos, en los cuales se mezclaron 20 µL de las diluciones con 180 µL de solución de DPPH. La mezcla de reacción se agitó y luego se mantuvo en un cuarto oscuro a temperatura ambiente durante 40 min (Mzid *et al.*, 2017; Pazmiño, 2008). Adicionalmente, para la curva de calibración se utilizó como estándar una solución madre de Trolox de concentración 500 µM para lo cual, se prepararon diluciones en metanol-agua (50:50), hasta alcanzar concentraciones de 50, 100 200, 300, 400 y 500 µM. El control se lo consiguió al mezclar 180 µL de DPPH con 20 µL de metanol-agua (50:50).

El blanco se conformó por 180 µL del diluyente de DPPH con 20 µL del diluyente del Trolox o extractos. La densidad óptica se midió a 517 nm utilizando un espectrofotómetro (Telenchana, 2019; Rets'epile *et al.*, 2020). Se usó la siguiente ecuación para calcular el porcentaje de actividad eliminadora de radicales DPPH de los extractos.

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = \left[1 - \left(\frac{A_m - A_b}{A_c - A_b} \right) \right] * 100$$

Donde,

A_m: Absorbancia de la muestra

A_b: Absorbancia del blanco

A_c: Absorbancia del control

Cada experimento se llevó a cabo por triplicado y se usó los promedios de los tres valores para calcular los valores de IC₅₀.

2.2.6. Cuantificación de fenoles totales

El contenido fenólico se evaluó por medio de método de Folin y Ciocalteu. Para ello, en una placa de microtitulación de 96 pocillos se mezclaron 10 µL de muestra con 130 µL de agua destilada y 10 µL del reactivo Folin-Ciocalteu (2 N). Trascorridos 6 minutos se añadieron 100 µL de carbonato de sodio al 7% (p/v). Posteriormente, en un lugar oscuro y a temperatura ambiente se incubaron las placas durante 90 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a 750 nm. La curva de calibración se la realizó con diluciones de 10 a 100 mg/L de ácido gálico (GAE). El procedimiento se lo realizó por triplicado con cada una de las muestras y los resultados se expresaron como equivalentes de miligramos de ácido gálico por gramo de peso seco de la muestra (mg GAE/g DW).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de resultados

3.1.1. Rendimiento de los extractos

Los extractos de las cuatro especies de ortiga (*U. dioica*, *U. urens*, *U. leptophylla* y *U. baccifera*) se obtuvieron por medio de una extracción con disolventes (etanol y metanol). La extracción hidroalcohólica presentó un mayor rendimiento para *U. leptophylla*, el cual fue de 1,403%, mientras que, la extracción Soxhlet cuyo disolvente fue metanol, alcanzó un rendimiento máximo de 2,487% para *U. dioica*. En la tabla 3, se aprecia el rendimiento de cada especie vegetal. De acuerdo con **Hernández et al., (2020)**, la bioactividad y el rendimiento de los compuestos bioactivos de una extracción depende de diversos factores, tales como, la polaridad del disolvente, la temperatura, el tiempo de extracción, la composición química del compuesto extraíble y la relación sólido-líquido. Según, **Bañuelos et al., (2018)**, los extractos vegetales contienen monoterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos, sesquiterpenos, y politerpenos, además una gran cantidad de radicales funcionales como cetonas, carburos, aldehídos, alcoholes, éteres, ésteres, peróxidos y fenoles que confieren la capacidad biológica a las plantas.

Tabla 3 Rendimiento de los extractos de los diferentes tipos de ortiga

Especies	Rendimiento de los extractos (%p/v)	
	Etanólico-Macerado	Metanólico-Soxhlet
<i>U. dioica</i>	1,318 ^c ± 0,11	2,487 ^a ± 0,08
<i>U. urens</i>	0,974 ^d ± 0,04	2,150 ^b ± 0,1
<i>U. leptophylla</i>	1,403 ^c ± 0,09	2,340 ^{a,b} ± 0,08
<i>U. baccifera</i>	0,608 ^e ± 0,02	1,336 ^c ± 0,09

Nota: Los valores presentados en la tabla representan la media de los rendimientos obtenidos por duplicado con su respectiva desviación estándar. Las letras representan la

diferencia significativa entre el rendimiento de los diferentes extractos ($P \leq 0.05$). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con Minitab.

Mediante el análisis de varianza ANOVA y la prueba de rangos múltiples Tukey, se identificó que los factores de estudio presentan un efecto estadísticamente significativo sobre el rendimiento, a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$). El análisis estadístico ejecutado se lo puede apreciar en el ANEXO C. El rendimiento derivado de la extracción hidroalcohólica muestra valores estrechamente bajos, la alta concentración de etanol (96%) puede ser la responsable de este hecho, dado que, en una previa investigación ejecutada en Túnez, al utilizar etanol al 70% obtuvieron un rendimiento de 4.768 % (**Mzid et al., 2017**). Por otra parte, la extracción con metanol al 99% muestra un rendimiento superior a su contraparte. **Stanojević et al., (2016)**, en su respectiva investigación obtuvo un rendimiento del 18,25% y especifica que concentraciones de metanol superiores al 50 % v/v generan una disminución significativa en el rendimiento. Asimismo, la variación existente entre los rendimientos de los extractos se atribuye a las polaridades de los diferentes compuestos presentes en las distintas especies (**Ahmed et al., 2022**). Por otra parte, el tamaño de las partículas de la matriz vegetal también puede influir en la eficiencia de la extracción, mientras menor sea el tamaño de las partículas los solventes penetrarán de mejor manera, facilitando la difusión de los solutos (**Zhang et al., 2018**).

3.1.2. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó por medio del método de captación de radicales libres DPPH. Los resultados basados en el porcentaje de inhibición de radicales DPPH de los extractos de las distintas especies vegetales se evaluó a concentraciones variables de 250 $\mu\text{g/mL}$ hasta 3000 $\mu\text{g/mL}$. En la tabla 4, se presentan los valores correspondientes a esta actividad biológica.

Tabla 3 Porcentaje de inhibición de los radicales de DPPH de los extractos de diferentes especies de ortiga

Extracto	Concentración (µg/mL)	Porcentaje de Inhibición por especie (%)			
		<i>U. dioica</i>	<i>U. urens</i>	<i>U. leptophylla</i>	<i>U. baccifera</i>
Etanólico	250	22,77 ^{rst} ± 1,78	13,48 ^{uv} ± 1,30	6,78 ^{wx} ± 1,77	5,91 ^{wx} ± 0,36
Macerado	500	33,41 ^{klm} ± 0,63	24,03 ^{pqrst} ± 0,59	10,40 ^{uvw} ± 0,68	13,48 ^{uv} ± 1,07
	1000	46,81 ^{hi} ± 1,52	28,37 ^{nop} ± 0,83	21,12 st ± 1,48	27,82 ^{opq} ± 1,07
	1500	49,80 ^{fgh} ± 1,30	35,93 ^{kl} ± 1,84	26,95 ^{opq} ± 1,19	35,86 ^{kl} ± 0,49
	2000	54,37 ^{ef} ± 1,54	43,03 ^{ij} ± 2,07	33,02 ^{lmn} ± 0,72	49,88 ^{fgh} ± 0,96
	3000	62,49 ^d ± 2,49	53,03 ^{efg} ± 0,85	47,99 ^h ± 0,90	57,13 ^e ± 1,66
Metanólico	250	3,70 ^x ± 1,27	26,02 ^{opqr} ± 1,04	3,08 ^x ± 0,46	35,43 ^{jk} ± 1,31
Soxhlet	500	6,62 ^{wx} ± 1,70	35,18 ^{klm} ± 2,80	9,78 ^{vw} ± 1,44	46,89 ^{gh} ± 0,71
	1000	15,17 ^u ± 0,74	42,80 ^{ij} ± 1,97	15,24 ^u ± 1,41	65,92 ^c ± 1,29
	1500	25,79 ^{opqr} ± 1,16	55,66 ^e ± 0,93	20,25 ^{pqrst} ± 3,24	71,10 ^b ± 1,79
	2000	30,72 ^{mno} ± 0,74	62,66 ^d ± 1,97	23,09 ± 2,24	73,09 ^{ab} ± 1,29
	3000	41,65 ^j ± 1,29	67,28 ^{cd} ± 2,01	35,80 ^{kl} ± 2,34	76,83 ^a ± 0,93

Porcentaje de inhibición de los radicales de DPPH de los extractos de diferentes especies de ortiga.

Nota. El ensayo se realizó por triplicado. Las letras representan la diferencia significativa entre los porcentajes de inhibición de DPPH ($P \leq 0.05$).

A través del análisis de varianza ANOVA y la prueba de rangos múltiples Tukey, se identificó que los factores estudiados exhiben un efecto estadísticamente significativo sobre los porcentajes de eliminación de DPPH, a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$). El análisis estadístico se lo puede evidenciar en el ANEXO D.

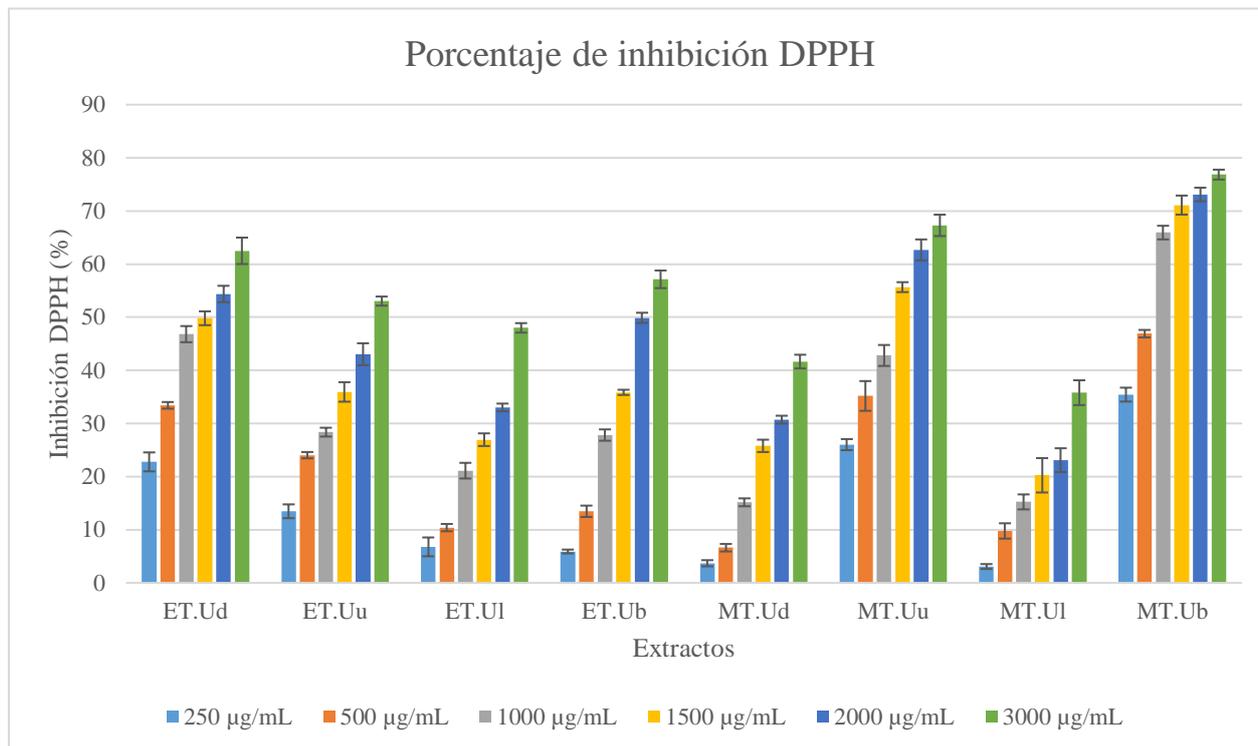
Tabla 4 Capacidad antioxidante en equivalentes Trolox de las matrices vegetales

Extracto	Matriz vegetal	% de Inhibición	μmol Equivalente Trolox/L		
<i>Etanólico</i>	<i>U. dioica</i>	62,49 ± 2,49 ^c	356,02	±	8,57 ^c
	<i>U. urens</i>	53,03 ± 0,85 ^e	297,43	±	1,91 ^e
	<i>U. leptophylla</i>	33,02 ± 0,72 ^f	263,08	±	0,95 ^f
	<i>U. baccifera</i>	57,13 ± 1,66 ^d	323,02	±	5,72 ^d
<i>Metanólico-Soxhlet</i>	<i>U. dioica</i>	41,65 ± 1,29 ^g	225,90	±	3,72 ^g
	<i>U. urens</i>	67,28 ± 2,01 ^b	382,50	±	1,86 ^b
	<i>U. leptophylla</i>	35,80 ± 2,34 ^h	204,19	±	0,93 ^h
	<i>U. baccifera</i>	76,83 ± 0,93 ^a	435,80	±	2,79 ^a

Nota. Los valores del porcentaje de inhibición de DPPH son resultado del promedio de 3 repeticiones. Mientras que, el resultado de expresado en μmol Equivalente Trolox/L se obtuvo por medio de la media de 2 repeticiones, se presenta su respectiva desviación estándar. Las letras representan la diferencia significativa entre los porcentajes de inhibición de DPPH ($P \leq 0.05$).

Mediante el análisis de varianza ANOVA y la prueba de rangos múltiples Tukey, se demostró que los factores analizada exteriorizan un efecto estadísticamente significativo sobre los porcentajes de eliminación de DPPH y los μmol de equivalente Trolox a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$). El análisis estadístico se lo puede evidenciar en el ANEXO E.

Figura 6 Porcentajes de Inhibición de DPPH a distintas concentraciones de los extractos vegetales



Nota: **ET.Ud:** Extracto etanólico de *U. dioica*; **ET.Uu:** Extracto etanólico de *U. urens*; **ET.Ul:** Extracto etanólico de *U. leptophylla*. **ET.Ub:** Extracto etanólico de *U. baccifera*. **MT.Uu:** Extracto metanólico de *U. dioica*; **MT.Uu:** Extracto metanólico de *U. urens*; **MT.Ul:** Extracto metanólico de *U. leptophylla*. **MT.Ub:** Extracto metanólico de *U. baccifera*.

La técnica DPPH se basa en la capacidad que poseen los compuestos antioxidantes de las muestras para neutralizar los radicales libres DPPH, por medio de la transferencia de electrones, convirtiéndolos en compuestos estables (Bouabid *et al.*, 2020). Todos los extractos analizados presentaron capacidad antioxidante, lo que demuestra la capacidad que poseen los compuestos fitoquímicos para donar un átomo de hidrógeno y neutralizar los radicales (Cidade *et al.*, 2020). Sin embargo, el porcentaje varió considerablemente dependiendo de la especie vegetal y el medio de extracción. En la figura 6 se puede evidenciar el porcentaje de inhibición es directamente proporcional con la concentración de los extractos. Los extractos hidroalcohólicos arrojaron a *U. dioica* como la mejor

especie para inhibir radicales libres, con un porcentaje máximo de $62,49 \pm 2,49$ % a la concentración del extracto más alta (3000 mg/mL), seguidamente se encuentran *U. baccifera*, que presenta un alto índice de similitud con la anterior, alcanzando una diferencia inferior al 6%. Luego se encuentra *U. urens* con un porcentaje de $53,03 \pm 0,85$ % y por último *U. leptophylla*, no consiguió superar el 50% de inhibición. En el caso de los extractos metanólicos obtenidos mediante extracción Soxhlet, *U. baccifera* demostró ser la especie con un más alto nivel antioxidante logrando un $76,83 \pm 0,93$ %. *U. leptophylla* presentó valores con rangos bajos en los dos métodos de extracción (Tabla 4). El comportamiento de los diferentes extractos es muy similar al alcanzado en informes anteriores, **Rets'epile et al., (2020)**, en su investigación llevada a cabo con diferentes solventes, identificó que el extracto metanólico de *U. urens* alcanza un porcentaje de inhibición de 73.84 ± 6.82 %. En contraste, **Mzid et al., (2017)**, al utilizar un extracto etanólico de *U. urens* obtuvo un porcentaje depurador de 93,56 %, sin embargo, el patrón de referencia fue el ácido ascórbico. En el mismo contexto, **Semalty et al., (2010)**, evaluó esta actividad biológica con raíces de *U. dioica*, con un extracto etanólico y metanólico, arrojando un porcentaje inhibitorio de $45,03 \pm 0,0005$ % y $46,71 \pm 0,0011$ %, respectivamente. De igual modo, en un análisis llevado a cabo en Brasil, **Gindri et al., (2014)** probaron que *U. baccifera* consigue inhibir un 12.30 ± 2.09 % a una concentración de 250 mg/mL. Estos resultados se asemejan considerablemente con los obtenidos en la presente investigación. En la tabla 5, se puede evidenciar el resultado del porcentaje de inhibición a mayor concentración de extracto, reflejado en equivalentes Trolox, el cual se utilizó como patrón de referencia en la construcción de la curva de calibración. De igual manera, en la tabla 6, se evidencia la concentración necesaria para neutralizar el 50% de los radicales libres, determinando que el extracto metanólico de *U. dioica* y *U. leptophylla*, junto con el extracto etanólico de esta última, inhiben el 50% de los radicales libre de DPPH con concentraciones superiores a los 3000 ug/mL.

Tabla 5 Concentración de extractos necesaria para inhibir el 50% de radicales DPPH.

Extractos	IC ₅₀ (ug/mL)	
	Etanólico-Macerado	Metanólico-Soxhlet
<i>U. dioica</i>	1334,39 ± 1,39	>3000
<i>U. urens</i>	2665,75 ± 0,83	1165,56 ± 3,39
<i>U. leptophylla</i>	>3000	>3000
<i>U. baccifera</i>	2407,24 ± 1,49	468,16 ± 1,27

De acuerdo con **Köksal et al., (2016)**, la capacidad antiradicales se debe principalmente a la cantidad de compuestos fenólicos distribuidos en las plantas, que detienen las reacciones de oxidación en cadena y actúan como quelantes de metales, agentes reductores, mensajeros químicos, reguladores fisiológicos e inhibidores del ciclo celular. De igual manera, **Ahmed et al., (2022)** afirman que el solvente utilizado en la extracción es el factor más influyente al momento de extraer compuestos bioactivos en una técnica de extracción sólido-líquido, esto debido a la influencia que ejercen las polaridades de los solventes, lo que explicaría la variabilidad existente en los resultados. Asimismo, en diversas investigaciones, el metanol ha demostrado una buena eficiencia en una extracción sólido-líquido, dado que este diluyente no degrada los compuestos fenólicos, debido a que no promueve la formación de peróxido de hidrógeno (**Borges et al., 2020**). Adicionalmente, los resultados también estarían influenciados por la procedencia, época de recolección, tratamiento y calidad de las especies vegetales, puesto que son factores determinantes en el rendimiento y concentración de compuestos fenólicos (**Cuti & Prado, 2019**).

3.1.3. Compuestos fenólicos totales

La cantidad de compuestos fenólicos presentes en las ortigas está influenciada por el estado vegetativo, la época de cosecha, el genotipo, la variedad, el suelo, el clima, el almacenamiento, e incluso depende significativamente de las partes de la planta, las hojas son la sección más rica en estos compuestos bioactivos (**Kregiel et al., 2018**). **Garofulić et al., (2021)** & **Zeković et al., (2017)**, mencionan que en las hojas de ortiga los principales compuestos fenólicos son la rutina, ácido sinápico, cafeico, clorogénico, p-

ácido cumárico, naringenina y naringina, sin embargo, **Garofulić et al., (2021)** informan que los ácidos cinámicos y flavonoles abundan en las zonas aéreas de las ortigas.

La cuantificación de compuesto fenólicos se llevó a cabo utilizando el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. La determinación de estos compuestos se ejecutó en base a una curva estándar de ácido gálico (GAE), que se diseñó en concentraciones variables de 10 a 100 GAE.mg/L. En la tabla 7 se muestra los resultados calculados en base a la ecuación $A_{750\text{ nm}} = 0,0027 [\text{GAE}] + 0,113$ ($R^2 = 0,9989$). En diversos estudios se ha probado que el etanol y metanol al ser solventes polares presentan una excelente afinidad por los compuestos bioactivos (**Stanojević et al., 2016**). Sin embargo, los valores obtenidos muestran que los extractos etanólicos superan ampliamente a los extractos metanólicos, en relación al índice de compuestos fenólicos en relación (Tabla 7). De acuerdo con, (**Flórez et al., 2022**) esta variación puede ser debido al método de extracción Soxhlet, dado que, la alta temperatura de trabajo puede generar la destrucción de productos químicos termolábiles y la evaporación del solvente, produciendo impurezas indeseables en el extracto. **Kowalska et al., (2021)** avalan esta teoría, puesto que, en su respectiva investigación trabajaron a temperaturas de ≤ 35 °C y 105 °C, logrando mejores resultados a menor temperatura, los autores afirman que el tratamiento térmico moderado puede haber determinado la escisión de los enlaces glucosídicos de los azúcares fenólicos y la producción de aglicones fenólicos, que reaccionan con mayor facilidad al reactivo de Folin-Ciocalteu. En la presente investigación se identificó que el extracto etanólico *de U. dioica* presenta un mayor contenido polifenólico ($87,840 \pm 2,835$ mg GAE/g), en contraste, en un análisis preliminar **Kowalska et al., (2021)** al usar con alcohol anhidro a 50°C alcanzaron valores de 31,9 mg GAE/L, lo que refuerza la teoría de que la temperatura de extracción influye en directamente en la cantidad de compuestos bioactivos. Como se mencionó en el apartado anterior, los compuestos fenólicos son los principales responsables de la capacidad antioxidante, y eso se puede comprobar al comparar los resultados de la tabla 4 y 5 con la tabla 6, lo que demuestra su íntima relación.

En comparación con estudios previos, en Irán se obtuvieron valores bajos con esta especie (24.1 mg GAE/g) (Kukrić et al., 2012a), sin embargo, en Bosnia reportan 208.37 mg GAE/g (**Pourmorad et al., 2006**), los dos estudios se realizaron con extractos etanólicos. Por otro lado, en Turquía, la extracción Soxhlet con metanol presentó una cantidad de

compuestos fenólicos de $332,19 \pm 2,79$ mg GAE/g (Özkan *et al.*, 2011), lo que supera ampliamente a los obtenidos en este estudio. Estos resultados se acoplan a lo planteado por Kregiel *et al.*, (2018), quienes indican que el clima y el lugar de procedencia de las muestras influye en el rendimiento de compuestos activos. Al respecto, el contenido fenólico de *U. baccifera* se asemeja al de Moncayo *et al.*, (2021) que fue de 61.55 ± 1.54 mg GAE/mL. Con respecto a *U. leptophylla* no se encontraron estudios que hayan evaluado su capacidad antioxidante y compuesto fenólicos.

Tabla 6 Contenido de fenoles totales de los extractos provenientes de cada especie vegetal.

Extracto	Matriz vegetal	Absorbancia (750 nm)	Fenoles totales (mg GAE/g)	
	<i>U. dioica</i>	0,350 \pm 0,008	87,840	\pm 2,835 ^a
Etanólico- macerado	<i>U. urens</i>	0,306 \pm 0,004	70,160	\pm 1,728 ^c
	<i>U. leptophylla</i>	0,324 \pm 0,002	41,111	\pm 0,740 ^e
	<i>U. baccifera</i>	0,338 \pm 0,003	83,333	\pm 1,111 ^b
Metanólico- Soxhlet	<i>U. dioica</i>	0,187 \pm 0,002	27,435	\pm 0,804 ^f
	<i>U. urens</i>	0,303 \pm 0,004	70,494	\pm 1,464 ^c
	<i>U. leptophylla</i>	0,166 \pm 0,003	19,654	\pm 1,101 ^g
	<i>U. baccifera</i>	0,254 \pm 0,002	52,136	\pm 0,756 ^d

Nota. Los valores de absorbancia son resultado del promedio de 3 repeticiones. Mientras que, el resultado de fenoles totales (mg GAE/g) se consiguió por medio de la media de 3 repeticiones. Las letras representan la diferencia significativa entre los porcentajes de inhibición de DPPH ($P \leq 0.05$).

Mediante el análisis de varianza ANOVA y la prueba de rangos múltiples Tukey, se demostró que los factores analizados manifiestan un efecto estadísticamente significativo sobre la cantidad de fenoles totales, a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$). El análisis estadístico se lo puede evidenciar en el ANEXO F.

3.1.3. Actividad antimicrobiana

3.1.3.1. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida

Las especies de la familia *Urticaceae* presentan un alto índice de actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, comparable con agentes antimicrobianos como el nitrato de miconazol, la amoxicilina, la ofloxacina y la netilmicina (Kregiel *et al.*, 2018). Su capacidad antimicrobiana se debe principalmente a que son ricas en terpenoides, carotenoides, flavonoides, esteroides y poseen un elevado número de polifenoles (Đurović *et al.*, 2017).

La evaluación de actividad antimicrobiana se llevó a cabo mediante el método de microdilución en placas de 96 pocillos basado en resazurina. Se presenciaron efectos inhibidores significativos por parte de los extractos etanólicos y metanólicos de las distintas especies de ortiga, frente a la *S. aureus* ATCC 12600, *E. coli* ATCC 11775, *L. monocytogenes* ATCC 19115, *B. cereus* ATCC 10876. El análisis se ejecutó en 3 fases, partiendo de concentraciones de extracto de 10 µg/mL a 100 µg/mL, hasta en posteriores diluciones alcanzar la CMI.

Tabla 7 Concentración mínima inhibitoria de los diferentes extractos frente a cuatro cepas bacterianas.

Extractos	Matriz vegetal	CMI (µg/mL)			
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B.cereus</i>
Etanólico	<i>U. dioica</i>	52,00 ± 0,87 ^c	31,50 ± 0,87 ^{ab}	13,77 ± 0,46 ^d	17,00 ± 0,87 ^d
	<i>U. urens</i>	33,00 ± 0,87 ^d	13,00 ± 0,87 ^e	41,50 ± 0,87 ^a	26,00 ± 0,00 ^c
	<i>U. leptophylla</i>	53,50 ± 0,00 ^{bc}	28,50 ± 0,87 ^{bc}	23,00 ± 0,87 ^c	31,50 ± 0,87 ^a
	<i>U. baccifera</i>	27,00 ± 0,87 ^e	13,03 ± 0,40 ^e	21,50 ± 0,87 ^c	16,00 ± 0,35 ^e
Metanólico Soxhlet	<i>U. dioica</i>	52,00 ± 0,87 ^c	48,50 ± 0,87 ^a	13,03 ± 0,40 ^d	16,20 ± 0,35 ^e
	<i>U. urens</i>	54,00 ± 0,00 ^b	11,00 ± 0,00 ^e	13,77 ± 0,46 ^d	13,27 ± 0,40 ^e
	<i>U. leptophylla</i>	66,00 ± 0,00 ^a	26,00 ± 0,00 ^{cd}	28,00 ± 0,87 ^b	16,50 ± 0,87 ^e
	<i>U. baccifera</i>	16,00 ± 0,35 ^f	16,70 ± 0,52 ^d	26,50 ± 0,87 ^b	28,50 ± 0,87 ^b

Nota. Los valores de la CMI son resultado de la media de 3 repeticiones. Las letras representan la diferencia significativa entre la CMI evaluada para cada cepa microbiana. (P ≤ 0.05).

Mediante el análisis de varianza ANOVA y la prueba de rangos múltiples Tukey, se demostró que los factores analizados manifiestan un efecto estadísticamente significativo la CMI de cada cepa bacteriana, a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$). El análisis estadístico de cada bacteria se lo puede evidenciar en el ANEXO F.

Tabla 8 Concentración mínima bactericida de los diferentes extractos frente a cuatro cepas bacterianas.

Extractos	Material vegetal	CMB ($\mu\text{g/mL}$)			
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B.cereus</i>
<i>Etanólico</i>	<i>U. dioica</i>	$\geq 52,00$	$\geq 31,50$	$\geq 14,30$	≥ 16
	<i>U. urens</i>	$\geq 34,50$	$\geq 14,50$	$\geq 41,50$	≥ 27
	<i>U. leptophylla</i>	$\geq 53,50$	$\geq 28,50$	$\geq 23,00$	≥ 32
	<i>U. baccifera</i>	$\geq 28,50$	$\geq 13,50$	$\geq 22,50$	≥ 16
<i>Metanólico</i>	<i>U. dioica</i>	$\geq 52,00$	$\geq 48,50$	$\geq 13,50$	≥ 17
	<i>U. urens</i>	$\geq 54,00$	$\geq 12,50$	$\geq 14,30$	≥ 13
	<i>U. leptophylla</i>	$\geq 67,50$	$\geq 26,00$	$\geq 28,00$	≥ 16
	<i>U. baccifera</i>	$\geq 17,50$	$\geq 17,3$	$\geq 27,50$	≥ 27

Los valores establecidos en la tabla 8, muestran que existe diferencia significativa entre los extractos vegetales con cada uno de los patógenos. Asimismo, se identifica que el extracto etanólico (EtOH) y metanólico (MtOH) de *U. leptophylla* necesita una concentración más elevada para inhibir el desarrollo de *E. coli* ($66,0 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$) y *B. cereus* ($31,50 \pm 0,87 \mu\text{g/mL}$), respectivamente. En el mismo contexto el extracto metanólico de *U. dioica*, relaciona $48,50 \pm 0,87 \mu\text{g/mL}$ para *S. aureus* y el extracto etanólico de *U. urens*, $41,50 \pm 0,87 \mu\text{g/mL}$, frente a *L. monocytogenes*. De igual manera, *U. baccifera* demostró ser excepcional para inhibir a *E. coli*, dado que, requirió de las menores concentraciones tanto para el extracto metanólico como etanólico ($16,00 \pm 0,35$; $27,00 \pm 0,87 \mu\text{g/mL}$). En el caso de *S. aureus*, el EtOH de *U. urens* y *U. baccifera* junto con el MtOH de *U. urens*, inhibieron a una menor concentración ($13,00 \pm 0,87$; $13,03 \pm 0,40$; $11,00 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$). *L. monocytogenes* fue contrarrestada a una concentración de $13,77 \pm 0,46 \mu\text{g/mL}$ de EtOH de *U. dioica* y por último EtOH de *U. baccifera* junto con MtOH de *U. dioica*, *U. urens* y *U. leptophylla* inhabilitaron a *B. cereus* ($16,00 \pm 0,35$; $16,20 \pm 0,35$; $13,27 \pm 0,40$; $16,50 \pm 0,87 \mu\text{g/mL}$). La CMB presentó resultados

muy similares a los de la CMI, con ligeras diferencias en la concentración de los extractos (Tabla 9). La diferencia de la sensibilidad de las bacterias Gram-positivas (*S.aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*) y Gram-negativas (*E.coli*) puede atribuirse a la diferencia existente entre sus morfologías constitucionales, las bacterias gram-negativas presentan una membrana fosfolipídica externa que contiene los componentes lipopolisacáridos estructurales, esto permite que la pared celular sea menos permeable a compuestos antimicrobianos; por lo tanto, las bacterias Gram-positivas al poseer únicamente una capa externa de peptidoglicano no presentan impermeabilidad, siendo más susceptibles a dichos compuestos (Mzid *et al.*, 2017;Kaushik *et al.*, 2015). De igual manera, Martín, (2018), menciona que, un mecanismo de inhibición de los extractos se basa en los componentes polifenólicos, los cuales se adhieren al ADN de las bacterias, impidiendo la síntesis de proteínas y generación de compuesto, lo que provoca una ruptura de la membrana y posteriormente la muerte celular.

Los valores de la CMI de EtOH de *U. dioica* frente a *S. aureus* ($31,50 \pm 0,87 \mu\text{g/mL}$) tienen gran similitud con los obtenidos por Belabbas, (2020), que fueron de 0,039 mg/mL frente a la cepa *S. aureus* ATCC 29213. Sin embargo, existe una alta variación con respecto a la CMI alcanzada por el mismo autor frente a *L. monocytogenes* ATCC 7644 (2.5 mg/mL) y *B. cereus* ATCC 10876 (0.156 mg/mL) y *E. coli* ATCC 10536 (1,25 mg/mL). Esta tergiversación puede ser resultado de las cepas bacterianas utilizadas, dado que Kukrić *et al.*, (2012), realizó un experimento con los mismos parámetros (EtOH de *U. dioica*) frente a *E. coli* del tracto urinario y *E. coli* de los alimentos, obteniendo resultados diferentes, 72.43 y 36, 21 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Dichos valores se asemejan más a los obtenidos en esta investigación. En un experimento ejecutado en la India, determinaron que el MtOH de *U. dioica* logra una CMI para *E. coli* a 125 $\mu\text{g/mL}$ y 250 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus* (Rolta *et al.*, 2020). El estudio de Mzid *et al.*, (2017) reportó que los EtOH de *U. urens* exhiben actividad altamente bactericida frente a *S. aureus*, *B. subtilis* y *E. coli* a una concentración de 150 $\mu\text{g/mL}$. Según, la actividad antimicrobiana de EtOH de *U. urens* está influenciada por los componentes de tipo terpenos y flavonoides, puesto que en el análisis fitoquímico evidenciaron la presencia de triterpenos y flavonoides (Salem *et al.*, 2021). Como se puede evidenciar, existe gran incertidumbre conforme a los resultados planteados por distintos autores, Kregiel *et al.*, (2018) reafirma lo propuesto por Cuti & Prado, (2019) y sugiere que las variaciones pueden estar asociadas con la hábitat de la planta, su ubicación y condiciones climáticas, también puede influir las técnicas aplicadas para la extracción y métodos de evaluación.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se identificó que los extractos metanólicos obtenidos mediante el método Soxhlet generan rendimientos superiores a los extractos hidroalcohólicos. *U. dioica* y *U. leptophylla* exhibieron los mejores rendimientos en la extracción metanólica, con valores de $2,487 \pm 0,08$ y $2,340 \pm 0,08$, respectivamente. En este contexto, las especies vegetales junto con los solventes influyen significativamente en el rendimiento de los extractos.
- Todos los extractos analizados presentaron índices aceptables de actividad antioxidante. Se evidenció que la concentración de los extractos y las especies vegetales influyen directamente al porcentaje de inhibición de DPPH. A medida que la concentración aumentó, también lo hizo el porcentaje de inhibición. El extracto metanólico de *U. baccifera* presentó resultados superiores en relación a sus contrapartes, alcanzando un porcentaje de inhibición de $76,83 \pm 0,93$ %, equivalente a $435,80 \pm 2,79$ $\mu\text{mol ET/L}$. Por otra parte, en lo concerniente a los extractos etanólicos, *U. dioica* demostró un alto poder antioxidante ($62,49 \pm 2,49\%$ y $356,02 \pm 8,57$ $\mu\text{mol ET/L}$).
- Los extractos presentan índices considerables de compuestos fenólicos, que varían dependiendo de la matriz vegetal, el método de extracción, el tipo de solvente y la temperatura. Basado en estos parámetros, se evidenció que los extractos etanólicos superan ampliamente a los metanólicos. Los fenoles totales se ven influenciados significativamente por los métodos de extracción y la matriz vegetal. La extracción hidroalcohólica de *U. dioica* y *U. baccifera* mostraron una mayor cantidad de compuestos fenólicos ($87,840 \pm 2,835$ mg GAE/g y $83,333 \pm 1,111$ mg GAE/g).
- Los extractos etanólicos y metanólicos de las cuatro especies de ortiga presentaron actividad inhibitoria frente a bacterias patógenas. En el caso de *E. coli*, *U.*

baccifera demostró ser una buena opción para inhibir a *E. coli*, puesto que, necesitó concentraciones menores tanto para el extracto metanólico como etanólico ($16,00 \pm 0,35$; $27,00 \pm 0,87$ $\mu\text{g/mL}$). En el caso de *S. aureus*, el extracto etanólico de *U. urens*, inhibió a una menor concentración ($13,00 \pm 0,87$ $\mu\text{g/mL}$). *L. monocytogenes* fue neutralizada a una concentración de $13,77 \pm 0,46$ $\mu\text{g/mL}$ de extracto metanólico de *U. dioica* y finalmente el extracto metanólico de *U. urens* inhabilitó a *B. cereus* con $13,27 \pm 0,40$ $\mu\text{g/mL}$. Los métodos de extracción y las especies vegetales afectan considerablemente la CMI de cada bacteria.

4.2. Recomendaciones

- Examinar métodos de extracción convencionales y no convencionales que permitan mejorar el rendimiento de los extractos, así como también la cantidad y calidad de compuestos bioactivos extraíbles.
- Utilizar solventes como el agua, acetona, glicerina, hexano a distintas concentraciones, con el fin de evaluar su rendimiento y capacidades biológicas de los extractos vegetales.
- Analizar otras actividades biológicas como la actividad antiinflamatoria fotoprotectora, antifúngica, hipoglucemiante, antineurodegenerativas, entre otras.
- Realizar un análisis cromatográfico que permita identificar todos los metabolitos secundarios presentes en cada una de las especies de ortiga.
- Ejecutar pruebas antimicrobianas con cepas resistentes a antibióticos, con el fin de determinar una posible alternativa a partir de fuentes vegetales para combatir la resistencia microbiana.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, N., Dahmane, D., Hafitha, M., Soumeya, M., & Soumeya, K. (2022). Effect of extraction mode on phenolics contents and biological activities of two species of thyme extracts . *Effet dumode d ' extraction sur les contenus phénoliques et les.* 12(2), 3204–3216.
- Alcaide, F., Esteban, J., González-Martin, J., & Palacios, J.-J. (2017). Métodos de determinación de sensibilidad a los antimicrobianos en micobacterias. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 35, Issue 8). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.04.008>
- ARCSA. (2015). Listado de plantas medicinales del Ecuador realizada a partir de revisiones bibliográficas. *Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria., Direccion.*
- Bañuelos, R., Delgadillo, L., Echavarría, F., Delgadillo, O., & Meza, C. (2018). Chemical composition and fur of ethane extracts of *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* and *Ruta graveolens*. *Agrociencia*, 52(3), 309–321.
- Begić, S., Horozić, E., Alibašić, H., Bjelić, E., Seferović, S., Kozarević, E. C., Ibišević, M., Zukić, A., Karić, E., & Softić, M. (2020). Antioxidant Capacity and Total Phenolic and Flavonoid Contents of Methanolic Extracts of *Urtica dioica* L. by Different Extraction Techniques. *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry*, December, 207–214. <https://doi.org/10.9734/irjpac/2020/v21i2330319>
- Belabbas, M. (2020). Composition chimique et propriétés biologiques des polyphénols de l ' ortie (*Urtica dioica* L .). 2019–2020.
- Borges, A., José, H., Homem, V., & Simões, M. (2020). Comparison of Techniques and Solvents on the Antimicrobial and Antioxidant Potential of Extracts from *Acacia dealbata* and *Olea europaea*. *Antibiotics 2020*, Vol. 9, Page 48, 9(2), 48. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9020048>
- Bouabid, K., Lamchouri, F., Toufik, H., & Faouzi, M. E. A. (2020). Phytochemical investigation, *in vitro* and *in vivo* antioxidant properties of aqueous and organic extracts of toxic plant: *Atractylis gummifera* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 253,

112640. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2020.112640>

- Bourgeois, C., Leclerc, É. A., Corbin, C., Doussot, J., Serrano, V., Vanier, J. R., Seigneuret, J. M., Auguin, D., Pichon, C., Lainé, É., & Hano, C. (2016). Nettle (*Urtica dioica* L.) as a source of antioxidant and anti-aging phytochemicals for cosmetic applications. *Comptes Rendus Chimie*, 19(9), 1090–1100. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2016.03.019>
- Caballero-Serrano, V., McLaren, B., Carrasco, J. C., Alday, J. G., Fiallos, L., Amigo, J., & Onaindia, M. (2019). Traditional ecological knowledge and medicinal plant diversity in Ecuadorian Amazon home gardens. *Global Ecology and Conservation*, 17, e00524. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00524>
- Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1).
- Carvalho, A. R., Costa, G., Figueirinha, A., Liberal, J., Prior, J. A. V., Lopes, M. C., Cruz, M. T., & Batista, M. T. (2017). *Urtica spp.*: Phenolic composition, safety, antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Research International*, 99, 485–494. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.008>
- Cidade, H., Rocha, V., Palmeira, A., Marques, C., Tiritan, M. E., Ferreira, H., Lobo, J. S., Almeida, I. F., Sousa, M. E., & Pinto, M. (2020). *In silico* and *in vitro* antioxidant and cytotoxicity evaluation of oxygenated xanthone derivatives. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1), 17–26. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2017.01.006>
- Cuti, G., & Prado, Y. (2019). Evaluación de la actividad antioxidante y citotóxica del extracto etanólico de las flores de *Brassica rapa* (flor de nabo). [Http://repositorio.unid.edu.pe/bitstream/handle/unid/47/11 CUTI CHULLO y PRADO PAREDES.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unid.edu.pe/bitstream/handle/unid/47/11_CUTI_CHULLO_y_PRADO_PAREDES.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Đurović, S., Pavlić, B., Šorgić, S., Popov, S., Savić, S., Pertoničević, M., Radojković, M., Cvetanović, A., & Zeković, Z. (2017). Chemical composition of stinging nettle leaves obtained by different analytical approaches. *Journal of Functional Foods*, 32, 18–26. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2017.02.019>
- Flórez, M., Cazón, P., & Vázquez, M. (2022). Antioxidant Extracts of Nettle (*Urtica dioica*) Leaves: Evaluation of Extraction Techniques and Solvents. *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 6015, 27(18), 6015. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27186015>

- Fortune Business Insights. (2022). Herbal medicine market size, shar & COVID-19 impact analysis, by application (Pharmaceutical & nutraceutical, food& beverages, and Personal care & beuty products) form (Powder, liquid & gel, and tablets & capsules), and Regional forecast, 2021-2028.
- García, J., Sánchez, E., Gomez, M. L., Martínez, L., Rodríguez, C., & Vila, J. (2008). Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Seimc.Org*, 40. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia30.pdf>
- Garofulić, I. E., Malin, V., Repajić, M., Zorić, Z., Pedisić, S., Sterniša, M., Možina, S. S., & Dragović-Uzelac, V. (2021). Phenolic Profile, Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity of Nettle Leaves Extracts Obtained by Advanced Extraction Techniques. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 6153, 26(20), 6153. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26206153>
- Getachew, S., Medhin, G., Asres, A., Abebe, G., & Ameni, G. (2022). Traditional medicinal plants used in the treatment of tuberculosis in Ethiopia: A systematic review. *Heliyon*, 8(5), e09478. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2022.E09478>
- Gindri, A. L., De Souza, L. B., Cruz, R. C., Boligon, A. A., Machado, M. M., & Athayde, M. L. (2014). Genotoxic evaluation, secondary metabolites and antioxidant capacity of leaves and roots of *Urera baccifera* Gaudich (*Urticaceae*). *Natural Product Research*, 28(23), 2214–2216. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.920333>
- Girón, W. (2018). Antimicrobianos. *Universidad Nacional Autónoma de Honduras*, 3.
- Guamán, F. (2015). Determinación y comparación de la actividad antibacteriana In Vitro de extractos de dos especies de Ortiga sobre bacterias de importancia clínica. *Facultad de Ciencias, Bachelor*, 115. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/15943/1/T-UCE-0008-CQU-018.pdf>
- Gutiérrez, Y. I., Lizama, R. S., González, A. F., Fuentes, M. D., Casanova, R. M., & Galarza, L. M. (2020). Physicochemical characterization and preliminary diuretic activity of *Urera baccifera* (L.) watery extracts. *Revista Cubana de Farmacia*, 53(3), 1–17.

- Hernández, S., Quiroz, C. N., Ramírez, M. E., Ronquillo, E., & Aguilar, M. Á. (2020). Optimización del proceso de extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de *Justicia spicigera* Schltdl. mediante la metodología de superficie de respuesta. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 23, 1–7. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.246>
- Jyoti, K., Baunthiyal, M., & Singh, A. (2016). Characterization of silver nanoparticles synthesized using *Urtica dioica* Linn. leaves and their synergistic effects with antibiotics. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(3), 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.10.002>
- Kaushik, A., Aron, A., Mihreteab, S., Mohamedkassm, N., & Kidane, E. M. (2015). Phytochemical screening and antimicrobial activity of medicinal plants used by Eritrean traditional healers. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(4), 501–509.
- Köksal, E., Bursal, E., Gülçin, İ., Korkmaz, M., Çağlayan, C., Gören, A. C., & Alwasel, S. H. (2016). Antioxidant activity and polyphenol content of Turkish thyme (*Thymus vulgaris*) monitored by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1168438>, 20(3), 514–525. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1168438>
- Kowalska, G., Baj, T., Kowalski, R., & Szymańska, J. (2021). Optimization of Glycerol–Water Extraction of Selected Bioactive Compounds from Peppermint and Common Nettle. *Antioxidants* 2021, Vol. 10, Page 817, 10(5), 817. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10050817>
- Kregiel, D., Pawlikowska, E., & Antolak, H. (2018). *Urtica spp.*: Ordinary plants with extraordinary properties. *Molecules*, 23(7), 1–21. <https://doi.org/10.3390/molecules23071664>
- Kukrić, Z. Z., Topalić-Trivunović, L. N., Kukavica, B. M., Matoš, S. B., Pavičić, S. S., Boroja, M. M., & Savić, A. V. (2012a). Characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (*Urtica dioica* L.). *Acta Periodica Technologica*, 43, 257–272. <https://doi.org/10.2298/APT1243257K>
- Kukrić, Z. Z., Topalić-Trivunović, L. N., Kukavica, B. M., Matoš, S. B., Pavičić, S. S., Boroja, M. M., & Savić, A. V. (2012b). Characterization of antioxidant and

- antimicrobial activities of nettle leaves (*Urtica dioica* L.). *Acta Periodica Technologica*, 43, 257–272. <https://doi.org/10.2298/APT1243257K>
- Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., & Wu, H. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148, 80–89. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2020.01.006>
- MAE. (2015). Especies forestales arbóreas y arbustivas de los bosques montanos del Ecuador. *Ministerio Del Ambiente de Ecuador-MAE*, 174. <https://biblio.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/55826.pdf>
- Martín, D. A. (2018). Los Compuestos Fenólicos, Un Acercamiento A Su Biosíntesis, Síntesis Y Actividad Biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(1), 81–104. <https://doi.org/10.22490/21456453.1968>
- Mestanza, C., Henkanathgedara, S. M., Vásquez, P., Vargas, Y., Sánchez, M., Constante, D., Jimenez, M., Charco, M., & Mestanza, P. (2020). diversity *In-Situ* and *Ex-Situ* Biodiversity Conservation in Ecuador: A Review of Policies, Actions and Challenges. *Diversity*, 12, 315. <https://doi.org/10.3390/d12080315>
- Moncayo, S., Cornejo, X., Castillo, J., & Valdez, V. (2021). Preliminary phytochemical screening for antioxidant activity and content of phenols and flavonoids of 18 species of plants native to western Ecuador. *Trends in Phytochemical Research (TPR) Trends Phytochem. Res*, 5(2), 2021–2092. <https://doi.org/10.30495/TPR.2021.1922658.1196>
- Morales, F., Padilla, S., & Falconí, F. (2016). Medicinal Plants Used in Traditional Herbal Medicine in the Province of Chimborazo, Ecuador. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14(1), 10–15. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i1.2>
- Mzid, M., Khedir, S. Ben, Salem, M. Ben, Regaieg, W., & Rebai, T. (2017). Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol and aqueous extracts from *Urtica urens*. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 775–781. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1275025>
- Namdeo, A. G. (2018). Cultivation of Medicinal and Aromatic Plants. In *Natural Products and Drug Discovery: An Integrated Approach*. Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102081-4.00020-4>

- OMS. (2016). Global Report on Diabetes. *Isbn*, 978, 6–86. http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/index.html
- OMS. (2019). WHO Global Report On Traditional and Complementary Medicine 2019. In *World Health Organization*. <http://apps.who.int/bookorders>.
- Ortega, A. B. (2018). Determinación del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*) y orégano (*Origanum vulgare*) frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC: 12600". 106. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15045/1/UPS-CT007429.pdf>
- Özkan, A., Yumrutaş, Ö., Saygideğer, S. D., & Kulak, M. (2011). Corresponding Author Evaluation of Antioxidant Activities and Phenolic Contents of Some Edible and Medicinal Plants from Turkey's Flora: Evaluation of Antioxidant Activities and Phenolic Contents of Some Edible and Medicinal Plants from Turkey's Flora. *Advances in Environmental Biology*, 5(2), 231–236.
- Palhares, R. M., Drummond, M. G., Dos Santos Alves Figueiredo Brasil, B., Cosenza, G. P., Das Graças Lins Brandão, M., & Oliveira, G. (2015). Medicinal Plants Recommended by the World Health Organization: DNA Barcode Identification Associated with Chemical Analyses Guarantees Their Quality. *PLoS ONE*, 10(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0127866>
- Pazmiño, N. (2008). Extracción y microencapsulación de licopeno extraído a partir de residuos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) y su formulación en cápsulas duras. 1–84. <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/2163/4/Maestría V. T. 33 - Almeida Lema Vinicio Fabián.pdf>
- Pomboza, P., Quisintuña, L., Dávila, M., Llopis, C., & Vásquez, C. (2016). Hábitats y usos tradicionales de especies de *Urtica l.* en la cuenca alta del Rio Ambato, Tungurahua- Ecuador. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 4(2), 48–58. <https://doi.org/10.36610/j.jsab.2016.040200048>
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J., & Shahabimajid, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(11), 1142–1145. <https://doi.org/10.1055/s-2007-987042>

- Rasool, B. (2012). Medicinal Plants (Importance and Uses). *Pharmaceutica Analytica Acta*, 03(10), 4172. <https://doi.org/10.4172/2153-2435.1000e139>
- Rets'epile, P. M., Manoharan, K. P., & Sibusisiwe, M. (2020). DPPH radical scavenging activity of extracts from *Urtica urens* (*Urticaceae*). *Journal of Medicinal Plants Research*, 14(5), 232–238. <https://doi.org/10.5897/jmpr2019.6880>
- Robalino, A. (2019). “Eficancia antimicrobiana de aceites esenciales de tomillo (*T. vulgaris*), canela (*C. verum*), romero (*R. officinalis*), laurel (*L. nobilis*) sobre cepas de *Pasteurella multocida* Y *Bordetella bronchiseptica*”. <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/30109>
- Rodrigues, R. F. C., Lima, A., Melo, A. C. F. L., & Trindade, R. A. (2019). Physicochemical characterisation, bioactive compounds and *in vitro* antioxidant activities of commercial integral grape juices. *International Food Research Journal*, 26(2), 469–479.
- Rolta, R., Kumar, V., Sourirajan, A., Upadhyay, N. K., & Dev, K. (2020). Phytochemicals of three medicinal plants (*Juniperus communis*, *Urtica dioica* and *Coleus forskohlii*) of north west himalayas increases the potency of antibacterial and antifungal antibiotics. 20(2), 481–489.
- Romoleroux, K., Cárate, D., Erlen, R., & Hugo, N. (2016). Plantas vasculares de los bosques de Polypepis en los páramos de Oyacachi.
- Salem, H., Kerfouf, A., Abdelfettah, B., Toumi-Benali, F., & Benyamina, A. (2021). Antioxidant, Antibacterial and Antifungal Activities of the Aqueous and Hydroalcoholic Extracts of Western Algerian *Urtica urens*. *South Asian J Exp Biol*, 11(3), 3. [https://doi.org/10.38150/sajeb.11\(3\).p327-336](https://doi.org/10.38150/sajeb.11(3).p327-336)
- Salih, N. A. (2014). Antibacterial effect of nettle (*Urtica dioica*). *Al-Qadisiyah Journal of Veterinary Medicine Sciences*, 13(1), 1. <https://doi.org/10.29079/vol13iss1art270>
- Sanchita, & Sharma, A. (2018). Gene Expression Analysis in Medicinal Plants Under Abiotic Stress Conditions. In *Plant Metabolites and Regulation under Environmental Stress*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812689-9.00023-6>
- Scarano, F. R., Fornero Aguiar, A. C., Mittermeier, R. A., & Rylands, A. B. (2021).

Megadiversity. *Reference Module in Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822562-2.00013-x>

- Semalty, M., Semalty, A., Rawat, B. S., Singh, D., Joshi, G. P., & Rawat, M. S. M. (2010). In vitro antioxidant activity of roots of *Urtica dioica* (nettle). *Indian Drugs*, 47(5), 55–58.
- Shin, J., Prabhakaran, V. S., & Kim, K. sun. (2018). The multi-faceted potential of plant-derived metabolites as antimicrobial agents against multidrug-resistant pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 116, 209–214. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2018.01.043>
- Sowjanya, P., Srinivasa, B. P., & Lakshmi, N. M. (2015). Phytochemical analysis and antibacterial efficacy of *Amaranthus tricolor* (L) methanolic leaf extract against clinical isolates of urinary tract pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, 9(20), 1381–1385. <https://doi.org/10.5897/ajmr2015.7294>
- Stanojević, L. P., Stanković, M. Z., Cvetković, D. J., Cakić, M. D., Ilić, D. P., Nikolić, V. D., & Stanojević, J. S. (2016). The effect of extraction techniques on yield, extraction kinetics, and antioxidant activity of aqueous-methanolic extracts from nettle (*Urtica dioica* L.) leaves. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, 51(11), 1817–1829. <https://doi.org/10.1080/01496395.2016.1178774>
- Telenchana, E. (2019). Evaluación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de antocianinas microencapsuladas a partir de cáscaras de berenjena (*Solanum melongena*).
- Thomé, O. W. (2011). Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. *Flora von Deutschland, Österreich Und Der Schweiz*. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.11981>
- Vargas, M. (2002). *Ecología y Biodiversidad del Ecuador. Primera edición*. M. Vargas.
- Velasco, R., Tapia, R., Ruíz, J., Sánchez, T., Herrerasolis, R., & Santana, J. (2021). Antibacterial activity of three *Urtica* species. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 12(2), 1293–1299. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.12\(2\).1293-99](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.12(2).1293-99)
- Velasteguí, E. (2018). Consecuencias de la disminución de la flora endémica del Mundo, Ecuador y la Amazonia. *ConcienciaDigital*, 1(2), 53–63.

<https://doi.org/10.33262/concienciadigital.v1i2.859>

Weigend, M., Cano, A., & Rodríguez, E. (2013). Nuevos registros y nuevas especies de la flora de la zona de AmotapeHuancabamba: Endemismos y límites biogeográficos. *Revista Peruana de Biología*, 12(2). <https://doi.org/10.15381/rpb.v12i2.2398>

Zeković, Z., Cvetanović, A., Švarc-Gajić, J., Gorjanović, S., Sužnjević, D., Mašković, P., Savić, S., Radojković, M., & Đurović, S. (2017). Chemical and biological screening of stinging nettle leaves extracts obtained by modern extraction techniques. *Industrial Crops and Products*, 108, 423–430. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2017.06.055>

Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine (United Kingdom)*, 13(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/S13020-018-0177-X/FIGURES/13>

ANEXOS

ANEXO A. Certificado de la identificación taxonómica de las especies vegetales.



ANEXO B. Autorización de recolección de especímenes de especies de la diversidad biológica.



AUTORIZACIÓN DE RECOLECCION DE ESPECIMENES DE ESPECIES DE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA No. 2721

ESTUDIANTES E INVESTIGADORES (SIN FINES COMERCIALES)

1.- AUTORIZACIÓN DE RECOLECTA DE ESPECÍMENES DE ESPECIES LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA

2.- CÓDIGO

MAATE-ARSFC-2022-2721

3.- DURACIÓN DEL PROYECTO

FECHA INICIO	FECHA FIN
2022-12-05	2023-06-05

4.- COMPONENTE A RECOLECTAR

Plantae

El Ministerio del Ambiente y Agua, en uso de las atribuciones que le confiere la Codificación a la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre autoriza a:

5.- INVESTIGADORES / TÉCNICOS QUE INTERVENDRÁN EN LAS ACTIVIDADES DE RECOLECCION

Nº de C./Pasaporte	Nombres y Apellidos	Nacionalidad	Nº REGISTRO SENESCYT	EXPERIENCIA	GRUPO BIOLÓGICO
1804697256	MARIÑO MANZANO KEVIN DANIEL	Ecuatoriana	Estudiante		Magnoliopsida
1803571585	GARCES MONCAYO MARIA DANIELA	Ecuatoriana	1038-2021-2268550	Microbiología	Magnoliopsida

6.- PARA QUE LLEVEN A CABO LA RECOLECCION DE ESPECIMENES DE ESPECIES LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA:

Nombre del Proyecto: Determinación del efecto antioxidante y antimicrobiano de extractos de diferentes tipos de ortifa frente a cepas de Staphylococcus aureus Escherichia coli Listeria monocytogenes y Bacillus cereus

Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica

Dirección: Calle Madrid 1159 y Andalucía

Código postal: 170525 / Quito-Ecuador

Teléfono: +593-2 398 7600

www.ambiente.gob.ec



biológico.

11. Depositar los holotipos en una institución científica depositaria de material biológico.
12. Los holotipos solo podrán salir del país en calidad de préstamo por un periodo no más de un año.
13. Las muestras biológicas a ser depositadas deberán ingresar a las colecciones respectivas siguiendo los protocolos emitidos por el Curador/a custodio de los especímenes.
14. Las muestras deberán ser preservadas, curadas y depositadas de lo contrario, se deberán sufragar los gastos que demanden la preparación del material para su ingreso a la colección correspondiente.

Del incumplimiento de las obligaciones dispuestas en los numerales, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 se responsabiliza a **MARIÑO MANZANO KEVIN DANIEL**.

DIRECTOR DE BIODIVERSIDAD
LAGLA CHIMBA BYRON ADRIAN
2022-11-30

ANEXO C. Análisis estadístico para el rendimiento de los extractos.

Tabla C1. Análisis de varianza ANOVA para el rendimiento de los extractos.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Ortigas	3	2,16260	0,72087	104,07	0,000
Extractos	1	4,08343	4,08343	589,51	0,000
Ortigas*Extractos	3	0,12133	0,04044	5,84	0,021
Error	8	0,05541	0,00693		
Total	15	6,42278			

Tabla C2. Prueba de rangos multiples Tukey para los rendimientos de los extractos.

Ortigas*Extractos	N	Media	Agrupación
<i>U.dioca</i> -Metanólico	2	2,4870	A
<i>U.leptophylla</i> - Metanólico	2	2,3395	A B
<i>U.urens</i> -Metanólico	2	2,1505	B
<i>U.leptophylla</i> -Etanólico	2	1,4025	C
<i>U.baccifera</i> -Metanólico	2	1,3665	C
<i>U.dioca</i> -Etanólico	2	1,3180	C
<i>U.urens</i> -Etanólico	2	0,9740	D
<i>U.baccifera</i> -Etanólico	2	0,6075	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANEXO D. Análisis estadístico de actividad antioxidante

Tabla D1. Análisis de varianza ANOVA para la actividad antioxidante

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Ortigas	3	13917,8	4639,26	2150,59	0,000
Extractos	1	596,3	596,32	276,43	0,000
Concentraciones	5	27101,2	5420,24	2512,62	0,000
Concentraciones*Extractos	5	135,3	27,07	12,55	0,000
Concentraciones*Ortigas	15	722,0	48,14	22,31	0,000
Extractos*Ortigas	3	16338,6	5446,20	2524,65	0,000
Concentraciones*Extractos*Ortigas	15	649,2	43,28	20,06	0,000
Error	96	207,1	2,16		
Total	143	59667,6			

Tabla D2. Prueba de rangos múltiples Tukey para actividad antioxidante

Concentraciones*Extractos*Ortigas	N	Media	Agrupación
3000 Metanólico <i>U. baccifera</i>	3	78,2910	A
2000 Metanólico <i>U. baccifera</i>	3	74,6728	A B
1500 Metanólico <i>U. baccifera</i>	3	72,7483	B
1000 Metanólico <i>U. baccifera</i>	3	67,7444	C
3000 Metanólico <i>U. urens</i>	3	67,2825	C D
2000 Metanólico <i>U. urens</i>	3	62,6636	D
3000 Etanólico <i>U. dioica</i>	3	62,4901	D
3000 Etanólico <i>U. baccifera</i>	3	57,1316	E
1500 Metanólico <i>U. urens</i>	3	55,6582	E
2000 Etanólico <i>U. dioica</i>	3	54,3735	E F
3000 Etanólico <i>U. urens</i>	3	53,0339	E F G
2000 Etanólico <i>U. baccifera</i>	3	49,8818	F G H
1500 Etanólico <i>U. dioica</i>	3	49,8030	F G H
500 Metanólico <i>U. baccifera</i>	3	49,3457	G H
3000 Etanólico <i>U. leptophylla</i>	3	47,9905	H
1000 Etanólico <i>U. dioica</i>	3	46,8085	H I
2000 Etanólico <i>U. urens</i>	3	43,0260	I J
1000 Metanólico <i>U. urens</i>	3	42,8022	I J
3000 Metanólico <i>U. dioica</i>	3	41,6474	J
250 Metanólico <i>U. baccifera</i>	3	38,2602	J K
1500 Etanólico <i>U. urens</i>	3	35,9338	K L
1500 Etanólico <i>U. baccifera</i>	3	35,8550	K L
3000 Metanólico <i>U. leptophylla</i>	3	35,7968	K L
500 Metanólico <i>U. urens</i>	3	35,1809	K L M

500 Etanólico <i>U.dioica</i>	3	33,4121	K L M
2000 Etanólico <i>U. leptophylla</i>	3	33,0181	L M N
2000 Metanólico <i>U.dioica</i>	3	30,7159	M N O
1000 Etanólico <i>U. urens</i>	3	28,3688	N O P
1000 Etanólico <i>U. baccifera</i>	3	27,8172	O Q
1500 Etanólico <i>U. leptophylla</i>	3	26,9504	O Q R
250 Metanólico <i>U. urens</i>	3	26,0200	O Q R S
1500 Metanólico <i>U.dioica</i>	3	25,7891	Q R S
500 Etanólico <i>U. urens</i>	3	24,0347	Q R S T
2000 Metanólico <i>U. leptophylla</i>	3	23,0947	Q R S T
250 Etanólico <i>U.dioica</i>	3	22,7738	R S T
1000 Etanólico <i>U. leptophylla</i>	3	21,1190	S T
1500 Metanólico <i>U. leptophylla</i>	3	20,2463	T
1000 Metanólico <i>U. leptophylla</i>	3	15,2425	U
1000 Metanólico <i>U.dioica</i>	3	15,1655	U
500 Etanólico <i>U. baccifera</i>	3	13,4752	U V
250 Etanólico <i>U. urens</i>	3	13,4752	U V
500 Etanólico <i>U. leptophylla</i>	3	10,4019	U V W
500 Metanólico <i>U. leptophylla</i>	3	9,7768	V W
250 Etanólico <i>U. leptophylla</i>	3	6,7770	W X
500 Metanólico <i>U.dioica</i>	3	6,6205	W X
250 Etanólico <i>U. baccifera</i>	3	5,9102	W X
250 Metanólico <i>U.dioica</i>	3	3,6952	X
250 Metanólico <i>U. leptophylla</i>	3	3,0793	X

Tabla D3. Análisis de varianza ANOVA para el equivalente Trolox.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Extracto	1	19,6	19,6	1,15	0,316
Especies	3	47622,1	15874,0	929,24	0,000
Extracto*Especies	3	40334,8	13444,9	787,05	0,000
Error	8	136,7	17,1		
Total	15	88113,2			

Tabla D4. Prueba de rangos múltiples para el equivalente Trolox

Extracto*Especies	N	Media	Agrupación
Metanólico <i>U. baccifera</i>	2	435,797	A
Metanólico <i>U. urens</i>	2	382,501	B
Etanólico <i>U. dioica</i>	2	356,023	C

Etanólico <i>U. baccifera</i>	2	323,021	D
Etanólico <i>U. urens</i>	2	297,427	E
Etanólico <i>U. leptophylla</i>	2	263,077	F
Metanólico <i>U. dioica</i>	2	225,905	G
Metanólico <i>U. leptophylla</i>	2	204,192	H

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANEXO E. Análisis estadístico de los compuestos fenólicos totales.

Tabla E1. Análisis de varianza ANOVA de los compuestos fenólicos

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Extractos	1	4764,7	4764,68	2192,88	0,000
Especies	3	6004,6	2001,53	921,18	0,000
Extractos*Especies	3	2858,6	952,87	438,54	0,000
Error	16	34,8	2,17		
Total	23	13662,7			

Tabla E2. Prueba de rangos múltiples Tukey para compuestos fenólicos

Extractos*Especies	N	Media	Agrupación
Etanólico <i>U. dioica</i>	3	87,8365	A
Etanólico <i>U. baccifera</i>	3	83,3333	B
Metanólico <i>U. urens</i>	3	70,4938	C
Etanólico <i>U. urens</i>	3	70,1577	C
Metanólico <i>U. baccifera</i>	3	52,1358	D
Etanólico <i>U. leptophylla</i>	3	41,1111	E
Metanólico <i>U. dioica</i>	3	27,4346	F
Metanólico <i>U. leptophylla</i>	3	19,6543	G

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANEXO F. Análisis estadístico de la actividad antimicrobiana.

ANEXO F1. ANOVA para *E. coli*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Extractos	1	186,48	186,48	497,29	0,000
Especies	3	4937,80	1645,93	4389,16	0,000
Extractos*Especies	3	897,55	299,18	797,82	0,000
Error	16	6,00	0,37		
Total	23	6027,84			

ANEXO F2. Prueba de rangos múltiples Tukey para *E. coli*

Extractos*Especies	N	Media	Agrupación
Metanólico <i>U.leptophylla</i>	3	66,0	A
Metanólico <i>U. urens</i>	3	54,0	B
Etanólico <i>U.leptophylla</i>	3	53,5	B C
Etanólico <i>U.dioica</i>	3	52,0	C
Metanólico <i>U.dioica</i>	3	52,0	C
Etanólico <i>U. urens</i>	3	33,0	D
Etanólico <i>U. baccifera</i>	3	27,0	E
Metanólico <i>U. baccifera</i>	3	15,8	F

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANEXO F3. ANOVA para *S. aureus*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Extractos	1	33,84	33,84	2,14	0,163
Especies	3	3667,39	1222,46	77,15	0,000
Extractos*Especies	3	161,86	53,95	3,40	0,043
Error	16	253,53	15,85		
Total	23	4116,64			

ANEXO F4. Prueba de rangos múltiples Tukey para *S. aureus*

Extractos*Especies	N	Media	Agrupación
Metanólico <i>U.dioica</i>	3	48,5000	A
Etanólico <i>U.dioica</i>	3	38,1667	A B
Etanólico <i>U.leptophylla</i>	3	28,5000	B C
Metanólico <i>U.leptophylla</i>	3	26,0000	C D
Metanólico <i>U. baccifera</i>	3	16,7000	D E

Etanólico <i>U. baccifera</i>	3	13,0333	E
Etanólico <i>U. urens</i>	3	13,0000	E
Metanólico <i>U. urens</i>	3	11,0000	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANEXO F5. ANOVA para *L. monocytogenes*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Extractos	1	111,37	111,370	205,29	0,000
Especies	3	722,07	240,692	443,67	0,000
Extractos*Especies	3	1133,46	377,820	696,44	0,000
Error	16	8,68	0,543		
Total	23	1975,59			

ANEXO F6. Prueba de rangos múltiples Tukey para *L. monocytogenes*

Extractos*Especies	N	Media	Agrupación
Etanólico <i>U. urens</i>	3	41,5000	A
Metanólico <i>U. leptophylla</i>	3	28,5000	B
Metanólico <i>U. baccifera</i>	3	27,0000	B
Etanólico <i>U. leptophylla</i>	3	23,0000	C
Etanólico <i>U. baccifera</i>	3	21,5000	C
Metanólico <i>U. urens</i>	3	13,7667	D
Etanólico <i>U. dioica</i>	3	13,7667	D
Metanólico <i>U. dioica</i>	3	13,2667	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANEXO F7. ANOVA para *B. cereus*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Extractos	1	96,40	96,400	226,60	0,000
Especies	3	187,29	62,430	146,75	0,000
Extractos*Especies	3	719,64	239,880	563,87	0,000

Error	16	6,81	0,425
Total	23	1010,14	

ANEXO F8. Prueba de rangos múltiples Tukey para *B. cereus*.

Extractos*Especies	N	Media	Agrupación
Etanólico <i>U.leptophylla</i>	3	31,5000	A
Metanólico <i>U. baccifera</i>	3	28,5000	B
Etanólico <i>U. urens</i>	3	26,0000	C
Etanólico <i>U.dioica</i>	3	17,0000	D
Metanólico <i>U.leptophylla</i>	3	16,5000	D
Metanólico <i>U.dioica</i>	3	16,2000	D
Etanólico <i>U. baccifera</i>	3	16,0000	D
Metanólico <i>U. urens</i>	3	13,2667	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANEXO G. Absorbancia de los extractos en la inhibición de DPPH.

ANEXO G1. Absorbancia del extracto etanólico de *U. dioica*

Concentración	Absorbancia 515 nm (<i>U. dioica</i>)			Promedio	Desviación
	1	2	3		
3000	0,203	0,194	0,215	0,204	0,011
2000	0,232	0,238	0,245	0,238	0,007
1500	0,252	0,263	0,258	0,258	0,006
1000	0,263	0,273	0,275	0,270	0,006
500	0,328	0,324	0,329	0,327	0,003
250	0,373	0,379	0,364	0,372	0,008
Blanco	0,042	0,047	0,047	0,045	0,003
Control	0,471	0,441	0,493	0,468	0,026

ANEXO G2. Absorbancia del extracto etanólico de *U. urens*

Concentración	Absorbancia 515 nm (<i>U. urens</i>)			Promedio	Desviación
	1	2	3		
3000	0,243	0,241	0,248	0,244	0,004
2000	0,279	0,296	0,284	0,286	0,009
1500	0,31	0,325	0,314	0,316	0,008
1000	0,352	0,345	0,348	0,348	0,004
500	0,364	0,369	0,367	0,367	0,003
250	0,414	0,415	0,405	0,411	0,006
Blanco	0,042	0,047	0,038	0,042	0,005
Control	0,471	0,471	0,441	0,461	0,017

ANEXO G3. Absorbancia del extracto etanólico de *U. leptophylla*

Concentración	Absorbancia 515 nm (<i>U. leptophylla</i>)			Promedio	Desviación
	1	2	3		
3000	0,268	0,261	0,267	0,265	0,004
2000	0,326	0,332	0,328	0,329	0,003
1500	0,355	0,349	0,359	0,354	0,005
1000	0,377	0,374	0,386	0,379	0,006
500	0,426	0,426	0,421	0,424	0,003
250	0,447	0,432	0,440	0,440	0,008
Blanco	0,042	0,047	0,047	0,045	0,003
Control	0,471	0,441	0,493	0,468	0,026

ANEXO G4. Absorbancia del extracto etanólico de *U. baccifera*

Concentración	Absorbancia 515 nm (<i>U. baccifera</i>)			Promedio	Desviación
	1	2	3		
3000	0,226	0,234	0,22	0,227	0,007
2000	0,253	0,261	0,258	0,257	0,004
1500	0,319	0,316	0,315	0,317	0,002
1000	0,351	0,355	0,346	0,351	0,005
500	0,416	0,407	0,411	0,411	0,005
250	0,443	0,445	0,442	0,443	0,002
Blanco	0,042	0,047	0,047	0,045	0,003

Control	0,471	0,441	0,493	0,468	0,026
----------------	-------	-------	-------	-------	-------

ANEXO G5. Absorbancia del extracto metanólico de *U. dioica*

Concentración	Absorbancia 515 nm (<i>U. dioica</i>)			Promedio	Desviación
	1	2	3		
3000	0,303	0,292	0,299	0,298	0,006
2000	0,344	0,349	0,343	0,345	0,003
1500	0,362	0,366	0,372	0,367	0,005
1000	0,409	0,414	0,415	0,413	0,003
500	0,453	0,449	0,447	0,450	0,003
250	0,465	0,46	0,462	0,462	0,003
Blanco	0,042	0,047	0,047	0,045	0,003
Control	0,471	0,471	0,493	0,478	0,013

ANEXO G6. Absorbancia del extracto metanólico de *U. urens*

Concentración	Absorbancia 515 nm (<i>U. urens</i>)			Promedio	Desviación
	1	2	3		
3000	0,183	0,181	0,197	0,187	0,009
2000	0,199	0,216	0,206	0,207	0,009
1500	0,233	0,238	0,241	0,237	0,004
1000	0,284	0,301	0,294	0,293	0,009
500	0,324	0,339	0,315	0,326	0,012
250	0,370	0,361	0,366	0,366	0,005
Blanco	0,042	0,047	0,038	0,042	0,005
Control	0,471	0,471	0,441	0,461	0,017

ANEXO G7. Absorbancia del extracto metanólico de *U. leptophylla*

Concentración	Absorbancia 515 nm (<i>U. leptophylla</i>)			Promedio	Desviación
	1	2	3		
3000	0,335	0,318	0,317	0,323	0,010
2000	0,389	0,376	0,37	0,378	0,010
1500	0,375	0,395	0,402	0,391	0,014
1000	0,407	0,411	0,419	0,412	0,006
500	0,443	0,431	0,434	0,436	0,006
250	0,463	0,465	0,467	0,465	0,002

Blanco	0,042	0,047	0,038	0,042	0,005
Control	0,471	0,471	0,441	0,461	0,017

ANEXO G8. Absorbancia del extracto metanólico de *U. baccifera*

Concentración	Absorbancia 515 nm (<i>U. baccifera</i>)			Promedio	Desviación
	1	2	3		
3000	0,135	0,143	0,14	0,139	0,004
2000	0,154	0,15	0,161	0,155	0,006
1500	0,157	0,161	0,172	0,163	0,008
1000	0,191	0,18	0,184	0,185	0,006
500	0,264	0,262	0,268	0,265	0,003
250	0,308	0,319	0,311	0,313	0,006
Blanco	0,042	0,047	0,038	0,042	0,005
Control	0,471	0,471	0,441	0,461	0,017

ANEXO H. Curvas de calibración

Figura 7 Curva de calibración para Trolox

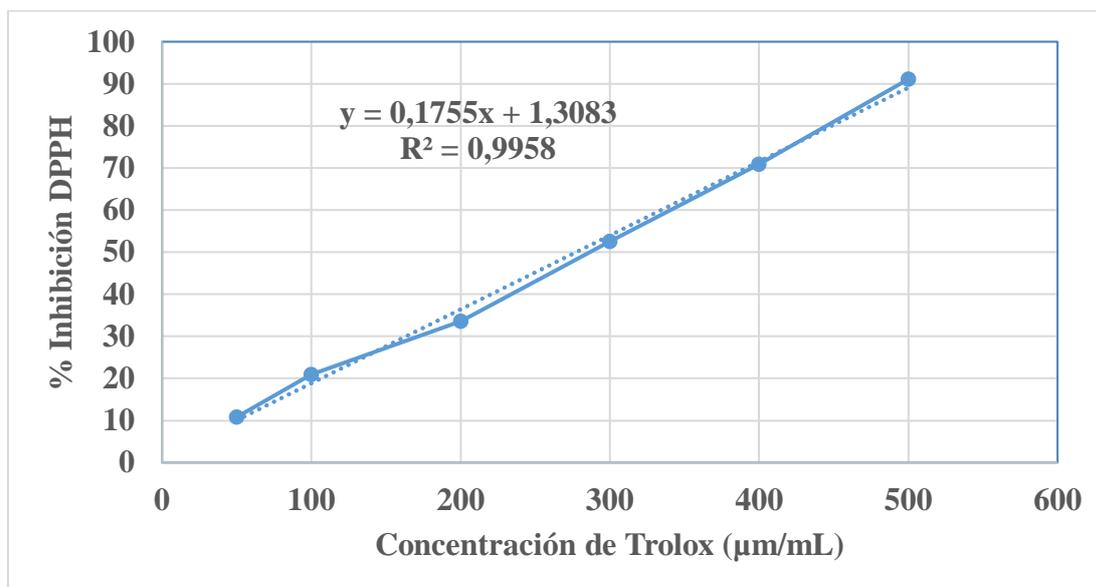
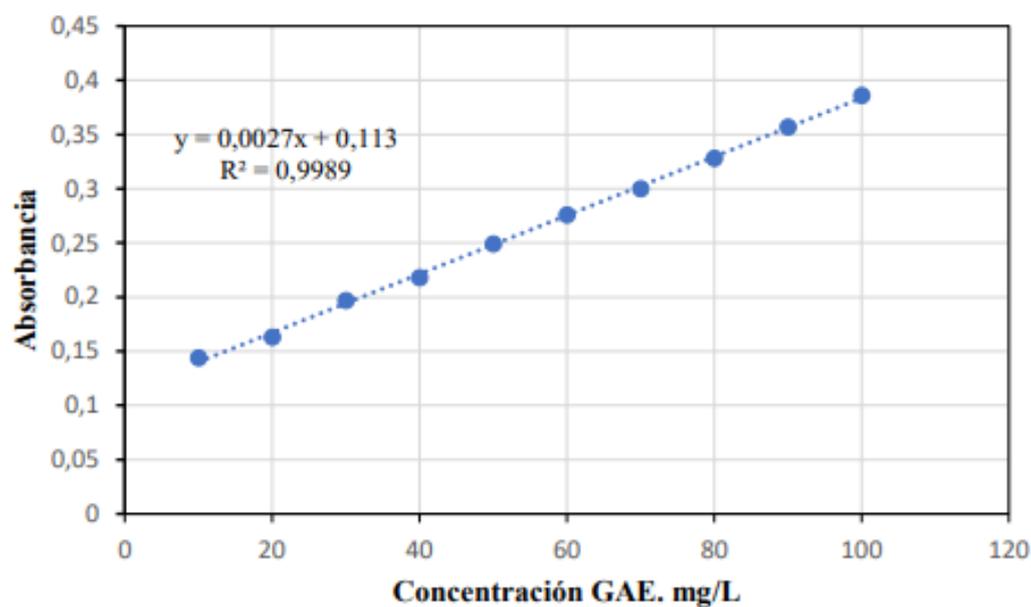


Figura 8 Curva de calibración de ácido gálico.



ANEXO I. Concentración Mínima Inhibitoria

ANEXO II. Primera fase de diluciones de los extractos hidroalcohólicos.

Bacteria	Extracto	Réplicas	CMI ($\mu\text{g/mL}$)					
			10	20	40	60	80	100
<i>E. coli</i>	<i>U. dioica</i>	1	/	+	-	-	-	-
		2	+	+	+	-	-	-
		3	+	+	+	-	-	-
	<i>U. urens</i>	1	+	+	-	-	-	-
		2	+	+	-	-	-	-
		3	+	+	-	-	-	-
	<i>U. leptophylla</i>	1	+	+	+	-	-	-
		2	+	+	+	-	-	-
		3	+	+	+	-	-	-
	<i>U. baccifera</i>	1	+	+	-	-	-	-
		2	+	-	-	-	-	-
		3	+	+	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	<i>U. dioica</i>	1	+	+	-	-	-	-
		2	+	+	+	-	-	-
		3	+	+	-	-	-	-
	<i>U. urens</i>	1	+	-	-	-	-	-

		2	+	-	-	-	-	-
		3	+	+	-	-	-	-
	<i>U. leptophylla</i>	1	+	+	-	-	-	-
		2	+	+	-	-	-	-
		3	+	+	-	-	-	-
	<i>U. baccifera</i>	1	+	-	-	-	-	-
		2	+	-	-	-	-	-
		3	+	-	-	-	-	-
		1	+	-	-	-	-	-
	<i>U. dioica</i>	2	+	-	-	-	-	-
		3	+	+	+	-	-	-
	<i>U. urens</i>	1	+	+	+	-	-	-
		2	+	+	+	-	-	-
		3	+	+	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	<i>U. leptophylla</i>	1	+	+	-	-	-	-
		2	+	+	-	-	-	-
		3	+	+	-	-	-	-
	<i>U. baccifera</i>	1	+	+	-	-	-	-
		2	+	+	-	-	-	-
		3	+	-	-	-	-	-
		1	+	+	-	-	-	-
	<i>U. dioica</i>	2	+	+	+	-	-	-
		3	+	+	-	-	-	-
	<i>U. urens</i>	1	+	+	-	-	-	-
		2	+	+	-	-	-	-
		3	+	+	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	<i>U. leptophylla</i>	1	+	+	-	-	-	-
		2	+	+	-	-	-	-
		3	+	+	+	-	-	-
	<i>U. baccifera</i>	1	+	-	-	-	-	-
		2	+	-	-	-	-	-
		3	+	-	-	-	-	-

Nota: Los signos positivos (+) muestran aquellos pocillos en los cuales hubo crecimiento microbiano y los signos negativos (-) aquellos en los que no hubo crecimiento.

ANEXO I2. Primera fase de diluciones de los extractos metanólicos, método Soxhlet.

Bacteria	Extracto	Réplicas	CMI ($\mu\text{g/mL}$)					
			10	20	40	60	80	100
<i>E. coli</i>	<i>U. dioica</i>	1	+	+	+	-	-	-
		2	+	+	+	-	-	-
		3	+	+	+	-	-	-
	<i>U. urens</i>	1	+	+	78+/-	-	-	-
		2	+	+	+	-	-	-

		3	+	+	+	-	-	-
	<i>U. leptophylla</i>	1	+	+	+	+	-	-
		2	+	+	+	+	-	-
		3	+	+	+	+	-	-
	<i>U. baccifera</i>	1	+	+	-	-	-	-
		2	+	+	-	-	-	-
		3	+	-	-	-	-	-
		1	+	+	+	-	-	-
	<i>U. dioica</i>	2	+	+	+	-	-	-
		3	+	-	-	-	-	-
	<i>U. urens</i>	1	+	-	-	-	-	-
		2	+	-	-	-	-	-
		3	+	+	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	<i>U. leptophylla</i>	1	+	+	-	-	-	-
		2	+	+	-	-	-	-
		3	+	+	-	-	-	-
	<i>U. baccifera</i>	1	+	-	-	-	-	-
		2	+	-	-	-	-	-
		3	+	-	-	-	-	-
		1	+	-	-	-	-	-
	<i>U. dioica</i>	2	+	-	-	-	-	-
		3	+	+	-	-	-	-
	<i>U. urens</i>	1	+	-	-	-	-	-
		2	+	-	-	-	-	-
		3	+	-	-	-	-	-
	<i>U. leptophylla</i>	1	+	+	-	-	-	-
		2	+	+	-	-	-	-
		3	+	+	-	-	-	-
	<i>U. baccifera</i>	1	+	+	-	-	-	-
		2	+	+	+	-	-	-
		3	+	+	-	-	-	-
		1	+	-	-	+	-	-
	<i>U. dioica</i>	2	+	-	-	-	-	-
		3	+	+	-	-	-	-
	<i>U. urens</i>	1	+	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-
		3	+	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	<i>U. leptophylla</i>	1	+	+	-	-	-	-
		2	+	-	-	-	-	-
		3	+	-	-	-	-	-
	<i>U. baccifera</i>	1	+	+	-	-	-	-
		2	+	+	+	-	-	-
		3	+	+	-	-	-	-

Nota: Los signos positivos (+) muestran aquellos pocillos en los cuales hubo crecimiento microbiano y los signos negativos (-) aquellos en los que no hubo crecimiento.

ANEXO J. Fotografías

Figura 9 *Macerado de los extractos*

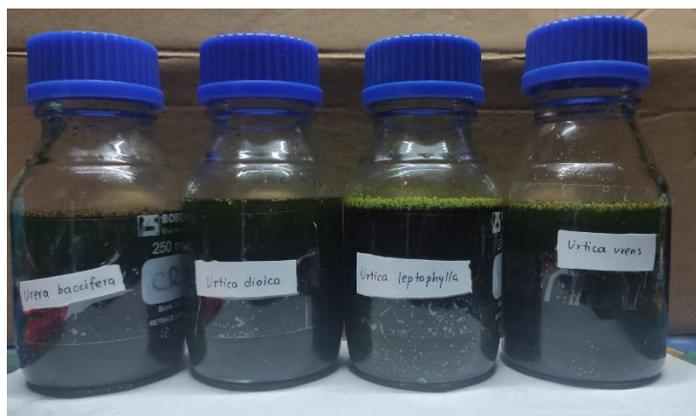


Figura 10 *Extracción Soxhlet*



Figura 11 *Extractos etanólicos*



Figura 12 *Extracto etanólico U. urens*



Figura 13 *Extracto metanólico de U. urens*

Figura 14 *Extracto metanólico de U. leptophylla*



Figura 15 Soluciones stock para actividad

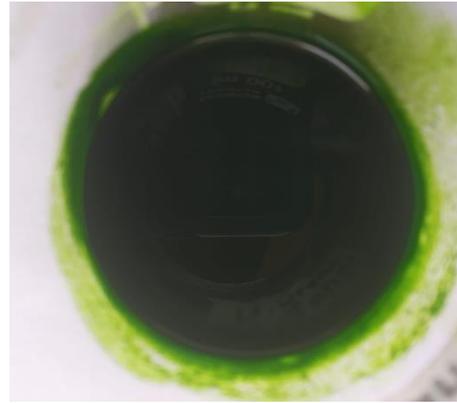
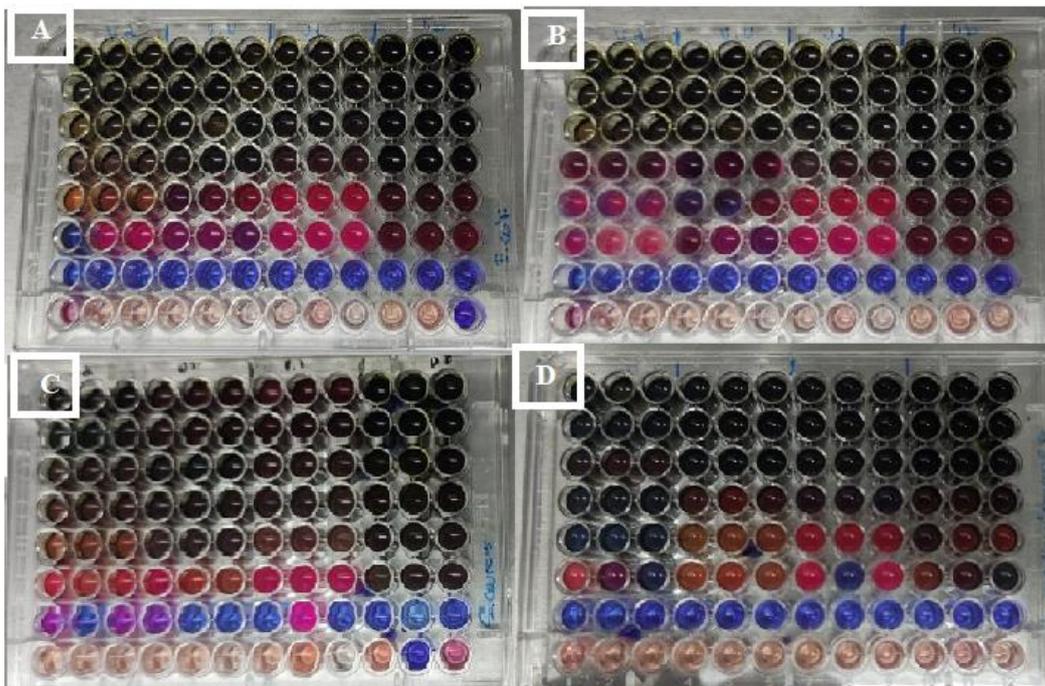


Figura 16 Diluciones para actividad
antioxidantes antimicrobiana

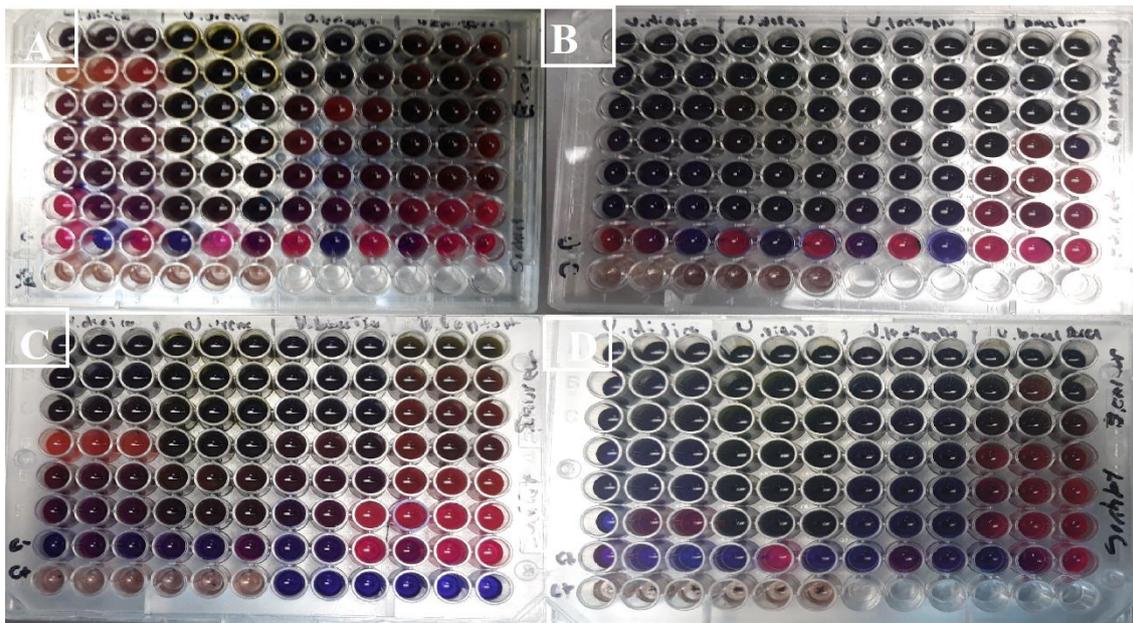


Figura 17 Primera dilución de los extractos etanólicos



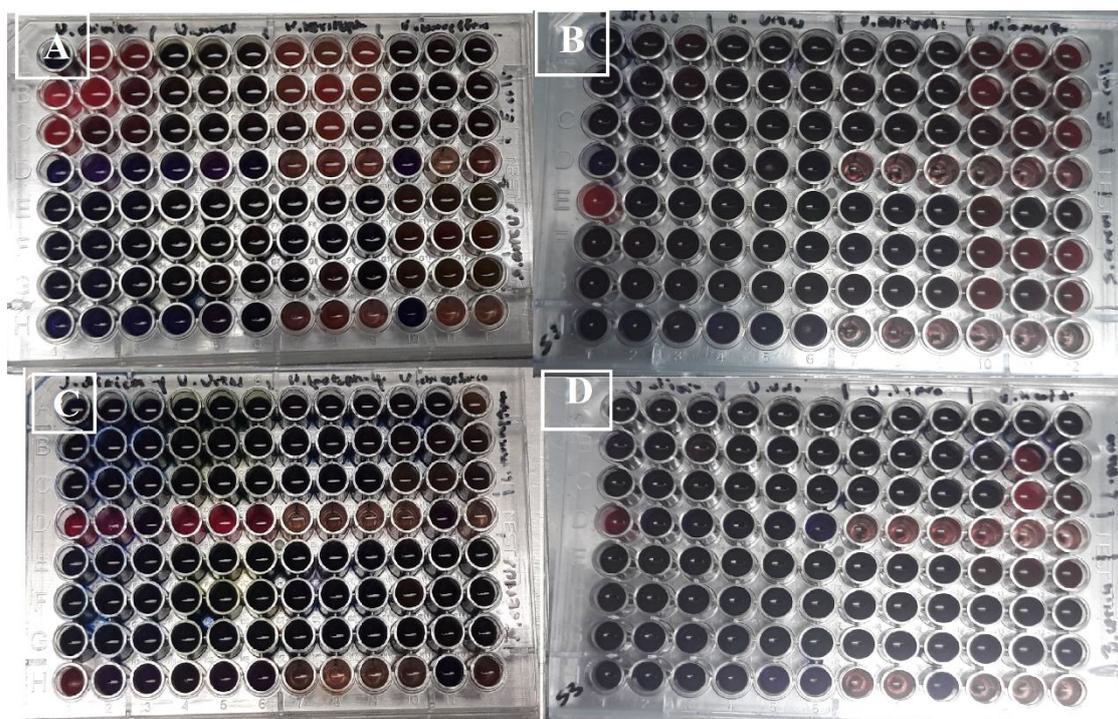
A: *E. coli*; B: *B. cereus*; C: *S. aureus*; D: *L. monocytogenes*

Figura 18 Primera dilución de los extractos metanólicos



A: *E. coli*; B: *L. monocytogenes*; C: *S. aureus*; C: *B. cereus*

Figura 19 Segunda y tercera dilución de los extractos metanólicos.



A: Segunda dilución de *E. coli* y *S. aureus*; B: Segunda dilución de *L. monocitogenes* y *B. cereus*; C: Tercera dilución de *E. coli* y *S. aureus*; D: : Tercera dilución de *L. monocitogenes* y *B. cereus*.

Figura 20 Actividad antioxidante de los extractos etanólicos

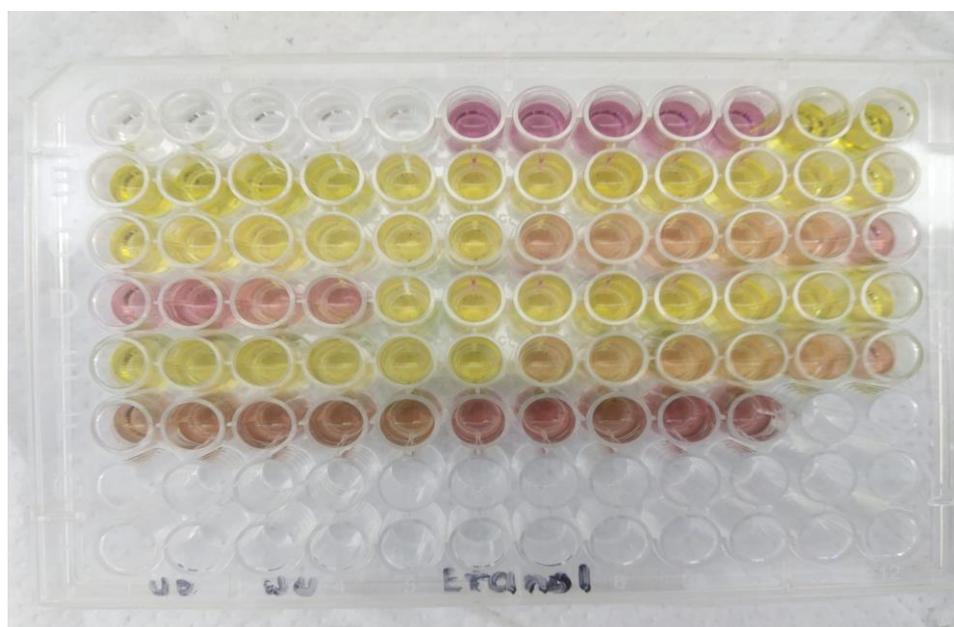


Figura 21 *Actividad antioxidante de los extractos metanólicos*

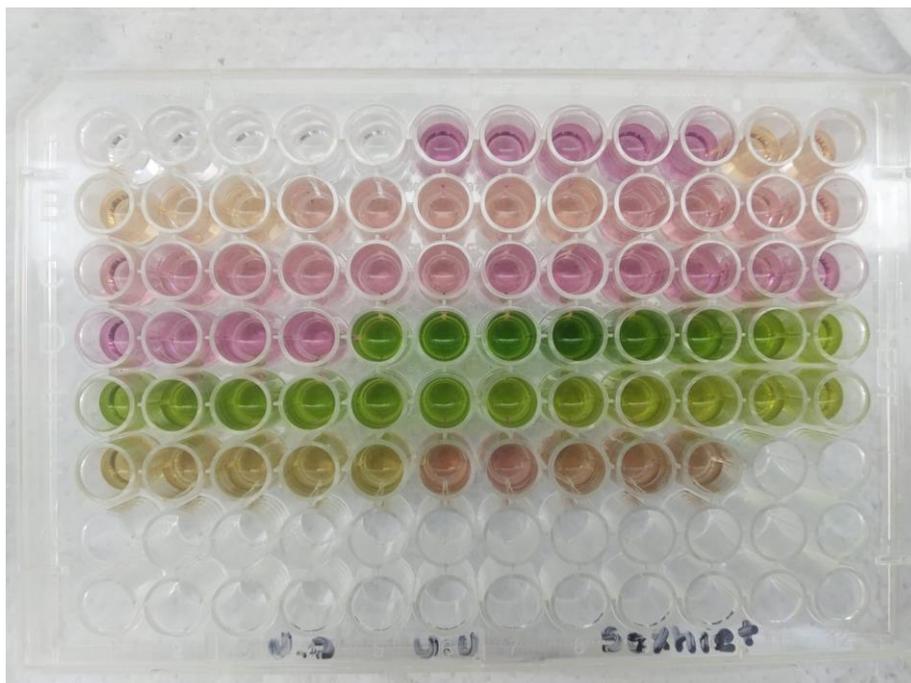


Figura 22 *Cuantificación del contenido fenólico*

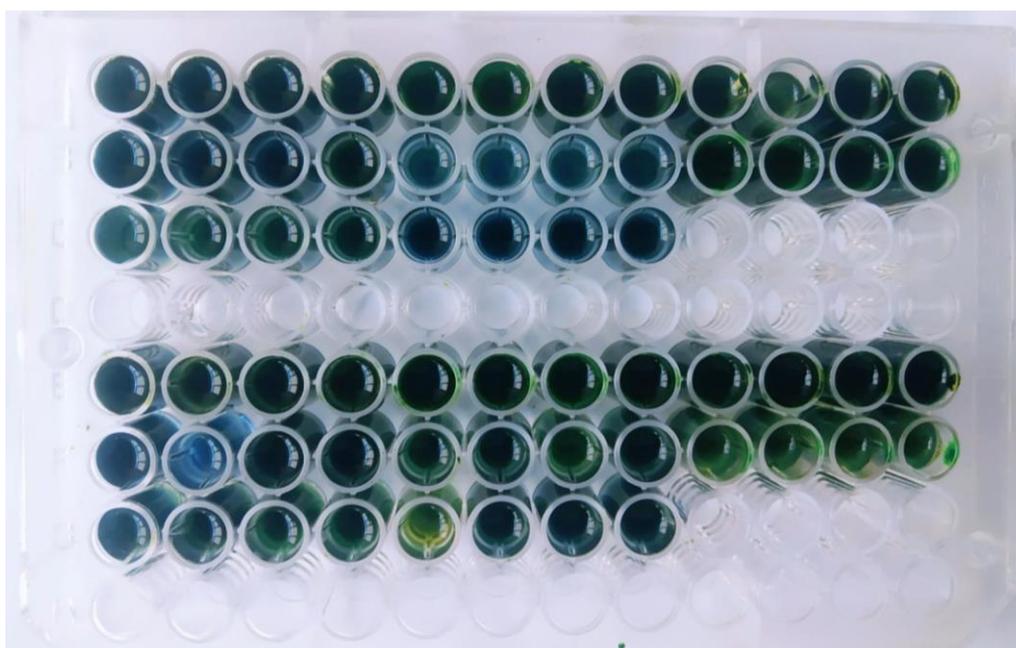
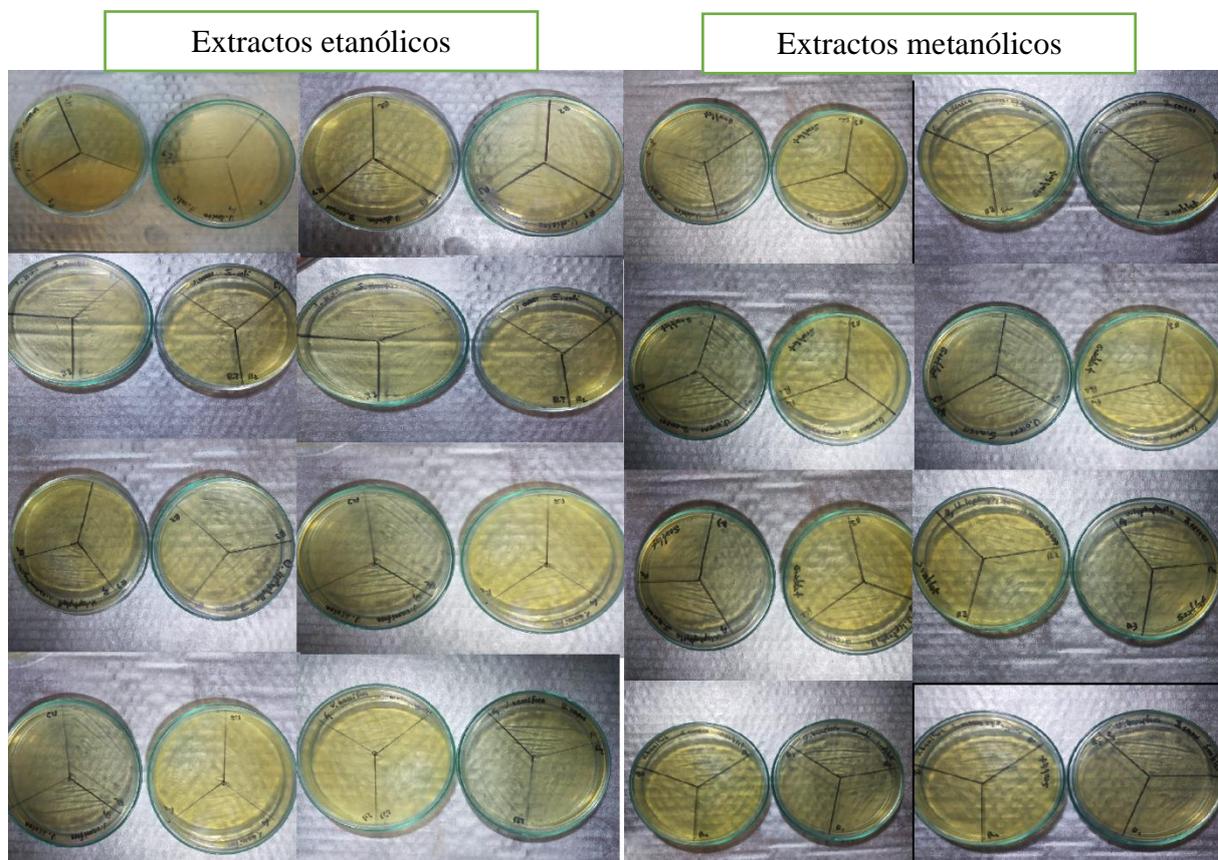


Figura 23. Concentración Mínima Bactericida de los extractos etanólicos y metanólicos



En las dos figuras la primera fila presenta la CMB de los extractos de *U. dioica*, las siguientes filas hacen referencia a *U. urens*, *U. leptophylla* y *U. baccifera*, respectivamente.