



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

**ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD TOXICOLÓGICA, ANTIOXIDANTE
Y ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS ALCOHÓLICOS DE TALLOS Y
HOJAS DE *Cynanchum microphyllum* Kunth Y *Cestrum peruvianum* Willd. ex
Roem. & Schult. EN RELACIÓN A LA MASTITIS EN GANADO VACUNO**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIEROS EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORES:

DANIELA ANAHÍ HARO LEÓN

JESUA ABRAHAM PADILLA RIVADENEIRA

TUTOR:

CECILIA ELIZABETH BARBA GUEVARA

Quito-Ecuador

2024

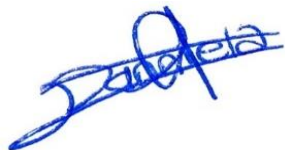
CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, Daniela Anahí Haro León con documento de identificación N° 1717912875 y Jesua Abraham Padilla Rivadeneira con documento de identificación N° 1724819386; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Quito, 06 de agosto del año 2024.

Atentamente,



Daniela Anahí Haro León
1717912875



Jesua Abraham Padilla Rivadeneira
1724819386

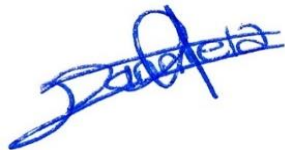
**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, Daniela Anahí Haro León con documento de identificación No. 1717912875 y Jesua Abraham Padilla Rivadeneira con documento de identificación No. 1724819386, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “Estudio *in vitro* de la actividad toxicológica, antioxidante y antibacteriana de extractos alcohólicos de tallos y hojas de *Cynanchum microphyllum* Kunth y *Cestrum peruvianum* Willd. ex Roem. & Schult. en relación a la mastitis en ganado vacuno”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniería en Biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.


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

Quito, 06 de agosto del año 2024.

Atentamente,



Daniela Anahí Haro León
1717912875



Jesua Abraham Padilla Rivadeneira
1724819386

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Cecilia Elizabeth Barba Guevara con documento de identificación N° 1707482921, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD TOXICOLÓGICA, ANTIOXIDANTE Y ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS ALCOHÓLICOS DE TALLOS Y HOJAS DE *CYNANCHUM MICROPHYLLUM* KUNTH Y *CESTRUM PERUVIANUM* WILLD. EX ROEM. & SCHULT. EN RELACIÓN A LA MASTITIS EN GANADO VACUNO, realizado por Daniela Anahí Haro León con documento de identificación N° 1717912875 y por Jesua Abraham Padilla Rivadeneira con documento de identificación N° 1724819386, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 06 de agosto del año 2024.

Atentamente,



Cecilia Elizabeth Barba Guevara

1707482921

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi amada y especial familia. A mis padres, María Elena y Oswaldo, quienes me dieron la vida y a lo largo de ella me han criado y educado con todo su amor, para ser la persona que soy hoy en día. A mi hermana, Nathalí, quien nunca soltó mi mano desde el momento en que nací, eres mi persona, mi apoyo incondicional y mi inspiración, tú me motivas y enseñas a ser valiente. A mi hermanita, Sophía, quien me ha mostrado la importancia de tener siempre ese espíritu de niña, espero ser un ejemplo a seguir para ti, tal como tú lo eres para mí. A mis abuelitas Elsa y Gladys, quienes me cuidan con sus oraciones, y a mi abuelito, Aquiles, quien me protege desde el cielo. A mi tía Sandra, quien es una segunda madre para mí. A mis primos, Gabriela y Andrés, quienes me enseñan a disfrutar de las cosas pequeñas de la vida, principalmente, de la música. A mis perritos, Leo, Nadd y Puppy, quienes me demostraron que en la vida pueden existir muchos amores verdaderos. Finalmente, quiero agradecerme a mí misma, por vencer las adversidades y probarme, una vez más, que puedo lograr todo lo que me proponga.

Daniela Anahí Haro León

Dedico este trabajo al dueño de mi vida: Dios, todo es posible gracias a tu amor inagotable; toda la Gloria y Honra sean para ti. A mis amados padres, Iván y Pahola por su amor y su apoyo incondicional durante toda mi vida, por ser ejemplo, enseñarme y educarme de la manera correcta para lograr cumplir mis metas. A mi hermana Jemima, por compartir la misma pasión por la ciencia y la vida, y brindarme su ayuda cuando lo necesité. A mi hermana Ivanna, por compartirme su alegría y su amor. A mis abuelos, Nervo y Elsa, Iván y Jeaneth, y a mi querida Enmita por su apoyo, sus oraciones y por estar siempre pendientes. Al amor de mi vida, Alejandra por ser mi compañera, brindarme su amor y su apoyo en todo momento.

Jesua Abraham Padilla Rivadeneira

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi madre, María Elena, por amarme, por estar pendiente de mí todo el tiempo y por apoyarme desde el primer día para culminar mi carrera. A mi padre, Oswaldo, por sus consejos, palabras de apoyo y por compartir conmigo sus conocimientos y sabiduría. A mi hermana, Nathalí, por ser una guía a lo largo de mi carrera y por ser una fuente de inspiración inagotable.

Agradezco a mi compañero, Jesua Padilla, por su dedicación, esfuerzo y compromiso, cualidades que se destacaron en el transcurso de toda la carrera y que brillaron aún más durante la realización de este proyecto. Gracias por permitirnos alcanzar esta gran meta, que no fue fácil, pero finalmente, lo logramos. Agradezco a mi tutora de tesis, Cecilia Barba, por su invaluable guía y apoyo a lo largo de esta investigación. Agradezco también a mis profesores Marco Cerna, Paco Noriega y Edison Osorio, por compartir con nosotros sus trabajos, comentarios y sugerencias.

Mis sinceros agradecimientos a la Dra. Jeannete Zurita y a la investigadora Gabriela Sevillano, pertenecientes a Zurita & Zurita Laboratorios, por su generosidad al proporcionarnos las cepas bacterianas necesarias para llevar a cabo esta investigación.

Por último, agradezco infinitamente a la comunidad de Paquiestancia, por su solidaridad y hospitalidad, al permitirnos recolectar las especies que utilizamos en esta investigación. Su apertura, conocimientos tradicionales y colaboración fueron fundamentales para el desarrollo del presente estudio.

Daniela Anahí Haro León

Agradezco con todo el corazón a Dios, por demostrarme todo tu amor a través de su hijo Jesús, quien es la guía de mi vida y el soporte suficiente que necesito para vivir; al Espíritu Santo por iluminar mi entendimiento y consolarme en los momentos de angustia y preocupación.

Agradezco a mis amados padres, por siempre guiarme, apoyarme y ser el sustento de todo a lo largo de mi carrera. A mis abuelos, Iván y Jeaneth por su amor y su ayuda en cualquier cosa que necesité. Al amor de mi vida, Alejandra por su valiosa compañía, consejos, apoyo incondicional.

Agradezco de todo corazón a mi compañera, Daniela Haro, por su noble amistad, grandioso trabajo, esfuerzo y compromiso durante el desarrollo del proyecto. Agradezco a mi tutora la Dra. Cecilia Barba, quien junto al docente Marco Cerna PhD y al grupo de investigación Nunkui Wakan, abrieron las puertas para que podamos participar de este apasionante proyecto. Así también, agradezco a los docentes Paco Noriega y Edison Osorio, por brindarnos sus valiosos conocimientos y compartir con nosotros sus investigaciones.

Jesua Abraham Padilla Rivadeneira

RESUMEN

La mastitis bovina es una enfermedad principalmente causada por bacterias, que inflama las ubres de las vacas y afecta negativamente la salud de los individuos y la correcta producción de leche. Paquiestancia es una comunidad ubicada en la parroquia Ayora, en el cantón Cayambe, donde la principal fuente de ingresos es la actividad ganadera, sin embargo, existe una notable prevalencia de mastitis. Los habitantes han aplicado sus conocimientos tradicionales de especies vegetales como *Cynanchum microphyllum* (lechango) y *Cestrum peruvianum* (sauco), utilizadas como medio de prevención para esta enfermedad. La presente investigación planteó como objetivo evaluar el efecto toxicológico, antioxidante y antibacteriano de extractos alcohólicos de tallos y hojas de las dos especies, con el fin de conocer el aporte fitoquímico y la factibilidad de uso frente a la mastitis en ganado vacuno. Las plantas también se analizaron morfológicamente y fueron procesadas de forma molecular para identificar su homología con otras especies mediante la herramienta BLAST. Además, se realizó el tamizaje fitoquímico de los extractos para relacionar sus compuestos con las propiedades terapéuticas hacia la mastitis. En el tamizaje fitoquímico se identificó que el extracto de tallos de sauco contiene alcaloides, flavonoides, triterpenos y esteroides; el extracto de hojas de sauco presenta, adicionalmente, saponinas y catequinas; y el extracto de lechango tiene alcaloides, fenoles y taninos, triterpenos y esteroides, y catequinas. Con respecto a la actividad toxicológica se evidenció que el extracto de hojas es ligeramente tóxico (794,33 ppm), el extracto de tallos es prácticamente no tóxico (1.202,26 ppm), y el extracto de lechango se encuentra entre prácticamente no tóxico a ligeramente tóxico (1.000 ppm). En la actividad antioxidante se obtuvo que el extracto de lechango presentó un mayor potencial antioxidante (IC_{50} 1,799 mg/mL) respecto a los otros dos. Finalmente, todos los extractos presentaron una acción antibacteriana activa (2+), en concentraciones del 30 y

15% frente a *Streptococcus agalactiae*, una de las principales bacterias que causan la mastitis bovina. Con estos resultados se demostró que ambas especies son efectivas frente a la mastitis y presentan un gran potencial para su uso en medicamentos veterinarios dirigidos al tratamiento de la mastitis bovina.

Palabras clave: Mastitis, extractos vegetales, antioxidante, antibacteriano, toxicidad.

ABSTRACT

Bovine mastitis is a disease mainly caused by bacteria, which inflames the udders of cows and negatively affects the health of individuals and proper milk production. In Paquiestancia, a community located in the Ayora parish, in the Cayambe canton, the main source of income is cattle raising; however, there is a notable prevalence of mastitis. Faced with this, the inhabitants have applied their traditional knowledge of the species *Cynanchum microphyllum* (lechango) and *Cestrum peruvianum* (sauco) as part of the treatment for this disease. Therefore, the general objective of this research was to evaluate the toxicological, antioxidant and antibacterial effect of alcoholic extracts of stems and leaves of the two species mentioned, to demonstrate their effectiveness against mastitis in cattle. The plants were also morphologically analyzed and molecularly processed to identify their homology with other species using the BLAST tool; and, in addition, phytochemical screening of the extracts was performed to relate their compounds with their therapeutic properties against mastitis. Phytochemical screening identified that the extract of sauco stems contains alkaloids, flavonoids, triterpenes and steroids; the extract of sauco leaves additionally presents saponins and catechins; and the extract of lechango has alkaloids, phenols and tannins, triterpenes and steroids, and catechins. With respect to toxicological activity, it was found that the leaf extract is slightly toxic (794.33 ppm), the stem extract is practically non-toxic (1,202.26 ppm), and the lechango extract is between practically non-toxic to slightly toxic (1,000 ppm). In the antioxidant activity, lechango extract showed a higher antioxidant potential (IC₅₀ 1.799 mg/mL) than the other two extracts. Finally, all the extracts showed an active antibacterial action (2+), at concentrations of 30 and 15% against *Streptococcus agalactiae*, one of the main bacteria causing bovine mastitis. With these results, it was demonstrated that both species are

effective against mastitis and present a great potential for use in veterinary drugs for the treatment of bovine mastitis.

Keywords: Mastitis, plant extracts, antioxidant, antibacterial, toxicity.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	5
2.1. Mastitis bovina	5
2.1.1. Definición.....	5
2.1.2. Etiología	5
2.1.3. Consecuencias en la salud del ganado.....	6
2.1.4. Tratamientos.....	6
2.1.5. Impacto en el sector ganadero	7
2.2. Área de estudio.....	8
2.2.1. Paquiestancia.....	8
2.2.2. Farmacognosia y etnoveterinaria	9
2.3. Descripción de especies empleadas en el tratamiento de la mastitis.....	11
2.3.1. <i>Cynanchum microphyllum</i>	11
2.3.2. <i>Cestrum peruvianum</i>	12
2.4. Estudio farmacognóstico de especies vegetales	12
2.4.1. Recolección	13
2.4.2. Carpeta botánica	13
2.4.3. Morfología.....	13
2.4.4. Método de extracción	14
2.4.5. Control de calidad	15
2.4.5.1. Porcentaje de humedad.....	15
2.4.5.2. Índice de refracción.....	15
2.4.5.3. pH.....	16
2.4.5.4. Densidad.....	16
2.4.5.5. Sólidos totales	16
2.5. Análisis fitoquímico	16
2.5.1. Tamizaje fitoquímico	17
2.6. Análisis molecular.....	17
2.6.1. Protocolo de extracción y cuantificación de ADN.....	17
2.6.2. Amplificación y marcadores moleculares	19
2.6.3. Secuenciación.....	20
2.6.4. BLAST	20
2.7. Actividad toxicológica	20
2.7.1. <i>Artemia salina</i>	21

2.7.2.	Cálculo de la concentración letal media (CL ₅₀)	21
2.8.	Actividad antioxidante	22
2.8.1.	Método DPPH	22
2.8.2.	Cálculo de la concentración inhibitoria (IC ₅₀)	23
2.9.	Actividad antibacteriana.....	23
2.9.1.	Antibiograma por el método de difusión en agar	23
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1.	Recolección de muestras vegetales	25
3.1.1.	Carpeta botánica y autenticación	25
3.1.2.	Morfología.....	26
3.2.	Procesamiento de muestras vegetales	26
3.2.1.	Preparación del material vegetal para molienda	26
3.2.2.	Desinfección.....	27
3.2.3.	Secado	27
3.2.4.	Molienda.....	27
3.2.5.	Tamaño de partículas del material molido	27
3.2.6.	Porcentaje de humedad del material seco	28
3.3.	Elaboración de extractos	28
3.3.1.	Maceración	28
3.4.	Control de calidad de extractos	28
3.4.1.	Índice de refracción.....	28
3.4.2.	pH.....	29
3.4.3.	Densidad.....	29
3.4.4.	Sólidos totales	29
3.5.	Tamizaje fitoquímico	30
3.5.1.	Alcaloides.....	30
3.5.2.	Saponinas	30
3.5.3.	Flavonoides	31
3.5.4.	Fenoles y Taninos.....	31
3.5.5.	Resinas	31
3.5.6.	Quinonas.....	31
3.5.7.	Triterpenos y Esteroides.....	32
3.5.8.	Catequinas	32
3.5.9.	Cumarinas y lactonas	33
3.5.10.	Heterósidos cardiotónicos	33

3.6.	Análisis molecular	33
3.6.1.	Protocolo de extracción y cuantificación de ADN.....	33
3.6.2.	Amplificación de ADN	34
3.6.3.	Secuenciación.....	34
3.6.4.	BLAST	35
3.7.	Actividad toxicológica	35
3.7.1.	Obtención de <i>Artemia salina</i>	35
3.7.2.	Preparación de agua salina	35
3.7.3.	Desinfección.....	36
3.7.4.	Incubación de huevos	36
3.7.5.	Preparación de extractos y controles	36
3.7.6.	Ensayo de toxicidad	36
3.7.7.	Determinación de capacidad toxicológica.....	37
3.8.	Actividad antioxidante	37
3.8.1.	Método DPPH	38
3.8.1.1.	Preparación de soluciones	38
3.8.1.2.	Análisis en microplacas.....	38
3.8.1.3.	Determinación de la capacidad antioxidante.....	38
3.9.	Actividad antibacteriana.....	39
3.9.1.	Antibiograma por el método de difusión en agar	39
3.9.1.1.	Preparación de diluciones.....	39
3.9.1.2.	Preparación del inóculo bacteriano	39
3.9.1.3.	Preparación del estándar de turbidez McFarland	40
3.9.1.4.	Antibiograma.....	40
3.9.1.5.	Medición de halos de inhibición	40
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
4.1.	Recolección de muestras vegetales	41
4.1.1.	Carpeta botánica y autenticación	41
4.2.	Morfología.....	41
4.3.	Control de calidad del material vegetal molido y los extractos	43
4.4.	Tamizaje fitoquímico	45
4.5.	Análisis molecular	48
4.6.	Actividad toxicológica	49
4.7.	Actividad antioxidante	52
4.8.	Actividad antibacteriana.....	54

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	58
6. BIBLIOGRAFÍA.....	60
7. ANEXOS.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comunidad de Paquiestancia	9
Figura 2. Desarrollo de <i>Artemia Salina</i>	21
Figura 3. Cambio de color del DPPH.....	23
Figura 4. Esquema del método de difusión en agar	24
Figura 5. Comparación de resultados de CL50 de la actividad toxicológica.....	50
Figura 6. Comparación de resultados de IC ₅₀ de la actividad antioxidante	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Prevalencia de la mastitis en distintas provincias del Ecuador	8
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Cynanchum microphyllum</i>	11
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>Cestrum peruvianum</i>	12
Tabla 4. Nivel de toxicidad de acuerdo a la CL50	37
Tabla 5. Grados y rangos de inhibición para extractos	40
Tabla 6. Características macromorfológicas del sauco y lechango	41
Tabla 7. Resultados del control de calidad de muestras molidas y de sus extractos	44
Tabla 8. Resultados del Tamizaje Fitoquímico de los extractos	46
Tabla 9. Resultados de la herramienta BLAST para Sauco y Lechango	48
Tabla 10. Resultados de la CL ₅₀ de la actividad toxicológica.....	50
Tabla 11. Resultados de la IC ₅₀ de la actividad antioxidante	53
Tabla 12. Resultados de la actividad antibacteriana en bacterias Gram Positivas	55
Tabla 13. Resultados de la actividad antibacteriana en bacterias Gram Negativas	55

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Fórmula de la densidad.....	29
Ecuación 2. Fórmula de sólidos totales	30
Ecuación 3. Fórmula del porcentaje de inhibición	39

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Tabla de metabolitos vegetales de interés farmacológico	77
Anexo 2. Recolección de especies (<i>Cynanchum microphyllum</i>)	79
Anexo 3. Prensado de especies vegetales.....	80
Anexo 4. Filtrado al vacío del extracto macerado.....	81
Anexo 5. Diagrama de flujo del protocolo de extracción de ADN	82
Anexo 6. Equipo NanoDrop 2000 para cuantificación de ADN.....	83
Anexo 7. Composición de la mezcla para PCR conforme al protocolo de <i>Thermo Scientific</i>	84
Anexo 8. Carga de productos PCR para electroforesis horizontal	85
Anexo 9. Electroforesis horizontal de <i>matK</i> para Sauco y Lechango	86
Anexo 10. Huevos de <i>Artemia salina</i> de la marca <i>Agripac S.A.</i>	87
Anexo 11. Incubación de <i>Artemia salina</i> en pecera.....	88
Anexo 12. Diluciones de extractos y controles	89
Anexo 13. Nauplio de <i>Artemia salina</i> observado bajo el estereoscopio	90
Anexo 14. Diagrama de flujo del análisis estadístico de la actividad toxicológica en Excel	91
Anexo 15. Tabla para conversión de porcentaje de mortalidad a Probit.....	92
Anexo 16. Solución DPPH en balón de aforo de 100 mL.....	93
Anexo 17. Esquema del ensayo DPPH en microplaca.....	94
Anexo 18. Diagrama de flujo del análisis estadístico de la actividad antioxidante en Excel	95
Anexo 19. Esquema del proceso de preparación de diluciones	96
Anexo 20. Diagrama de la elaboración del antibiograma en medio Müller-Hinton	97
Anexo 21. Esquema del Antibiograma en la caja Petri.....	98
Anexo 22. Carpetas botánicas de (A) Sauco y (B) Lechango	99
Anexo 23. Macromorfología de <i>Cestrum peruvianum</i>	101
Anexo 24. Macromorfología de <i>Cynanchum microphyllum</i>	102
Anexo 25. Resultados del Tamizaje fitoquímico de cada extracto	103
Anexo 26. Datos obtenidos del ensayo de toxicidad para calcular la CL50	106
Anexo 27. Gráfica Probit VS Log(Concentración) de hojas de Sauco	107
Anexo 28. Gráfica Probit VS Log(Concentración) de tallos de Sauco	108
Anexo 29. Gráfica Probit VS Log(Concentración) de planta completa de lechango	109
Anexo 30. Datos obtenidos del ensayo antioxidante para calcular la IC50	110
Anexo 31. Gráfica % Inhibición VS Log(Concentración) de hojas de Sauco	111
Anexo 32. Gráfica % Inhibición VS Log(Concentración) de tallos de Sauco	112
Anexo 33. Gráfica % Inhibición VS Log(Concentración) de planta completa de lechango	113
Anexo 34. Gráfica % Inhibición VS Log(Concentración) de ácido ascórbico	114

Anexo 35. Resultados de la actividad antioxidante de los extractos y del ácido ascórbico en microplacas.....	115
Anexo 36. Resultados de antibiogramas de bacterias Gram positivas	116
Anexo 37. Resultados de antibiogramas de bacterias Gram negativas	117

1. INTRODUCCIÓN

Ecuador presenta una inmensa variedad de flora y fauna, por lo que ha sido catalogado como uno de los 17 países megadiversos del mundo (Aguirre et al., 2017). Hablando específicamente de la flora, de la Torre et al. (2008), publicaron un exhaustivo trabajo etnobotánico donde se investigó un total de 5.172 especies de plantas en las regiones Costa, Sierra y Amazonía; dichas especies fueron agrupadas dentro de categorías según el uso que les han dado las distintas etnias ecuatorianas, por ejemplo, medicinal, alimenticio, social, combustible, tóxico etc.

La Etnobotánica surge como una disciplina que fusiona las ciencias naturales y sociales (Sánchez & Torres, 2020), y es gracias a ella, que en la investigación realizada por de la Torre et al (2008), se puede evidenciar la abundancia de plantas que hay en el país y su estrecha relación con las comunidades. Dentro de la Etnobotánica se encuentra la etnoveterinaria, un término que se refiere a la aplicación de los conocimientos tradicionales en la salud animal y tiene como objetivo mantener su bienestar y un buen desempeño para su producción. Es así, que las comunidades campesinas adoptan estas técnicas para prevenir, manejar y remediar enfermedades como en el ganado bovino, pues su economía depende de la venta de sus productos (Shoaib et al., 2021).

Gran parte de los conocimientos ancestrales etnobotánicos están vinculados a la Región Interandina, donde los habitantes transmiten sus conocimientos sobre el uso tradicional de las plantas (Fernández et al., 2019). Un ejemplo es Paquiestancia, una comunidad rural ubicada en la parroquia Ayora, cantón Cayambe, en la provincia de Pichincha, cuyo principal ingreso son las actividades agropecuarias, destacándose la ganadería. Según Torres (2018), la economía de Cayambe se encuentra ligada a la

industria láctea, existiendo alrededor de 55 empresas que elaboran productos derivados de esta. Además, se estima que hay 5.450 pequeños ganaderos que generan cerca de 425.000 litros de leche cada día. Sin embargo, en Paquiestancia existe un problema notable, que es la prevalencia de la mastitis bovina, misma que afecta gravemente la correcta producción de la leche al disminuir su calidad y aumentar los gastos en tratamientos (Bonifaz & Conlago, 2016).

La mastitis bovina es una enfermedad que inflama las glándulas de las ubres debido a lesiones físicas, alergias e infecciones por microorganismos, principalmente bacterias (Avellán et al., 2019). Ramírez (2018), menciona que, las bacterias patógenas características de esta enfermedad son *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Estos microorganismos invaden desde el interior hacia el exterior de la ubre mediante el conducto de la glándula mamaria, causando una inflamación; a partir de ello, puede presentarse atrofia, edemas inflamatorios o la pérdida total de la ubre. Algunos de los síntomas que manifiestan las vacas son molestias, gran dolor y estrés, impactando directamente en la industrialización, calidad y condición de la leche (González & Vidal del Río, 2021).

A nivel mundial, la mastitis afecta a alrededor de un tercio de las vacas lecheras y se considera una de las enfermedades más costosas de la industria láctea (Jiménez et al., 2020; Ormaza et al., 2022). En Ecuador, la mastitis ha provocado una pérdida financiera significativa en el sector ganadero, siendo Pichincha e Imbabura aquellas con una prevalencia de la enfermedad preocupante, que es del 74,4%. Tales cifras se deben a que los cantones Cayambe y Pedro Moncayo, pertenecientes a esta provincia, presentan una

mayor producción de leche y, como consecuencia, tienen problemas recurrentes de mastitis (Ballesteros & Valdivieso, 2018; Quispe et al., 2020).

En los tratamientos cotidianos para la mastitis se incluyen los antibióticos o antimicrobianos, que controlan el desarrollo de los patógenos, pero su manejo incorrecto, su uso excesivo en el tiempo y la falta de desarrollo de nuevos fármacos, han provocado la resistencia de los patógenos, generando bajas tasas de curación (Jiménez et al., 2020). Como alternativa a estos tratamientos, se ha planteado el uso de plantas medicinales, ya que estas contienen varios fitoconstituyentes (terpenoides, taninos, flavonoides, etc.) derivados del metabolismo secundario, que les otorgan distintas características (color, sabor, olor y defensa) y les permiten desempeñar funciones biológicas debido a sus propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes y/o anticancerígenas (Batiha et al., 2020). En este contexto, las plantas forman un pilar fundamental para reemplazar a los antimicrobianos en el tratamiento de la mastitis bovina, garantizando el correcto rendimiento de la leche y ayudando a disminuir los impactos negativos de la enfermedad (Mushtaq et al., 2018).

Collaguazo & Márquez (2022), en su trabajo de investigación, identificaron cuatro especies vegetales utilizadas en Paquiestancia como tratamiento etnoveterinario para la mastitis, determinando sus propiedades farmacognósticas y fitoquímicas. Una de ellas fue *Cynanchum microphyllum*, que pertenece a las apocináceas, una familia con especies caracterizadas por poseer varias propiedades farmacológicas, como la antibacteriana, debido a la presencia de esteroides, alcaloides, triterpenos y pentacíclicos (Machado et al., 2022). Por otro lado, se encuentra *Cestrum peruvianum*, de esta especie se encontró información del género, del cual se ha evidenciado el contenido de taninos, alcaloides,

saponinas y catequinas, asimismo, estos compuestos tienen actividades antibacterianas, antioxidantes y antiinflamatorias (Ciangherotti et al., 2004; Corzo, 2012).

Con los antecedentes mencionados y tomando en cuenta la problemática que implica la mastitis en el manejo del ganado vacuno en la comunidad de Paquiestancia, el presente trabajo de investigación busca brindar a su población un soporte científico al conocimiento ancestral, orientado al manejo de especies con potencial medicinal, como son *Cynanchum microphyllum* y *Cestrum peruvianum*. Además, se marcará un precedente para que a futuro estas plantas medicinales se utilicen en formulaciones de medicamentos veterinarios.

Por consiguiente, se ha planteado como objetivo general evaluar el efecto toxicológico, antioxidante y antibacteriano de extractos alcohólicos de tallos y hojas de *Cynanchum microphyllum* y *Cestrum peruvianum*, para demostrar su efectividad frente a la mastitis en ganado vacuno. Para ello, se recolectaron las especies vegetales en la comunidad de Paquiestancia, parroquia Ayora, del cantón Cayambe y se realizó el tamizaje fitoquímico de los extractos. Adicionalmente, las plantas se analizaron morfológicamente y fueron procesadas de forma molecular para identificar su homología con otras especies mediante la herramienta bioinformática BLAST.

En base al objetivo propuesto se establece como hipótesis que los extractos alcohólicos de tallos y hojas de *Cynanchum microphyllum* y *Cestrum peruvianum*, recolectadas en la comunidad de Paquiestancia, poseen propiedades antibacterianas, antioxidantes y toxicológicas, lo que sugiere su potencial efectividad para ser consideradas para la prevención de la mastitis en ganado vacuno.

2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1. Mastitis bovina

2.1.1. Definición

El término “*mastitis*” proviene del griego “masto”, que significa pecho o pezón e “*itis*”, que significa inflamación, por lo que, la mastitis se define como la enfermedad que produce una reacción inflamatoria en las glándulas mamarias de las vacas (Kumar et al., 2020).

2.1.2. Etiología

Normalmente, la mastitis es causada por distintas especies de bacterias, tanto grampositivas como gramnegativas. Estas se clasifican según su origen, en contagiosas y ambientales (Wang et al., 2021). El primer grupo corresponde a aquellas bacterias que tienden a vivir en la piel de la ubre, donde colonizan y se desarrollan hasta el canal del pezón, en este caso, la transmisión de la enfermedad se puede dar durante el ordeño de vacas infectadas a vacas no infectadas. Por otro lado, las bacterias ambientales se encuentran en el medio ambiente, principalmente en la materia fecal y suelen ser patógenos oportunistas, que actúan cuando el huésped está inmunodeprimido (Zigo et al., 2021; Cheng & Han, 2020).

Algunas bacterias identificadas como contagiosas son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Mycoplasma spp.*, mientras que, dentro de las bacterias ambientales se encuentran *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus uberis* y *Pseudomonas spp.* (Cheng & Han, 2020)

2.1.3. Consecuencias en la salud del ganado

De acuerdo con Kumar et al. (2020), la mastitis puede catalogarse como: a) subclínica, b) clínica y c) crónica. La mastitis subclínica es una afección asintomática y no se exhibe una inflamación notoria en las ubres, sin embargo, la leche puede verse alterada y presentar un incremento en el conteo de las células somáticas (Zhang et al., 2022).

La mastitis clínica es más severa que la subclínica, durante esta las ubres presentan secreciones, inflamación leve y rojez, la leche luce acuosa y con coágulos, y las vacas tienen síntomas como fiebre, pérdida del apetito y debilidad (Zhang et al., 2022).

Finalmente, la mastitis crónica dura meses, aquí la inflamación de las glándulas mamarias es persistente, pero ocurre en intervalos de tiempo discontinuos; la leche puede contener sangre y pus, y las vacas presentan síntomas adicionales como shock y anorexia (Kumar et al., 2020; Cheng & Han, 2020).

2.1.4. Tratamientos

Según (Sharun et al., 2021), el tratamiento de la mastitis depende de algunas variables como: tratamiento antimicrobiano, identificación del patógeno causante, parto, etapa de lactancia e historial previo de mastitis u otras enfermedades. En general, durante la terapia se utilizan antibióticos con glucocorticoides que restauran la impermeabilidad de la barrera sangre-leche, mejorando la calidad de la leche (Cobirka et al., 2020). Sin embargo, un problema actual es la resistencia de las bacterias a los antibióticos debido a su uso incorrecto y prolongado, y a la escasez de nuevos fármacos efectivos, lo que ocasiona bajas tasas de curación (Jiménez et al., 2020).

Por esta razón, es importante controlar desde un inicio el esparcimiento de la enfermedad, para ello, resulta fundamental la detección temprana, el uso de pruebas sensibles para la detección, la aplicación de prácticas que disminuyan el contagio y la prevención de la infección entre vacas (Sharun et al., 2021).

Otros métodos terapéuticos incluyen: inmunoterapia, bacteriocinas, bacteriófagos, péptidos antimicrobianos, probióticos, selección genética, terapia herbaria, terapia con células madre, terapia nutricional y terapia basada en tecnología de nanopartículas (Sharun et al., 2021).

2.1.5. Impacto en el sector ganadero

A nivel mundial, la mastitis bovina es la enfermedad más común dentro de la industria ganadera, generando grandes pérdidas económicas al reducir la composición y calidad de la leche (Cheng & Han, 2020). Hogeveen et al. (2019), mencionan que el costo por el fracaso en el tratamiento de la mastitis es de aproximadamente 147 dólares por vaca al año. Además, Sharun et al. (2021), afirma que la mastitis subclínica provoca entre el 60 al 70% de las pérdidas económicas totales respecto a los otros tipos de mastitis.

La industria láctea en Ecuador representa un pilar importante en cuanto a la generación de empleo y la economía en el sector agrícola (González & Vidal del Río, 2021). Según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (2023a), en la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC), tan solo en un día se generan 5.5 millones de litros de leche en el país, con un promedio de 6,8 litros por vaca. Además, hasta el 2022, la Sierra fue la principal región productora de leche, con 4.4 millones de litros, lo que equivale al 79,5% de la producción total (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 2023b).

No obstante, la mastitis implica un gran problema para los ganaderos del país, ya que, de acuerdo con distintos estudios realizados en varias provincias del Ecuador, la prevalencia de la enfermedad es bastante preocupante (**Tabla 1.**).

Tabla 1. Prevalencia de la mastitis en distintas provincias del Ecuador

Provincia	Cantón	Prevalencia	Autores
Imbabura	Otavalo	74,41%	(Gómez, 2015)
Pichincha	Cayambe y Quito		
Loja	Gonzanamá	68,4%	(Figueroa, 2016)
Pichincha	Cayambe	66%	(Bonifaz & Conlago, 2016)
Cañar	Biblán	56,5%	(Cuenca et al., 2021)
Chimborazo	Penipe	48,33%	(Chávez, 2022)
Los Ríos	Babahoyo	44,94%	(E. Mora, 2023)
Pichincha	Pedro Vicente Maldonado y Quito	40%	(Jiménez, 2022)
Manabí	Rocafuerte	38,57%	(Avellán et al., 2019)
Bolívar	Guaranda	35,9%	(Balarezo & Poveda, 2018)
Carchi	Montúfar	35,71%	(Ormaza et al., 2022)
Pichincha	Cayambe	22,22%	(Farinango, 2015)
Azuay	Cuenca	15,38%	(Avilés & Medina, 2022)

Elaborado por: (Los autores, 2024)

2.2. Área de estudio

2.2.1. Paquiestancia

Paquiestancia es una comunidad indígena que se encuentra localizada en la Parroquia Ayora, perteneciente al cantón Cayambe, Provincia de Pichincha, en Ecuador (**Figura 1.**). Se conforma por una superficie de alrededor de 450 hectáreas, ubicadas en las faldas del volcán Cayambe, limitando con el parque Nacional Cayambe. Posee ecosistemas con bosques muy húmedos montanos y pluviales subalpinos, donde prevalecen climas fríos con temperaturas promedio de 15 a 17°C, y temperaturas extremas de entre 5 a 22°C (Sinchiguano, 2017).



En los páramos se evidencia la presencia de flora representativa como las gramíneas, mientras que, en la parte baja, se encuentran especies como arrayán, frailejón, pumamaqui, chuquiragua, entre otras; muchas de estas plantas han sido consideradas de importancia medicinal. Por otro lado, con relación a la fauna, Paquiestancia posee especies destacadas como oso de anteojos, lobo de páramo, cuy de monte, conejo, zorro, gavián, perdiz, etc. (Sinchiguano, 2017).

La comunidad fue fundada hace más de 55 años, debido al compromiso de comuneros del Pueblo Kichwa Kayambi, que decidieron hacerse responsables del buen estado y mantenimiento de sus tierras. Es importante mencionar que Paquiestancia cuenta con alrededor de 1.200 personas, conformadas en 180 familias aproximadamente, quienes se dedican, en su mayoría, a las actividades económicas características del territorio, destacándose la actividad agropecuaria, debido a las condiciones favorables del suelo, del clima y a la disposición de agua. Otras actividades destacables están relacionadas al turismo, a la artesanía y a la carpintería (Sinchiguano, 2017; Taco & Valdiviezo, 2019).

2.2.2. Farmacognosia y etnoveterinaria

El término “farmacognosia” proviene del griego “*pharmakon*” que quiere decir remedio y “*gnosis*” que significa conocimiento. Etimológicamente, esta palabra hace alusión al “conocimiento de los fármacos” (González, 2008). En este sentido, se entiende a la farmacognosia como una ciencia que se encarga del estudio de aquellos principios activos de origen natural que generan un potencial terapéutico de aplicación industrial (Cortez et al., 2004).

La etnoveterinaria, o más conocida como Medicina Etnoveterinaria (MEV), se define como el estudio de los conocimientos en prácticas, sistemas y estructuras culturales y sociales de creencias locales, respecto al modo de producción animal, con el objetivo de aplicar mejoras a los proyectos de desarrollo agropecuario para garantizar una calidad de vida adecuada (Nava et al., 2018).

De esta manera, la Etnoveterinaria reconoce la importancia de una sinergia entre los factores físicos, culturales, sociales y económicos con los animales, esto incluye a los aspectos farmacológicos en la prevención y tratamiento de sus diferentes enfermedades; abordando todas aquellas técnicas tradicionales aplicadas por los humanos para los fines antes mencionados (Nava et al., 2018; Shoaib et al., 2021).

Ecuador se ha consolidado como uno de los países con gran potencial en medicina tradicional por su numerosa diversidad vegetal, estimada en unas 25.000 especies; es por ello que se considera importante la investigación respecto a las formas de uso de cada especie y los beneficios que estas ofrecen dentro de la etnoveterinaria, en las diferentes comunidades del país (Contreras & Ramirez, 2022; Rendón et al., 2019). Collaguazo y Márquez (2022), manifiestan un ejemplo de esto en la comunidad de Paquiestancia, donde las mujeres utilizan sus conocimientos tradicionales de cuatro especies vegetales, propias

de la zona, como tratamiento para la mastitis bovina, al prepararlas como un emplasto que se aplica en las ubres de las vacas.

2.3.Descripción de especies empleadas en el tratamiento de la mastitis

2.3.1. *Cynanchum microphyllum*

Comúnmente conocido como “lechango”, *Cynanchum microphyllum* es un tipo de enredadera que se caracteriza por poseer en el interior de su tallo una leche blanquecina denominada látex, sus flores son de color crema y sus frutos de color verde (Gutiérrez, 2010). Esta especie se distribuye a lo largo de la región interandina de Ecuador, ubicándose principalmente en lugares que rondan los 3.000 metros de altitud, generalmente dentro de bosques premontanos (Oleas et al., 2016). La clasificación taxonómica se observa en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Cynanchum microphyllum*

Reino	Plantae
Orden	Gentianales
Familia	Apocynaceae
Subfamilia	Asclepiadoideae
Género	<i>Cynanchum</i>
Especie	<i>Cynanchum microphyllum</i>

Fuente: (Oleas et al., 2016)

Elaborado por: (Los autores, 2024)

La información acerca de los usos etnobotánicos del lechango es muy limitada, sin embargo, se ha evidenciado que posee propiedades analgésicas frente a golpes y es bastante útil como material para la elaboración de herramientas (Gutiérrez, 2010). Un estudio sistemático del género *Cynanchum* (familia Apocynaceae) en Sudamérica, realizado por Hechem, Ezcurra y Zuloaga (2012), destaca la importancia medicinal de algunas especies de este género (*Cynanchum chilense*, *Cynanchum pachyphyllum*), ya que presentan diversos metabolitos en el zumo lechoso, en sus tallos y en sus hojas,

mismos que les atribuyen actividades antiinflamatorias, antihemorrágicas, antiácidas y antisifilíticas.

2.3.2. *Cestrum peruvianum*

Cestrum peruvianum es conocido por su nombre común como “sauco”, esta especie es un arbusto perenne con una altura aproximada de dos metros, con un tallo leñoso de coloración verdosa y hojas ovales, alternas y pinnatinervias. Sus inflorescencias son axilares umbeliformes de coloración blanquecina y su fruto es una baya (León, 2010). Según Canal (2011), una característica del género *Cestrum* es que se encuentra distribuido en zonas tropicales y subtropicales a lo largo del continente americano, desde el norte de México hasta el noreste de Argentina. En Ecuador, *Cestrum peruvianum* es una especie vegetal que se encuentra en zonas húmedas, específicamente en zonas con ecosistemas montanos húmedos, por lo que se sitúa a lo largo del tramo interandino. La clasificación taxonómica se presenta en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Cestrum peruvianum*

Reino	Plantae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Subfamilia	Cestroidae
Género	<i>Cestrum</i>
Especie	<i>Cestrum peruvianum</i>

Fuente: (León, 2010)

Elaborado por: (Los autores, 2024)

Se conoce que el sauco es muy utilizado en la medicina tradicional en infusiones para tratar la fiebre, la tos y la reducción de síntomas gripales. Además, la infusión de flores y hojas es muy utilizada para tratar inflamaciones (Mora & Orozco, 2002; León, 2010; Caballero et al., 2019).

2.4. Estudio farmacognóstico de especies vegetales

Los estudios farmacognósticos son imprescindibles, especialmente para aquellas plantas que tienen potencial medicinal, algunos de los estudios que se realizan son: morfología, características del material seco molido, características de los extractos, análisis fisicoquímicos, etc. (Ramadevi et al., 2020; Shashikanth, 2023). Para llevar a cabo estos estudios, se debe partir de la recolección de las especies, siguiendo distintas pautas.

2.4.1. Recolección

La Organización Mundial de la Salud, en 2003, publicó una directriz sobre las buenas prácticas de recolección de plantas medicinales, en ella se menciona que esta actividad debe permitir la supervivencia a largo plazo de la especie y su hábitat, se debe coleccionar en la mejor temporada climática, no se deben recoger plantas que estén expuestas a plaguicidas o contaminantes y se tienen que colocar en bolsas nuevas con aireación. Además, luego de la recolección, la materia vegetal debe ser procesada para eliminar la suciedad, las partes innecesarias y las zonas dañadas o enfermas.

2.4.2. Carpeta botánica

Una carpeta botánica es un documento que contiene datos relevantes de una especie vegetal y una muestra de la misma que ha sido prensada para su conservación. Estos documentos son importantes ya que permiten acceder a información de diferentes especímenes y se conservan en colecciones dentro de herbarios (Arnelas et al., 2012).

2.4.3. Morfología

El análisis morfológico es de gran utilidad cuando se quiere hacer una identificación taxonómica, esto se debe a que las plantas tienden a presentar variaciones

en sus diferentes órganos en cuanto a la forma, estructura y apariencia (Odewo et al., 2022). Este estudio se puede realizar mediante la visualización de la muestra vegetal en un estereoscopio (macromorfología) o en un microscopio (micromorfología) (Talip et al., 2024).

2.4.4. Método de extracción

La elaboración de extractos es una de las principales técnicas que se lleva a cabo para poder analizar los compuestos que se encuentran presentes en las plantas (Agrawal & Nirmal, 2024). Los métodos más utilizados se describen a continuación.

2.4.4.1. Hidrodestilación

Es un método utilizado para la extracción de aceites esenciales de diversos materiales vegetales, en el proceso se usa agua como disolvente porque permite eliminar la necesidad de la recuperación de disolventes, dando lugar al ahorro de recursos, energía y tiempo (Aruna et al., 2022; Turchetti & De Santis, 2022).

2.4.4.2. Percolación

Consiste en la extracción de compuestos bioactivos de material vegetal molido, que se pone en contacto con un solvente y permite su renovación constante, debido a que el solvente pasa a través de la planta molida mediante percoladores, donde se controla la temperatura, tiempo y flujo del proceso (Benítez et al., 2020).

2.4.4.3. Extracción Soxhlet

Se basa en el uso de solventes de bajo punto de ebullición, los cuales se evaporan, entran en contacto con el material vegetal y arrastran con los compuestos que este

contiene. El equipo se conoce como extractor Soxhlet y el proceso dura horas o incluso días (Rivas et al., 2016).

2.4.4.4. Maceración

Se fundamenta en remojar el material seco con un disolvente dentro de un recipiente ámbar; esto se deja a temperatura ambiente por 2 o 3 días con constante agitación y finalmente, se filtra para obtener el extracto (Agrawal & Nirmal, 2024). Es un método de alta eficiencia, evita el daño oxidativo del material y puede generar extractos con elevados compuestos bioactivos benéficos (Mukhametov et al., 2023).

2.4.5. Control de calidad

El control de calidad es un conjunto de pasos fundamentales para la fabricación de productos elaborados a partir de plantas medicinales, ya que aseguran la buena calidad, eficacia y eficiencia de los mismos. Los controles de calidad se aplican en la materia prima, los excipientes y el producto final (Kagawad et al., 2021).

2.4.5.1. Porcentaje de humedad

Evaluar la cantidad de humedad que hay en el material vegetal seco es necesario debido a que una alta cantidad de agua influye en la degradación de sus componentes y en el crecimiento de microorganismos. Actualmente, se puede emplear un analizador de humedad halógeno que seca rápidamente las muestras y emite el valor del contenido de humedad en función de la variación del peso (Eltahir et al., 2018).

2.4.5.2. Índice de refracción

El índice de refracción es una medida que indica la capacidad de una sustancia para refractar la luz, lo que permite conocer su calidad y pureza (Putri, 2023; Sonawane

et al., 2024). Para obtener la medición se utiliza un equipo llamado refractómetro (Chaouche et al., 2021).

2.4.5.3. pH

El pH es un valor que determina el nivel alcalino o ácido de una muestra, su medición es importante porque puede influir en la solubilidad y estabilidad de algunos compuestos de las plantas (Sonawane et al., 2024). El equipo que se emplea es el potenciómetro (Hendrawati et al., 2019).

2.4.5.4. Densidad

La densidad se define como la masa por unidad de volumen de la muestra y sirve para conocer su pureza (Sonawane et al., 2024). Para su determinación se utiliza el picnómetro (Hendrawati et al., 2019).

2.4.5.5. Sólidos totales

Los sólidos totales se refieren a la cantidad de residuo que queda después de exponer la muestra a un proceso de secado, en condiciones específicas, hasta obtener un peso constante y su importancia radica en que estos sólidos impactan en la estabilidad de la sustancia (Patel et al., 2020).

2.5. Análisis fitoquímico

El análisis fitoquímico es un parámetro importante para conocer los componentes químicos y principios activos que se encuentran en las plantas y, de esta forma, evaluar sus posibles usos, por ejemplo, en el ámbito medicinal (J. R. Shaikh & Patil, 2020). Dichos compuestos forman parte del metabolismo de las plantas y se dividen en metabolitos primarios y secundarios (saponinas, alcaloides, glucósidos, taninos, etc.),

estos pueden exhibir diversas actividades biológicas, incluidas propiedades antiinflamatorias, antiateroscleróticas, antitumorales, antimutagénicas, antibacterianas, antivirales, anticancerígenas, antioxidantes, etc. (Muharrami et al., 2020).

2.5.1. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico es un método analítico, generalmente cualitativo, que se usa para determinar el tipo de metabolitos que se encuentran en los extractos de las plantas. Este análisis se realiza mediante el uso de distintos reactivos que reaccionan específicamente de acuerdo a cada metabolito (Syahputra et al., 2021) (**Anexo 1**).

2.6. Análisis molecular

La identificación de especies a nivel molecular suele ser indispensable al momento de establecer nuevos datos taxonómicos. En la actualidad, las técnicas moleculares basadas en ADN permiten la obtención de información de alta confiabilidad, debido a que el contenido del genoma es único para cada individuo. Es así que, se vuelve necesario contar con protocolos precisos para determinar los niveles de variación genética, empezando por el aislamiento y purificación de ADN, para la posterior aplicación de las técnicas moleculares (Cerna & Miño, 2018; Rey & Capdevielle, 2020).

2.6.1. Protocolo de extracción y cuantificación de ADN

La extracción se basa en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN, a través de la interacción de sus características fisicoquímicas. Estos protocolos, generalmente, pretenden la reducción o eliminación de moléculas que interfieren en los procesos posteriores; además, deben ser sencillos, rápidos y eficaces para garantizar la

calidad del material genético a obtener. La selección del método dependerá del organismo con el que se está trabajando (Alfonso et al., 2016; Niizawa, 2020).

El proceso de extracción consta de 4 fases fundamentales:

- 1) Homogenización y lisis: Puede ser homogenización química, empleando un buffer de lisis que estabiliza el material genético y desnaturaliza proteínas, u homogenización mecánica, que consiste en la utilización de un pistilo, el cual ayuda a la separación de la muestra mediante la fricción (Alejos et al., 2014).
- 2) Separación de lípidos y proteínas: En esta fase, el ADN se separa de los lípidos y proteínas a través de ciclos de centrifugación y la interacción con solventes orgánicos que disocian las membranas celulares. Un ejemplo es el fenol: cloroformo, que desnaturaliza proteínas y elimina lípidos (Checa et al., 2017).
- 3) Precipitación del ADN: El ADN se recupera de la separación de lípidos y proteínas mediante el uso de solventes como el isopropanol o el etanol (Alejos et al., 2014).
- 4) Redisolución del ADN: Pretende la hidratación del ADN para su posterior análisis, para lo cual, se utiliza agua de grado ultrapuro (Alejos et al., 2014).

Respecto a la cuantificación y evaluación de la calidad del ADN, son aspectos esenciales para los análisis posteriores como la PCR. Dentro de los métodos más utilizados para cuantificar el ADN se encuentra el análisis por absorción ultravioleta, pues los nucleótidos poseen valores máximos de absorción de alrededor de 260 nm. Este método se caracteriza por proporcionar un estimado preciso de la concentración de ADN, solo si se encuentra libre de proteínas o solventes orgánicos, es decir, puro. Para evaluar

la pureza, la muestra se somete a una proporción OD 260nm/OD 280nm, donde, si la relación se encuentra en el rango de 1,8 a 2,0, se considera que el ADN extraído es de buena calidad (Desjardins & Conklin, 2010).

2.6.2. Amplificación y marcadores moleculares

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida por sus siglas en inglés como PCR, ha sido catalogada como una de las principales herramientas que aprovecha los fundamentos de la biología molecular para el diagnóstico y análisis de muestras de ADN (Angarita et al., 2017).

Se caracteriza por ser un método de alta fidelidad y rendimiento debido a la acción de componentes que integran la mezcla de la reacción. Entre los elementos importantes están los desoxirribonucleicos trifosfatos o dNTPS, que cumplen la función de bloques para la construcción de las nuevas cadenas de ADN; la Taq polimerasa, que es una enzima que se encarga de la síntesis de la nueva cadena de ADN, involucrada junto con los primers o cebadores que permiten el inicio de la síntesis; la muestra de ADN y el agua. De esta manera, la técnica permite la obtención de amplificaciones selectivas de regiones de AND y también conocer las secuencias que lo flanquean (Serrato et al., 2014).

Las aplicaciones de la PCR son varias y generan la posibilidad de realizar estudios de la evaluación de la expresión génica, la detección de secuencias o mutaciones y el diagnóstico de enfermedades de origen genético (Angarita et al., 2017).

Por otro lado, los marcadores moleculares son segmentos de ADN que se asocian con una parte del genoma de un organismo, permitiendo su detección de manera simple (Carrodeaguas & Zúniga, 2021). Los marcadores moleculares son empleados en

diferentes estudios, generalmente basados en la técnica PCR que son preferidos debido a la calidad de sus procesos (Talamantes et al., 2019).

2.6.3. Secuenciación

La secuenciación es un proceso que consiste en la determinación del orden de las bases que componen un fragmento de ADN (A, C, T y G); el método fue descrito por Sanger en el año de 1977, y genera la posibilidad de conocer la secuencia exacta de un fragmento de ADN o gran parte de este. La evolución de esta técnica ha permitido el avance en la detección de diferentes tipos de secuencias y la exploración de genomas completos de varios organismos (Angarita et al., 2017). El análisis de estos fragmentos resulta muy útil para la determinación de sitios de variabilidad o conservados del producto amplificado obtenido de la PCR, el resultado de la secuenciación puede ser utilizado para la identificación de especies (Cerna & Miño, 2018).

2.6.4. BLAST

La herramienta básica de búsqueda de alineación local, conocida como BLAST, por sus siglas en inglés, es un algoritmo informático de alineamiento de ADN, ARN o proteínas, que permite encontrar regiones de similitud local entre secuencias. El programa compara secuencias de nucleótidos o proteínas con bases de datos y calcula la importancia estadística de las coincidencias. BLAST se puede utilizar para inferir relaciones funcionales y evolutivas entre secuencias, así como para ayudar a identificar miembros de familias de genes (NCBI, 2023).

2.7. Actividad toxicológica

El término “toxicidad” se refiere al potencial que tiene una sustancia para afectar a los organismos, a sus órganos y a sus células; sin embargo, es importante mencionar que, en función de la concentración, toda sustancia es tóxica. Es por esto que, evaluar la actividad toxicológica de una muestra en estudio resulta muy valioso, pues permite saber a qué dosis es segura. Para ello, se pueden emplear diferentes pruebas en diversos modelos animales (Rahman et al., 2021).

2.7.1. *Artemia salina*

El camarón de salmuera (*Artemia salina*) (**Figura 2.**) es un pequeño crustáceo utilizado ampliamente en los estudios de toxicidad, esto se debe a las siguientes razones: 1) la prueba es rápida, práctica y segura; 2) se requiere de pocos recursos; 3) ofrece datos confiables y 4) los nauplios presentan una alta sensibilidad a los agentes tóxicos (Banti & Hadjidakou, 2021; Lima et al., 2021; Okumu et al., 2021).



2.7.2. Cálculo de la concentración letal media (CL₅₀)

La concentración letal media (CL₅₀) es la concentración a la cual la muestra de estudio provoca la muerte del 50% de los organismos utilizados como modelo, en un intervalo de tiempo determinado (Silva & Silva, 2023). El análisis de regresión Probit es uno de los métodos más apropiados para calcular la CL₅₀, ya que ofrece una estimación

de probabilidad sobre cuál sería la concentración letal media, basándose en los porcentajes de mortalidad, mismos que se transforman a unidades Probit (Wulansari et al., 2022).

2.8.Actividad antioxidante

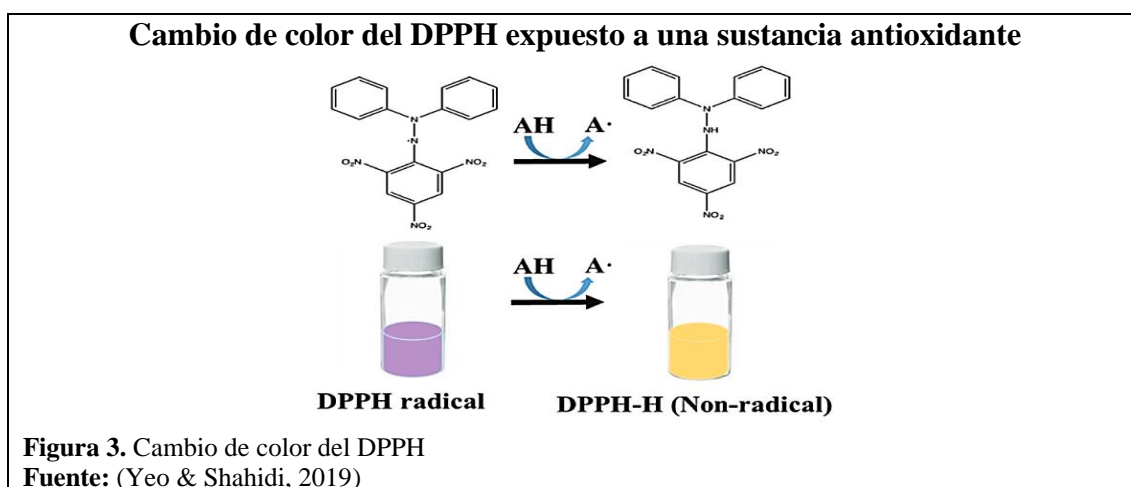
Los radicales libres son pequeñas moléculas químicas que poseen un electrón desapareado, por lo que son altamente reactivos frente a otras moléculas vecinas (Ifeanyi, 2018). Los investigadores afirman que el aumento de la cantidad de radicales libres en los organismos vivos (estrés oxidativo), está asociado con el desarrollo de distintas enfermedades, sin embargo, una forma de controlar estas moléculas es el uso de antioxidantes (Santo et al., 2016).

Los antioxidantes son sustancias que ayudan a los organismos a prevenir, neutralizar y reparar los daños provocados por los radicales libres; las propias células del organismo son capaces de sintetizar estas moléculas (ácido alfa lipoico y glutatión), pero también se las puede consumir mediante alimentos o suplementos (vitamina C y vitamina E). Es ahí donde entran las plantas, dado que pueden ofrecer una gran actividad antioxidante dependiendo de sus metabolitos, por lo que es importante determinar su capacidad antioxidante (Gharu, 2022).

2.8.1. Método DPPH

Uno de los métodos más empleados para medir la actividad antioxidante es el Ensayo de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), ya que es rápido, fácil y sensible. El DPPH es un radical libre que es estable, de color morado y puede reaccionar con distintas moléculas antioxidantes al recibir un átomo de hidrógeno, cuando esta reacción ocurre el color cambia a amarillo y la absorbancia se mide a 517 nm (Figura 2.), el fundamento es

que, a menor absorbancia, existe una mayor actividad antioxidante del compuesto estudiado (Sugiharto et al., 2019).



2.8.2. Cálculo de la concentración inhibitoria (IC₅₀)

La concentración a la que la muestra en estudio inhibe el 50% de los radicales libres se conoce como IC₅₀ y se deduce a partir de la gráfica de la Concentración vs el porcentaje de inhibición (Ghavam, 2018). Cuanto menor sea el IC₅₀, más alta será la actividad antioxidante (Sugiharto et al., 2019).

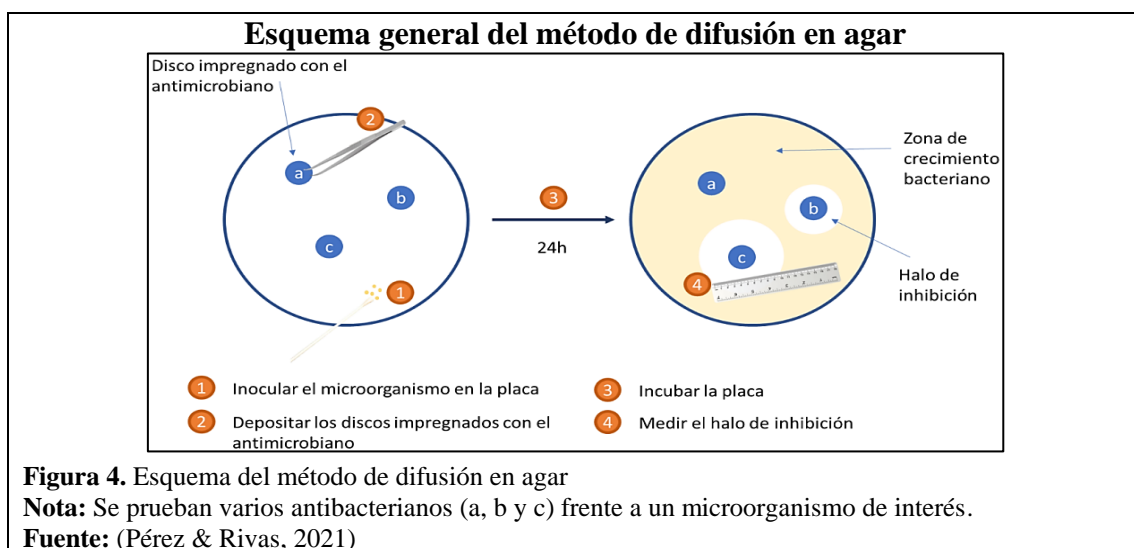
2.9. Actividad antibacteriana

Se entiende por “actividad antibacteriana” a la capacidad de ciertos compuestos para causar la muerte o inhibir el crecimiento de las bacterias. Evaluar la capacidad antibacteriana de productos de origen natural, como los extractos de plantas, es imprescindible, ya que estos pueden contener moléculas que generan innumerables oportunidades para el desarrollo de nuevas drogas que controlen o inhiban el crecimiento de este tipo de microorganismos (Sánchez et al., 2016).

2.9.1. Antibiograma por el método de difusión en agar

Dentro de los métodos más utilizados para evaluar de forma preliminar la actividad antibacteriana, se encuentra el método de difusión en disco, también llamado antibiograma disco-placa. Este es un ensayo basado en el método Kirby-Bauer, y actualmente es recomendado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), para la correcta determinación de la sensibilidad de las bacterias frente a los antibacterianos (Pérez & Rivas, 2021).

El ensayo se realiza en una caja Petri con agar, previamente inoculada con la cepa bacteriana y consiste en depositar en la superficie del agar discos de papel filtro, impregnados con diferentes concentraciones del extracto a evaluar. Generalmente, el medio dependerá del tipo de microorganismos, aunque se recomienda usar el agar Müller-Hinton (MH) o el agar nutritivo. Respecto al disco, se debe impregnar alrededor de 10 a 20 uL de los extractos, estándares y blancos. Las cajas se tienen que incubar a una temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas, posteriormente, se toma la medición de los halos, incluyendo el diámetro de los discos (Sánchez et al., 2016; Pérez & Rivas, 2021). En la **Figura 3**. Se muestra un esquema del proceso en caja Petri para la determinación de la actividad antibacteriana.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.Recolección de muestras vegetales

Se consideraron las distintas actividades a realizar en la investigación, por lo que se recolectó aproximadamente 500 g entre tallos y hojas de *Cynanchum microphyllum* Kunth y de *Cestrum peruvianum* Willd. ex Roem & Schult (**Anexo 2.**).

Las primeras muestras se recolectaron para la elaboración de la carpeta botánica, según el protocolo de Arnelas et al. (2012). Para ambas especies se cortaron las zonas de interés sanas y sin alteraciones, e inmediatamente fueron prensadas entre tablas, cartón y papel periódico (tamaño A3); las plantas se apilaron entre dichos materiales de forma cuidadosa para no dañarlas al momento de su ubicación y se buscó resaltar las estructuras de tallos, hojas y flores (**Anexo 3.**). Finalmente, el prensado se sujetó con fuerza mediante una cuerda y se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente procurando el cambio de papel en forma sucesiva durante tres semanas para su correcto secado.

Por otro lado, para las actividades a desarrollar en el Laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana -Sede Quito- El Girón, se cortaron aquellas plantas que visualmente no tenían enfermedades ni lesiones y se almacenaron en fundas de basura nuevas y diferentes para cada especie, manteniendo una buena aireación durante su recolección y transporte, según las directrices de la Organización Mundial de la Salud (2003). Además, se anotaron los siguientes datos en el cuaderno de campo: área de recolección (provincia, cantón, parroquia, localidad y coordenadas), fecha, hora, especie (nombre común y científico), nombre del recolector, nombre de quien identificó la especie y características de la planta.

3.1.1. Carpeta botánica y autenticación

La identificación de las especies se llevó a cabo por técnicos del Herbario del Laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana - Sede Quito -El Girón. Se analizó, consultó y comparó la apariencia macromorfológica de los diferentes órganos vegetales de las plantas motivo del presente estudio. Una vez identificadas se colocó en la ficha botánica, el nombre científico y la familia. Para ambas especies se colocó una etiqueta que incluye la siguiente información: número de colección, familia, nombre científico, nombre común, forma de vida, altura de la especie, descripción de la planta, fecha de colección, provincia, cantón, parroquia, localidad, formación vegetal, coordenadas, altitud de la zona, nombre de los recolectores y nombre de la persona que identificó la especie.

3.1.2. Morfología

A la par de la identificación botánica de las plantas, en el Laboratorio de Ciencia de la Vida, se realizó el análisis de las estructuras de hojas y tallos bajo el lente de un estereoscopio. Las estructuras observadas se fotografiaron con cámara de un celular de marca Xiaomi. Finalmente, cada parte vegetal se caracterizó con ayuda del texto “Anatomía y morfología vegetal” de los autores Chuncho et al. (2019).

3.2. Procesamiento de muestras vegetales

3.2.1. Preparación del material vegetal para molienda

Las plantas se clasificaron cuidadosamente para separarlas de restos de otras especies y de partes dañadas o enfermas, que pudieran interferir con la investigación (Organización Mundial de la Salud, 2003). Se separaron manualmente las hojas y tallos de sauco, mientras que, para el lechango se usó la planta completa, considerando el

tamaño pequeño de sus hojas, unidas al tallo tipo enredadera, con el fin de obtener la suficiente cantidad de material molido (Collaguazo & Márquez, 2022).

3.2.2. Desinfección

Para su desinfección, las dos especies se colocaron en tinas diferentes y se vertió una solución de hipoclorito de sodio al 5% en una proporción 1:10, durante 5 min. Luego, fueron enjuagadas tres veces usando agua destilada para eliminar cualquier resto de suciedad o contaminación (Collaguazo & Márquez, 2022; Carballo et al., 2002).

3.2.3. Secado

Se empleó papel absorbente y papel periódico para cubrir las plantas por 24 h, de forma que se escurriera el exceso de humedad. Después de ese tiempo, se empleó la metodología de secado de Collaguazo & Márquez (2022) con modificaciones, para ello las dos especies se secaron en estufas diferentes a $50 \pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 48 h para las hojas y lechango, y durante 72 h para los tallos.

3.2.4. Molienda

El material vegetal seco se trituró con una licuadora a máxima potencia hasta obtener un molido visualmente fino (Collaguazo & Márquez, 2022). Este producto se colocó en fundas ziploc nuevas y etiquetadas (especie, parte de la especie, fecha y lugar de molienda), y se envolvió con papel aluminio para protegerlo de la exposición a la luz.

3.2.5. Tamaño de partículas del material molido

Se utilizó un juego de tamices de 2,36 mm, 1,00 mm, 710 μm , 600 μm , 425 μm , 300 μm , 180 μm y 90 μm , mismos que fueron apilados de menor a mayor diámetro. El material molido se colocó en el primer tamiz y todos los tamices se ubicaron en el

tamizador marca *Advantech* para su agitación durante 20 min. Para el lechango y las hojas se utilizó el residuo del tamiz de 90 μm y para los tallos, del tamiz de 180 μm . El material sobrante se recolectó para molerlo y tamizarlo nuevamente. Finalmente, se registró el peso total obtenido del tamizado de cada planta (Collaguazo & Márquez, 2022).

3.2.6. Porcentaje de humedad del material seco

Se establecieron los parámetros en el analizador de humedad halógeno HB4-S marca *Mettler Toledo*, siguiendo el manual del proveedor. Se pesó 4 g de especie molida, se esperó el tiempo de secado rápido y se anotó el valor de %MC (porcentaje del contenido de humedad) registrado por el equipo, el análisis se realizó por triplicado.

3.3.Elaboración de extractos

3.3.1. Maceración

Para preparar los extractos se pesó 30 g de cada muestra molida y se embebió en 100 mL de etanol al 96%, así se obtuvieron los extractos etanólicos en concentración 30% p/v. Cada extracto se colocó en un envase de vidrio previamente desinfectado y seco, se cerró herméticamente y se envolvió en papel aluminio. La mezcla se maceró durante cuatro días con agitación constante (Agrawal & Nirmal, 2024).

El macerado se filtró mediante un equipo de filtrado al vacío (**Anexo 4.**), a través de una membrana de 0,2 μm para impedir el paso de microorganismos al extracto filtrado, mismo que fue recolectado en un envase ámbar limpio y etiquetado (Agrawal & Nirmal, 2024).

3.4.Control de calidad de extractos

3.4.1. Índice de refracción

Para medir el índice de refracción se utilizó un refractómetro eléctrico, para lo cual, se limpió el prisma de refracción con agua destilada antes de cada uso. Con ayuda de una pipeta se colocaron tres gotas de los extractos y se realizó la lectura ajustando adecuadamente el equipo, el ensayo se hizo por triplicado (Chaouche et al., 2021).

3.4.2. pH

Se verificó la calibración del electrodo del potenciómetro con el correspondiente buffer y se limpió con agua destilada antes de cada medición. Se tomó 10 mL de extracto y se sumergió el electrodo, pasado unos minutos el potenciómetro arrojó los valores de pH. El ensayo se realizó por triplicado (Hendrawati et al., 2019).

3.4.3. Densidad

Los valores de la densidad se obtuvieron con ayuda de un picnómetro limpio y seco, el cual, primero se pesó vacío. Luego, se colocó 10 mL del extracto evaluado en el picnómetro y se pesó para registrar el valor, el procedimiento se llevó a cabo tres veces. La fórmula para calcular la densidad se muestra en la **Ecuación 1**. (Teixeira et al., 2020).

Fórmula para calcular la densidad

$$\rho = \frac{m}{V}$$

Ecuación 1. Fórmula de la densidad

Nota: En la fórmula: ρ (densidad [kg/m³]), m (masa [g]) y V (volumen [m³]).

Fuente: (Teixeira et al., 2020)

3.4.4. Sólidos totales

Primero, se tararon crisoles de porcelana limpios y secos. Posteriormente, se colocó 2 mL de cada extracto en los crisoles y se dejó en baño maría a 75 °C para evaporar hasta que el residuo esté seco. Luego, los crisoles se colocaron en una estufa a 105 ± 2°C y se registró su peso después de enfriarlos en el desecador. El proceso se realizó cada

hora, hasta completar 3 h y se repitió por última vez empleando 24 h de secado, hasta obtener una masa constante (Rodríguez et al., 2018). La determinación se realizó por triplicado. Finalmente, los sólidos totales se calcularon con la fórmula de la **Ecuación 2**.

Fórmula para calcular los sólidos totales

$$St = \frac{Pr - P}{V * 100}$$

Ecuación 2. Fórmula de sólidos totales

Nota: *Pr* (masa del crisol más masa del residuo [g]), *P* (masa del crisol vacío [g]), *V* (volumen [mL]) y **100** (factor matemático).

Fuente: (Rodríguez et al., 2018)

3.5. Tamizaje fitoquímico

Una vez obtenidos los extractos se llevó a cabo los ensayos cualitativos de coloración y/o precipitación para la determinación de compuestos fitoquímicos, aplicando las metodologías establecidas por Pujol (2020) y Rodríguez et al., (2020).

3.5.1. Alcaloides

La determinación de alcaloides se realizó a través de dos ensayos que fueron el ensayo Dragendorff y el ensayo Wagner. Para el ensayo de Dragendorff, se tomó una alícuota de 1 mL de extracto y se colocó en un tubo de ensayo, esto se llevó a baño maría a 78°C hasta que el alcohol se evaporó (30 a 60 min). Posteriormente, se rediluyó el residuo con 1 mL de HCL (1%) y se agitó hasta homogeneizar. Finalmente, se añadieron 2 a 3 gotas del reactivo de Dragendorff y se dejó reposar por 2 min. Los criterios evaluados fueron: (+++) Precipitado, (++) Turbidez, (-) Apariencia normal, sin cambios.

Para el ensayo de Wagner el proceso a seguir es el mismo, con la diferencia de que se añadieron 2 a 3 gotas del reactivo de Wagner, se dejó reposar durante 2 min y se observaron los resultados.

3.5.2. Saponinas

Las saponinas se identificaron mediante la prueba de espuma. Para ello, se tomó 1 mL de extracto y se diluyó con 5 mL de agua destilada, esto se agitó continuamente durante 5 min. Los criterios evaluados fueron: Positivo (+) Espuma con una altura mayor a 2 mm, con una permanencia de al menos 2 min, Negativo (-) Sin presencia de espuma.

3.5.3. Flavonoides

Se determinó la presencia de flavonoides a través del ensayo de Shinoda. Para lo cual, se tomó una alícuota de 1 mL de extracto y se colocó en un tubo de ensayo, a esto se añadió 1 mL de HCl concentrado y 5 mm de cinta de magnesio metálico. Después de 5 min, se adicionó 1 mL de alcohol amílico, se mezcló y se dejó reposar durante 2 min. Los criterios evaluados fueron: Positivo (+) Coloración amarilla o roja, Negativo (-) Coloración normal.

3.5.4. Fenoles y Taninos

Para la identificación de fenoles y taninos se utilizó el ensayo de Cloruro férrico. Primero, se tomó una alícuota de 1 mL de extracto y se adicionaron de 3 a 4 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5%, disuelto en solución salina. Los criterios evaluados fueron: (+++) Rojo: Fenoles, (++) Azul: taninos pirogálicos, (+) Verde: taninos catéquicos.

3.5.5. Resinas

Se colocaron 2 mL de extracto en un tubo de ensayo, a los cuales se añadieron 10 mL de agua destilada y se dejó en reposo. La presencia de precipitados en la muestra luego de 5 min significa que el ensayo es positivo.

3.5.6. Quinonas

La determinación de quinonas se llevó a cabo a través de la prueba de Borntrager, para lo cual, se tomó una alícuota de 1 mL de cada extracto y se colocó en un tubo de ensayo, se llevó a baño maría a 78°C hasta que el alcohol se evaporó (30 a 60 min). Posteriormente, se rediluyó el sobrenadante con 1 mL de HCL (1%) y se agitó hasta homogeneizar. Finalmente, se adicionó 1 mL de hidróxido de sodio al 5%, disuelto en agua destilada. Esto se agitó y se dejó reposar durante 5 min. Los criterios evaluados fueron: (+++) Coloración roja, (++) Coloración rosada, (-) Sin cambio de coloración.

3.5.7. Triterpenos y Esteroides

La determinación de triterpenos y esteroides se llevó a cabo a través del ensayo de Liberman Burchard, que consistió en colocar una alícuota de 1 ml de cada extracto en un tubo de ensayo, y llevarlos a baño maría a 78°C hasta que el alcohol se haya evaporado (30 a 60 min). Luego, se rediluyó el sobrenadante con 1 ml de HCL (1%) y se agitó hasta homogeneizar. Se añadió 1 mL de anhídrido acético concentrado y se homogenizó, finalmente se adicionaron 2 a 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado, lentamente por las paredes del tubo, observando la coloración. Los criterios evaluados fueron: (+++) Verde intenso o verde oscuro, (++) Verde, (+) Rosado o azul.

3.5.8. Catequinas

La determinación de catequinas se realizó depositando una gota de cada extracto en un trozo de papel filtro de 10×10 cm. Posteriormente, sobre la mancha generada, se agregó 1 gota de una solución de carbonato de sodio 2M. Seguido a esto, la muestra de cada extracto se procedió a leer bajo una cámara de luz UV a 366 nm. Los criterios evaluados fueron: Positivo (+) cuando se visualizó una marca verdosa fosforescente en los bordes de la mancha.

3.5.9. Cumarinas y lactonas

Para determinar la presencia de cumarinas y lactonas, se realizó el ensayo de Baljet. Para esto, se tomó 1 mL de cada extracto y se agregó 1 mL de los reactivos de Baljet A y B. Los criterios evaluados fueron: (+++) Precipitado rojo, (++) Coloración roja, (-) Sin presencia de precipitados.

3.5.10. Heterósidos cardiotónicos

Para la detección de heterósidos cardiotónicos se utilizó el ensayo de Kedde. Se utilizó 1 mL de extracto al cual se le añadió 1 mL del reactivo de Kedde A y B. Posteriormente, se dejó reposar de 5 a 10 min y se observó el cambio de coloración. Los criterios evaluados fueron: Positivo (+) Color violeta, Negativo (-) Sin cambio de color.

3.6. Análisis molecular

3.6.1. Protocolo de extracción y cuantificación de ADN

Para la extracción del ADN vegetal (*C. peruvianum* y *C. microphyllum*) se utilizó el método y especificaciones del kit comercial *Thermo Scientific™ Phire Plant Direct PCR MasterMix* de *Thermo Scientific*, combinado con el protocolo definido por Doyle y Doyle (1987), modificado por Ocaña y Valencia (2023). El diagrama del procedimiento se encuentra establecido en el **Anexo 5**.

La cuantificación de ADN se realizó en un espectrofotómetro *NanoDrop 2000* (**Anexo 6**), usando una opción de lectura propia del equipo para ADNc. Para esto, se colocó 1 uL de agua libre de nucleasas (control) en el equipo y se midió su absorbancia a 260 nm. Posteriormente, se tomó 1 µL de cada muestra y se analizó la concentración de ADN a 260 nm y su pureza mediante la relación 260/280 nm.

3.6.2. Amplificación de ADN

Para este proceso, se siguió la metodología de Ocaña y Valencia (2023). Se usó el kit *Phire Plant Direct PCR MasterMix* de *Thermo Fisher Scientific* para preparar la mezcla de PCR en tubos PCR (**Anexo 7**). Estos tubos se colocaron en un termociclador de la marca *Applied Biosystems*, se configuraron las condiciones de amplificación para el marcador *matK* y se esperó el tiempo establecido por el protocolo del equipo.

Los resultados de la amplificación se analizaron a través de una electroforesis horizontal en gel de agarosa (1%), que se preparó pesando 0,5 g de agarosa *Thermo Scientific* grado biología molecular y añadiendo 50 mL de TBE 1X, esto se calentó en microondas y se dejó enfriar durante 5 min a temperatura ambiente, luego, se agregaron 0,2 μ L del fluorocromo *SafeViewTM Classic*. La solución del gel se colocó en un molde de 14 pocillos y se dejó gelificar a temperatura ambiente. Después, se colocó el gel en una cámara de electroforesis horizontal. La cámara se llenó con TBE 1X y se introdujeron 2,5 μ L del marcador de peso molecular (*Thermo Scientific*) y de las muestras en cada pocillo (**Anexo 8**). Por último, los resultados se revelaron en un fotodocumentador y se determinaron las cadenas amplificadas comparándolas con las bandas del marcador de peso molecular (**Anexo 9**) (Ocaña & Valencia, 2023).

3.6.3. Secuenciación

Los productos PCR que se obtuvieron fueron diluidos en agua libre de nucleasas hasta llegar a una concentración de 20 ng/ μ L y se colocaron 15 μ L de muestra en tubos Eppendorf de 1,5 mL. Posteriormente, se etiquetaron con el número de colección de cada especie y se almacenaron según los requerimientos de la empresa *Macrogen Inc.* (Seúl,

Corea del Sur), donde las muestras se purificaron y fueron secuenciadas a través del método Sanger automatizado (Ocaña & Valencia, 2023).

3.6.4. BLAST

Los resultados de la secuenciación reportados por la empresa *Macrogen Inc.* se enviaron al PhD. Marco Cerna, coordinador del grupo de investigación Nunkui Wakan, en el formato “.ab1”. La información fue utilizada para este estudio en la determinación de las secuencias *matK* para el sauco y el lechango, mismas que fueron limpiadas en el programa Geneious, hasta obtener un porcentaje de calidad sobre el 90%. Posteriormente, las secuencias se introdujeron y analizaron en el software BLAST del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). Los primeros 10 resultados de cada análisis se colocaron en tablas que contienen la siguiente información: familia, especie y porcentaje de identidad (Díaz & Guamangallo, 2023).

3.7. Actividad toxicológica

Para analizar la actividad toxicológica de los extractos etanólicos, se utilizaron las metodologías de Armas (2012) y Quinchuela & Vaca (2020), con modificaciones en cuanto a la obtención, incubación y preparación de extractos y controles.

3.7.1. Obtención de *Artemia salina*

Los huevos de *Artemia salina* fueron adquiridos en el local Aventura Acuática, en la ciudad de Quito (**Anexo 10.**).

3.7.2. Preparación de agua salina

El agua salina se preparó a una concentración del 2%, para ello, se pesaron 2 g de sal marina por cada 100 mL de agua destilada, la sal se disolvió con una varilla de vidrio y se filtró empleando papel filtro, seguidamente, se ajustó el pH a un valor de $8 \pm 0,5$.

3.7.3. Desinfección

Se pesaron 3 g de los huevos de *Artemia salina* y se colocaron en un matraz con 1 L de agua, esto se dejó en reposo por 30 min para su hidratación. Para la desinfección se utilizó NaClO al 5%. Se agregó 50 mL de la solución en un matraz y se agitó manualmente por 3 min, esto se repitió cuatro veces más. Finalmente, los huevos se depositaron en papel filtro y se enjuagaron cinco veces con agua destilada.

3.7.4. Incubación de huevos

Se colocó 5L de agua salina en una pecera, allí se introdujo un burbujeador, un termómetro y un calentador para pecera. Los huevos de *Artemia salina* se incubaron durante 2 días a 25°C con luz constante, hasta su eclosión (**Anexo 11.**).

3.7.5. Preparación de extractos y controles

Para cada extracto de las especies en estudio, se prepararon cuatro diluciones (2.000, 1.000, 500 y 250 ppm), por triplicado. Para establecer el control positivo se utilizó etanol al 96% y para el control negativo se utilizó agua salina al 2%.

3.7.6. Ensayo de toxicidad

Para el ensayo, se colocaron 5 mL de las diluciones de los extractos y los controles en cajas Petri de 6 cm (**Anexo 12.**). En cada caja se añadieron 10 nauplios de *Artemia salina* (**Anexo 13.**), con ayuda de puntas de micropipeta y un estereoscopio. Las cajas se colocaron a 25°C en una incubadora durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, se procedió

al conteo de los nauplios muertos en cada caja. Se consideró como muertos a aquellos individuos en los que no se observó movimiento después de 20 s.

3.7.7. Determinación de capacidad toxicológica

Para el análisis se siguió el procedimiento de Pacheco (2011). Se inició construyendo una base de datos en el programa Microsoft Excel, donde se colocaron las concentraciones de los extractos evaluados con el respectivo número de muertes contabilizadas en cada ensayo, por triplicado. Con dichos valores, se realizó el análisis estadístico que se describe en el **Anexo 14.**, empleando la tabla de conversión de porcentaje de mortalidad a Probit (**Anexo 15.**). El grado de toxicidad de los extractos se expresó mediante la **Tabla 4.**

Tabla 4. Nivel de toxicidad de acuerdo a la CL50

CL₅₀ (ppm)	Nivel de toxicidad
1 a 10	Extremadamente tóxico
10 a 100	Altamente tóxico
100 a 500	Moderadamente tóxico
500 a 1000	Ligeramente tóxico
1000 a 1500	Prácticamente no tóxico
Mayor a 1500	Relativamente inocuo

Fuente: (Sinti & Torres, 2017)

3.8. Actividad antioxidante

Se evaluó la actividad antioxidante de los tres extractos etanólicos siguiendo el método DPPH adaptado a microplacas de las autoras Calderón & Ojeda (2022), proporcionado por el docente PhD. Paco Noriega, con modificaciones en cuanto a la preparación de soluciones y al análisis en microplacas. Toda la actividad se llevó a cabo en un ambiente sin luz artificial y con las cortinas cerradas para evitar la degradación de los reactivos.

3.8.1. Método DPPH

3.8.1.1. Preparación de soluciones

Se preparó una solución del radical DPPH, pesando 4 mg del compuesto en un tubo Eppendorf estéril y agregando 1 mL de etanol al 96%, esta solución se agitó y se trasladó a un balón de aforo de 100 mL (**Anexo 16.**). El balón de aforo con la solución preparada fue cubierto completamente con papel aluminio y se conservó en refrigeración hasta antes de su uso.

Para la preparación de la solución del control positivo se colocó 5 mg de ácido ascórbico en un balón de aforo de 10 mL y se aforó con etanol al 96%, así se obtuvo una concentración de 500 ppm. El balón se envolvió en papel aluminio y se almacenó en refrigeración.

Se elaboró una solución madre de cada extracto en una proporción 1:10, para lo cual, se tomó 1 mL del extracto y se colocó en 9 mL de etanol al 96%.

3.8.1.2. Análisis en microplacas

Esta actividad se realizó dentro de una cámara de flujo con la luz apagada. Se evaluaron el ácido ascórbico y los tres extractos investigados, por triplicado, en microplacas de 96 pocillos, mediante la estructura establecida en el **Anexo 17.** La microplaca lista se envolvió con papel aluminio y se llevó a agitación durante 30 min a temperatura ambiente.

3.8.1.3. Determinación de la capacidad antioxidante

Para la lectura de las microplacas se utilizó un lector de placas de la marca *Thermo Scientific*. Se configuraron los parámetros correspondientes en el software *Gene5*,

conectado al lector de placas, para una medición de longitud de onda de 517 nm, con lo cual, se obtuvieron los valores de absorbancia de cada pocillo.

Para el procesamiento de la información se utilizó el programa Microsoft Excel donde se introdujeron las concentraciones de cada extracto y del ácido ascórbico, junto con sus respectivos valores de absorbancia, por triplicado. El análisis estadístico del ensayo se encuentra en el **Anexo 18.**, donde se emplea la **Ecuación 3.** para calcular el porcentaje de inhibición (Mencias & Salazar, 2018).

Fórmula para determinar el porcentaje de inhibición

$$\% \text{ Inhibición} = \left[\frac{ABS_{CN} - ABS_M}{ABS_{CN}} \right] * 100$$

Ecuación 3. Fórmula del porcentaje de inhibición

Nota: En la ecuación: % **Inhibición** (porcentaje de inhibición), **ABS_{CN}** (promedio de absorbancia del control negativo), **ABS_M** (promedio de absorbancia de la muestra) y **100** (factor matemático).

Tomado y modificado de: (Reyes et al., 2017)

3.9. Actividad antibacteriana

3.9.1. Antibiograma por el método de difusión en agar

3.9.1.1. Preparación de diluciones

La actividad antibacteriana se evaluó utilizando los tres extractos preparados al 30% o 0,3 g/mL (considerándolos como puros) y dos diluciones de cada uno. Para ello, se realizaron diluciones seriadas añadiendo 1 mL del extracto en 1 mL de etanol al 96%, esta fue la Dilución 1 (0,15 g/mL). Luego, se tomó 1 mL de la Dilución 1 y se añadió a 1 mL de etanol al 96%, esta fue la Dilución 2 (0,075 g/mL). El **Anexo 19.** representa un esquema del proceso de preparación de las diluciones.

3.9.1.2. Preparación del inóculo bacteriano

Para este estudio se emplearon cuatro bacterias: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) y

Streptococcus agalactiae, que fue provista por *Zurita & Zurita Laboratorios*. De cada cepa se tomó tres colonias con el asa y se colocaron en medio líquido TBS previamente esterilizado, esto se llevó a incubación a 37°C durante 24 h (Corzo, 2012).

3.9.1.3. Preparación del estándar de turbidez McFarland

El inóculo bacteriano se llevó a un valor de absorbancia entre 1,8 a 2, según la turbidez semejante al estándar McFarland, que corresponde aproximadamente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Esta escala se preparó centrifugando el inóculo bacteriano descrito en el punto **3.9.1.2**, a 3.000 rpm durante 3 min y descartando el sobrenadante. El pellet se rediluyó con solución salina hasta alcanzar el valor de absorbancia necesario, mismo que se leyó en un espectrofotómetro UV a 625 nm (Heredia et al., 2019).

3.9.1.4. Antibiograma

Se trabajó por duplicado en cajas Petri de 9 cm con medio Müller-Hinton, de acuerdo al diagrama del **Anexo 20**. y al esquema del **Anexo 21**.

3.9.1.5. Medición de halos de inhibición

Se realizaron cuatro medidas por cada halo (0°, 45°, 90° y 180°) utilizando un pie de rey, a partir de ello, se obtuvo el promedio de la medida del halo. Posteriormente, se hizo un promedio del duplicado para obtener un valor final. Cada valor se interpretó de acuerdo a la **Tabla 5.**, donde se presentan los grados de inhibición en función a los rangos.

Tabla 5. Grados y rangos de inhibición para extractos

Grados de inhibición	Rangos de diámetros	Interpretación
Pasivo	inferior a 7 mm	(-)
Relativamente activo	entre 7-9 mm	(1+)
Activo	entre 9-12 mm	(2+)
Muy Activo	superior a 12 mm	(3+)

Fuente: (Valian et al., 2023)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Recolección de muestras vegetales

4.1.1. Carpeta botánica y autenticación

En el **Anexo 22**, se puede observar el resultado de la identificación botánica de las especies *Cestrum peruvianum* y *Cynanchum microphyllum*, en ellas se incluyen las respectivas etiquetas informativas. El código de herbario correspondiente para el lechango es 4836 y sauco es 4837, mismos que fueron de importancia para la información de las muestras vegetales que se enviaron a secuenciar en la empresa *Macrogen Inc.*

4.2. Morfología

Se evaluó la macromorfología de hojas y tallos de *Cestrum peruvianum* y *Cynanchum microphyllum*. Los resultados se detallan en la **Tabla 6**, y las fotografías se muestran en el **Anexo 23**, y **Anexo 24**., respectivamente.

Tabla 6. Características macromorfológicas del sauco y lechango

Estructura	Características	Especies	
		<i>Cestrum peruvianum</i>	<i>Cynanchum microphyllum</i>
Tallos	Forma y Estructura	<ul style="list-style-type: none"> • Forma cilíndrica • Tallos erectos • Ramificación simpódica dicasio 	<ul style="list-style-type: none"> • Forma cilíndrica • Trepadores • Ramificaciones simpódicas dicasios • Látex en el interior
	Tamaño	<ul style="list-style-type: none"> • Grosor de tallos aumenta con los años 	<ul style="list-style-type: none"> • Varios metros de longitud • Grosor delgado
	Superficie	<ul style="list-style-type: none"> • Textura lisa • Sin vellosidades 	<ul style="list-style-type: none"> • Textura lisa • Ligera presencia de vellosidades
	Color	<ul style="list-style-type: none"> • Tonalidad verde en plantas jóvenes y café claro en plantas adultas 	<ul style="list-style-type: none"> • Tonalidad verde en plantas jóvenes y café claro en plantas adultas

	Modificaciones	<ul style="list-style-type: none"> No presenta modificaciones 	<ul style="list-style-type: none"> Presencia de tallos en forma de espiral
Hojas	Disposición	<ul style="list-style-type: none"> Alternas 	<ul style="list-style-type: none"> Opuestas
	Forma	<ul style="list-style-type: none"> Lanceoladas 	<ul style="list-style-type: none"> Lanceoladas
	Bordes	<ul style="list-style-type: none"> Enteros 	<ul style="list-style-type: none"> Enteros
	Ápice y Base	<ul style="list-style-type: none"> Ápice agudo Base atenuada 	<ul style="list-style-type: none"> Ápice agudo Base atenuada
	Superficie y textura	<ul style="list-style-type: none"> Superficie suave y glabra Textura gruesa y firme 	<ul style="list-style-type: none"> Superficie suave y glabra Textura delgada
	Color	<ul style="list-style-type: none"> Tonalidad verde brillante en el haz y verde claro en el envés. 	<ul style="list-style-type: none"> Tonalidad verde brillante en el haz y verde pálido en el envés.
	Venación	<ul style="list-style-type: none"> Pinnada Vena central sobresaliente y secundarias ligeramente visibles 	<ul style="list-style-type: none"> Pinnada Vena central sobresaliente y secundarias casi invisibles
	Peciolo	<ul style="list-style-type: none"> Corto y glabro 	<ul style="list-style-type: none"> Corto Ligera presencia de vellosidades
	Modificaciones	<ul style="list-style-type: none"> Presencia de estípulas 	<ul style="list-style-type: none"> No presenta modificaciones

Elaborado por: (Los autores, 2024)

La evaluación macromorfológica de las especies se elaboró en base al texto de Chunchu et al. (2019). La característica más relevante identificada en *Cestrum peruvianum* corresponde a que es una planta que crece y se desarrolla como un arbusto grande, con una altura de 1 a 3 m y posee tallos erectos ampliamente ramificados, descripción que coincide con Alva (2017) y Cerón & Quevedo (2002). Canal (2011), señala que las especies del género *Cestrum* presentan hojas dispuestas de manera alterna y son de tipo lanceoladas, ovadas o elípticas, en el caso de *Cestrum peruvianum*, las hojas son específicamente lanceoladas; adicionalmente, Alva (2017), destaca que el espécimen tiene hojas enteras, ápices agudos y bases atenuadas. Estas características convergen con los resultados de la **Tabla 7**. y permitieron que la especie sea fácilmente reconocida. Cabe mencionar que se observaron unas estructuras interesantes en la base del peciolo llamadas

estípulas, que son estructuras que suelen estar presentes solo en unas fases del desarrollo de las plantas, principalmente en etapas tempranas, que fueron las partes que se recolectaron para la investigación, mientras que, en etapas maduras están ausentes (Weberling, 2006). Dichas estructuras también se reportaron en el trabajo de Collaguazo & Márquez (2022).

Por otro lado, los principales atributos identificados para *Cynanchum microphyllum* coinciden con Peñafiel (2003), quien menciona que la planta es una enredadera que contine látex blanco en el interior de los tallos. Durante la colección de la planta, se observó que algunas zonas de los tallos presentan una forma en espiral, por lo tanto, el lechango se clasifica como una planta trepadora por enrollamiento, ya que dispone de mecanismos activos que le permiten enrollarse en soportes y seguir trepando para llegar a la luz del sol (Sharma & Shahzad, 2015). Con respecto a las hojas, Liede (1997), indica que su forma puede clasificarse como lanceoladas, pero también como lineales y que el patrón de ramificación es de tipo dicasio, lo que concuerda con el presente trabajo.

4.3. Control de calidad del material vegetal molido y los extractos

Se realizaron diferentes controles de calidad, tanto para las muestras vegetales (hojas de sauco, tallos de sauco y planta completa de lechango) que fueron molidas, como para sus respectivos extractos, obtenidos a partir del proceso de maceración con etanol al 96%. Estos datos se muestran resumidos en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Resultados del control de calidad de muestras molidas y de sus extractos

Muestra		Tamaño de partícula [µm]	% de Humedad	Índice de refracción	pH	Densidad [g/mL]	Sólidos Totales [g/mL]
Molido	Hojas	90	5,97				
	Tallos	180	4,84				
	Lechango	180	3,04				
Extracto	Hojas			1,37	6,49	0,96	0,019
	Tallos			1,37	6,50	0,95	0,028
	Lechango			1,37	5,94	0,87	0,161

Nota: Se muestran los valores de los parámetros de control de calidad para cada muestra molida seca (tamaño de partícula y % de humedad) y para cada extracto (índice de refracción, pH, densidad y sólidos totales). El color gris en los casilleros indica que no se realizó el control de calidad en ese tipo de muestra.

Elaborado por: (Los autores, 2024)

Los parámetros de calidad evaluados para las muestras vegetales molidas fueron el tamaño de partícula y el porcentaje de humedad. Con respecto al tamaño de partícula, para las hojas de sauco fue de 90 µm, valor que se clasifica como muy fino al ser menor o igual a 125 µm, según lo establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en los métodos de control de calidad para plantas medicinales. Por otro lado, el tamaño de partícula del molido de tallos de sauco y de planta completa de lechango fue de 180 µm, que pertenece a un tamaño de partícula fino (World Health Organization., 1998). Los valores mencionados permitieron una extracción más eficiente, ya que, mientras más fina es una partícula, existe una mayor relación de superficie-volumen y los compuestos que se encuentran en las plantas entran en contacto de forma más rápida con el solvente (etanol 96%) para su liberación (Chatterjee & Mukherjee, 2021). En cuanto al porcentaje de humedad, los resultados establecen que ninguna de las muestras superó el 12%, valor que se corresponde al límite de cantidad de agua permitida en plantas medicinales por la Farmacopea Europea (Council of Europe, 2013). Los tratamientos de selección, limpieza y desinfección previa del material vegetal, así como el adecuado proceso de secado y

molienda, permitieron contar con un material molido óptimo para la elaboración de los extractos alcohólicos.

En el control de calidad de los extractos, se examinó el índice de refracción, el pH, la densidad y los sólidos totales; mismos que se compararon con las normativas de la Farmacopea Europea del año 2013. Generalmente, el índice de refracción para plantas medicinales debe estar entre 1,33 a 1,5, en este caso, los tres extractos tuvieron un valor de 1,37. Respecto al pH, todos los extractos cumplieron con la farmacopea, pues el rango aceptado es de 4,0 a 7,5. Por otra parte, los valores de densidad fueron levemente más altos que la densidad del etanol al 96%, lo que se explica porque los extractos contienen compuestos que fueron extraídos durante la maceración. Finalmente, los valores de sólidos totales en los extractos fueron de 0,019, 0,028 y 0,161 g/mL para hojas de sauco, tallos de sauco y planta completa de lechango, respectivamente. Los parámetros evaluados aseguraron la calidad y consistencia de los extractos para los análisis de las actividades toxicológica, antioxidante y antibacteriana.

4.4. Tamizaje fitoquímico

Los resultados del tamizaje de cada extracto, con sus interpretaciones, se presentan en la **Tabla 8.**, mientras que las fotografías pueden ser visualizan en el **Anexo 25.**

Tabla 8. Resultados del Tamizaje Fitoquímico de los extractos

Metabolito	Ensayo	Extractos			Interpretación
		Hojas	Tallos	Lechango	
Alcaloides	Ensayo Dragendorff	+++	+++	+++	(+++) Precipitado (++) Turbidez (-) Sin cambios
	Ensayo Wagner	+++	+++	+++	(+++) Precipitado (++) Turbidez (-) Sin cambios
Saponinas	Ensayo de espuma	+	-	-	(+) Espuma > 2 mm durante mínimo 2 min (-) Espuma < 2 mm durante menos de 2 min
Flavonoides	Ensayo Shinoda	+	+	-	(+) Color amarillo o rojo (-) Color normal
Fenoles y Taninos	Ensayo de cloruro férrico	-	-	+	(+++) Color rojo: fenoles (++) Color azul: taninos pirogálicos (+) Color verde: taninos catéquicos
Resinas	Ensayo de precipitación	-	-	-	(+) Precipitado (-) Sin precipitado
Quinonas	Ensayo Borntrager	-	-	-	(+++) Color rojo (++) Color rosado (-) Sin cambios
Triterpenos y esteroides	Ensayo Liberman Burchard	+++	++	++	(+++) Color verde intenso u oscuro (++) Color verde (+) Color rosado o azul
Catequinas	Ensayo carbonato de sodio	+	-	+	(+) Margen color café o verdoso (-) Sin margen color café o verdoso
Cumarinas	Ensayo Baljet	-	-	-	(+++) Precipitado rojo (++) Color rojo (-) Sin cambios
Heterósidos cardiotónicos	Ensayo de Kedde	-	-	-	(+) Color morado o violeta (-) Sin cambios

Se realizó el tamizaje fitoquímico cualitativo para los extractos de hojas y tallos de *Cestrum peruvianum* y para la planta completa de *Cynanchum microphyllum*. En el

extracto de hojas de sauco se encontró la presencia de alcaloides, saponinas, flavonoides, triterpenos y esteroides, y catequinas. Por otro lado, en el extracto de tallos de sauco se evidenciaron alcaloides, flavonoides, triterpenos y esteroides. Un estudio también evidenció la presencia de compuestos fenólicos, saponinas, triterpenos y esteroides, en extractos de distintas especies del género *Cestrum*, los cuales son relevantes pues tienen acción antiinflamatoria (Bezerra et al., 2023). Además, se ha identificado que las especies *C. elegans*, *C. nocturnum* y *C. diurnum*, contienen compuestos bioactivos (alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos y ácidos fenólicos) durante todo el año (Haggag, 2022; Nasr et al., 2021).

El tamizaje realizado para el extracto de lechango, demostró la presencia de compuestos fitoquímicos como: alcaloides, fenoles y taninos, triterpenos y esteroides, y catequinas. Otros estudios realizados para el género *Cynanchum* (*C. bungei*, *C. paniculatum*, y *C. atratum*) han evidenciado la presencia de metabolitos como alcaloides, esteroides y triterpenos, los cuales son de gran importancia debido a su potencial antimicrobiano, antioxidante y antiinflamatorio (Han et al., 2018; Zhang et al., 2022; Zhou et al., 2020).

Se debe considerar que los ensayos fitoquímicos cualitativos son valiosos para detectar compuestos de forma preliminar, pues son sencillos, rápidos y poco costosos, sin embargo, pueden presentar limitaciones respecto a la sensibilidad y especificidad, por lo que es importante realizar dos o más pruebas diferentes o emplear técnicas cuantitativas que sustenten los resultados previos (Shaikh & Patil, 2020).

Finalmente, es importante señalar que la elección del solvente, el método de extracción, la temperatura, la presión y diferentes dinámicas durante el proceso

extractivo, pueden alterar drásticamente el contenido de ciertos metabolitos (Lakshmanan, 2022; Mróz et al., 2023), por lo cual, se debe trabajar conforme a los parámetros más adecuados dependiendo del objetivo de la investigación.

4.5. Análisis molecular

Los resultados del análisis molecular se encuentran en la **Tabla 9.**, que incluye una lista de los 10 porcentajes de identidad más altos de los alineamientos individuales entre las secuencias consultadas (sauco y lechango) y cada secuencia de la base de datos del NCBI. El porcentaje de identidad se refiere al porcentaje de posiciones en el alineamiento donde las bases nitrogenadas son idénticas entre las dos secuencias (Torkian et al., 2020).

Tabla 9. Resultados de la herramienta BLAST para Sauco y Lechango

Marcador <i>matK</i>					
Sauco (4837)			Lechango (4836)		
Familia	Especie	Identidad (%)	Familia	Especie	Identidad (%)
Solanaceae	<i>Cestrum roseum</i>	96,95	Apocynaceae	<i>Orthosia scoparia</i>	99,54
Solanaceae	<i>Cestrum parqui</i>	96,95	Apocynaceae	<i>Metastelma myrtifolium</i>	99,04
Solanaceae	<i>Cestrum macrophyllum</i>	96,95	Apocynaceae	<i>Metastelma northropiae</i>	98,92
Solanaceae	<i>Cestrum laevigatum</i>	96,95	Apocynaceae	<i>Tassadia propinqua</i>	98,92
Solanaceae	<i>Cestrum glanduliferum</i>	96,95	Apocynaceae	<i>Barjonia chlorifolia</i>	98,91
Solanaceae	<i>Cestrum fragile</i>	96,95	Apocynaceae	<i>Ditassa hastata</i>	98,90
Solanaceae	<i>Cestrum diurnum</i>	96,95	Apocynaceae	<i>Ditassa burchellii</i>	98,90
Solanaceae	<i>Cestrum conglomeratum</i>	96,95	Apocynaceae	<i>Ditassa hispida</i>	98,75
Solanaceae	<i>Cestrum bracteatum</i>	96,95	Apocynaceae	<i>Diplolepis geminiflora</i>	98,62
Solanaceae	<i>Cestrum nocturnum</i>	96,47	Apocynaceae	<i>Ditassa banksii</i>	98,60

Elaborado por: (Los autores, 2024)

Se puede observar que, para el sauco, se obtuvieron porcentajes de identidad muy altos, siendo la mayoría del 96,95%. Aunque ninguna secuencia de las especies concordó con *Cestrum peruvianum*, todas son de la familia Solanaceae y del género *Cestrum*. Esto permite corroborar, de forma molecular, la taxonomía de esta especie presentada en el estudio de León (2010).

En el caso del lechango, se obtuvieron porcentajes de identidad bastante cercanos al 100%. A pesar de que las secuencias no coincidieron con *Cynanchum microphyllum*, todas las especies pertenecen a la familia Apocynaceae. Respecto al género *Cynanchum*, hubo once coincidencias, donde el porcentaje de identidad más alto fue 97,93% para *C. ascyrifolium*, sin embargo, estas especies no se incluyeron en la **Tabla 9**. porque no estuvieron dentro de los 10 primeros porcentajes. Esto permitió conocer a nivel molecular que *Cynanchum microphyllum* Kunth pertenece a la familia Apocynaceae, lo que concuerda con su taxonomía según de la Torre et al. (2008).

4.6. Actividad toxicológica

Los datos recopilados del número de nauplios muertos de *Artemia salina* con cada concentración de los extractos (2.000, 1.000, 500 y 250 ppm) y los cálculos pertinentes, se muestran en el **Anexo 26**. A partir de ello estos, se realizaron las respectivas gráficas Probit VS Log(Concentración) para los extractos de hojas y tallos de sauco, y planta completa de lechango (**Anexo 27.**, **Anexo 28.** y **Anexo 29.**, respectivamente). En todas las gráficas se incluyeron las ecuaciones de las líneas de tendencia y los valores de R^2 , mismos que se utilizaron para el cálculo de cada CL_{50} . En las tres gráficas se observó que, a medida que aumenta el logaritmo de la concentración, aumenta el valor Probit, esto

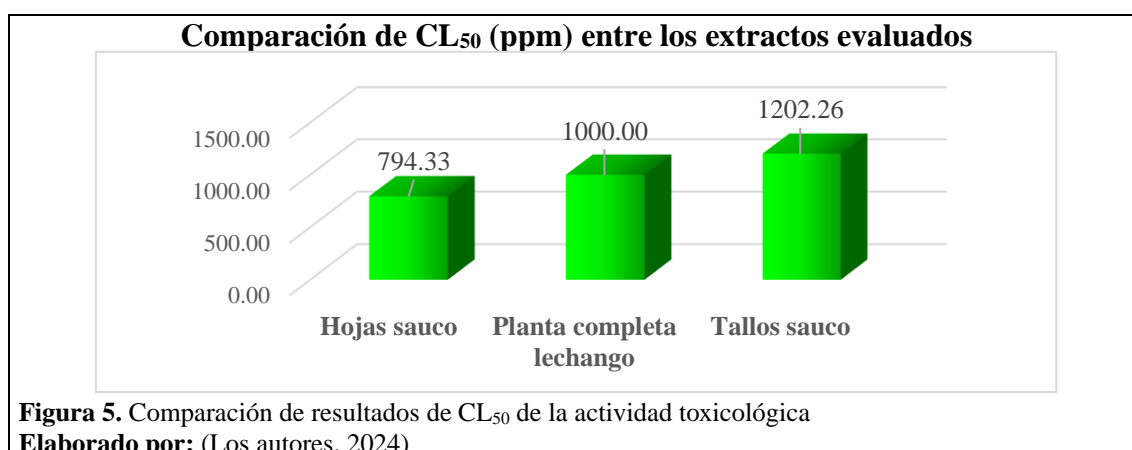
quiere decir que la concentración de los extractos tiene una relación directamente proporcional respecto al porcentaje de mortalidad de los nauplios de *Artemia salina*.

En la **Tabla 10**, se indican los valores obtenidos de la CL_{50} para los extractos de hojas y tallos de sauco y para el extracto de planta completa de lechango.

Tabla 10. Resultados de la CL_{50} de la actividad toxicológica

Extracto	CL_{50} (ppm)	Nivel de toxicidad
Hojas de <i>Cestrum peruvianum</i>	794,33	Ligeramente tóxico
Tallos de <i>Cestrum peruvianum</i>	1.202,26	Prácticamente no tóxico
<i>Cynanchum microphyllum</i>	1.000,00	Prácticamente no tóxico a Ligeramente tóxico

Los resultados de la concentración letal media (CL_{50}) reflejan que, de los tres extractos evaluados, el más tóxico fue el de hojas de sauco, ya que, con una concentración de 794,33 ppm, pudo provocar la muerte del 50% de los nauplios, considerándose ligeramente tóxico. En segundo lugar, está el extracto de lechango, mismo que se encuentra en el límite de prácticamente tóxico a ligeramente tóxico, al tener un CL_{50} igual a 1.000 ppm. Finalmente, el extracto de tallos de sauco es el menos tóxico, debido a que se encuentra catalogado como prácticamente no tóxico, con un valor de CL_{50} de 1.202,26 ppm (Sinti & Torres, 2017). Estas comparaciones se resumen en la **Figura 5**.



Se puede notar que, a pesar de que los extractos de hojas y tallos pertenecen a la misma especie (*Cestrum peruvianum*), las hojas han manifestado un nivel de toxicidad más alto. Esto se explica porque las diferentes partes de una planta tienen funciones específicas y, por lo tanto, sus componentes fitoquímicos varían (Hao et al., 2022); en esta investigación se encontró que las hojas de sauco presentaron saponinas, mientras que los tallos no. Se ha determinado que algunos tipos de saponinas pueden ser tóxicos para los humanos debido a su actividad hemolítica (Nguyen et al., 2020), además, las saponinas pueden matar o sedar a protozoarios, moluscos y peces, dependiendo del tipo y las cantidades (Purbosari et al., 2022). Por este motivo, se puede decir que la presencia de saponinas influye para que el extracto de hojas tenga un nivel de toxicidad más alto.

En un estudio realizado por Oktavia et al. (2021), en Indonesia, se evaluó la toxicidad de plantas con flores amarillas, rojas y moradas, pertenecientes a la especie *Cestrum elegans*, para ello, se elaboraron extractos etanólicos de hojas de las diferentes plantas y se llevó a cabo la prueba de letalidad con *Artemia salina*, los resultados de la CL₅₀ mostraron que dichos extractos también tienen niveles bajos de toxicidad. Otra investigación en Indonesia, encontró que el extracto etanólico de *Cestrum nocturnum* tiene el potencial de ser tóxico para *Artemia salina* porque el valor de CL₅₀ es inferior a 1000 ppm, al igual que el extracto de hojas de sauco del presente estudio (Faramayuda et al., 2014). Por último, en un artículo peruano, se concluyó que el extracto etanólico al 96% de hojas de *Cestrum buxifolium* tuvo una CL₅₀ de 152 ppm, es decir, fue moderadamente tóxico (Torres & Ganoza, 2017).

En el caso del género *Cynanchum*, existe información casi nula sobre su uso clínico y su actividad toxicológica, principalmente en *Artemia salina*; sin embargo, se

encontraron dos estudios de los efectos tóxicos de alcaloides extraídos de *Cynanchum komarovii* y *Cynanchum mongolicum* en insectos, donde se concluyó que dichos compuestos de ambas especies presentaron buena actividad como insecticidas (Ge et al., 2015; Guo et al., 2014).

4.7. Actividad antioxidante

Se evaluó la actividad antioxidante de los extractos de hojas y tallos de *Cestrum peruvianum*, del extracto de la planta completa de *Cynanchum microphyllum* y del ácido ascórbico, a través del método DPPH, por triplicado. Las concentraciones de cada extracto y del ácido ascórbico, sus respectivas absorbancias medidas a 517 nm y los cálculos correspondientes, se encuentran a detalle en el **Anexo 30**.

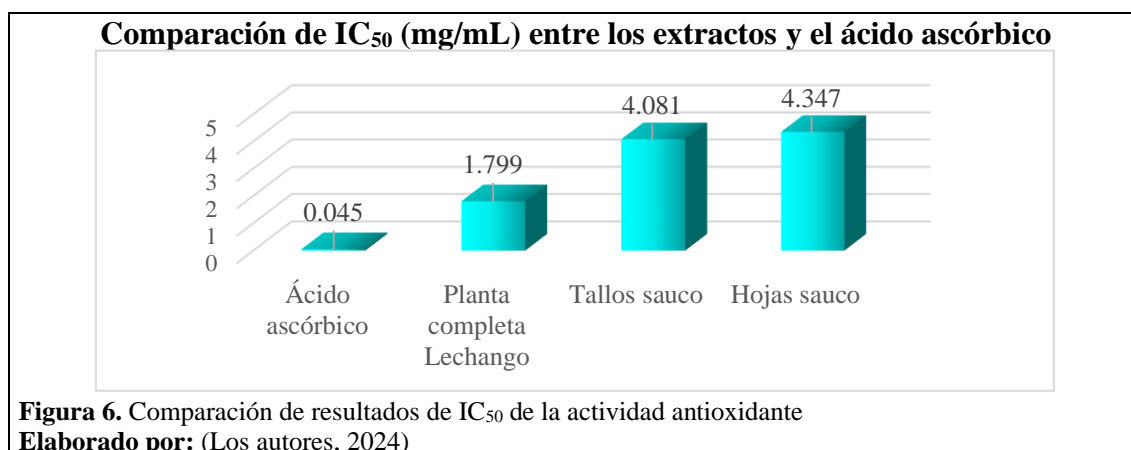
Mediante los datos mencionados, se construyeron las gráficas % Inhibición VS Log(Concentración) para los extractos de hojas de sauco, tallos de sauco y planta completa de lechango, y para el ácido ascórbico (**Anexo 31.**, **Anexo 32.**, **Anexo 33.** y **Anexo 34.**, respectivamente). Todas las gráficas contienen las ecuaciones de las líneas de tendencia y los valores de R^2 generados por Excel, los cuales se emplearon para el cálculo de cada IC_{50} . En las gráficas se puede evidenciar una relación directamente proporcional entre la variable de las abscisas y la variable de las ordenadas, lo que significa que, a medida que aumenta la concentración de las muestras evaluadas, aumenta el porcentaje de inhibición de los radicales libres (DPPH), lo que se evidenció en el análisis por la identificación del color en los pocillos de las microplacas que cambió de morado a naranja y/o amarillo (**Anexo 35.**).

En la **Tabla 11**, se indican los valores obtenidos de la IC_{50} para los extractos de hojas y tallos de sauco, para el extracto de lechango y para el ácido ascórbico.

Tabla 11. Resultados de la IC₅₀ de la actividad antioxidante

Extracto	IC ₅₀ (mg/mL)
Hojas de <i>Cestrum peruvianum</i>	4,347
Tallos de <i>Cestrum peruvianum</i>	4,081
Planta completa de <i>Cynanchum microphyllum</i>	1,799
Ácido ascórbico	0,045

Los resultados de la concentración inhibitoria media (IC₅₀) muestran que, el ácido ascórbico, con una IC₅₀ de 0,045 mg/mL, tiene una actividad antioxidante muy alta, debido a que es un estándar reconocido por su fuerte capacidad antioxidante (Gegotek & Skrzydlewska, 2022). Por otra parte, de los tres extractos analizados, el que tiene una actividad más eficaz es el de lechango, ya que obtuvo el valor de IC₅₀ más bajo (1,799 mg/mL). Respecto a los extractos de hojas y tallos de sauco, se obtuvieron valores muy cercanos de la IC₅₀, que fueron 4,347 y 4,081 mg/mL, respectivamente, de los cuales, se establece que el extracto de tallos tuvo una actividad levemente más antioxidante (**Figura 6.**).



Se han realizado algunos análisis del potencial antioxidante en el género *Cestrum*. Por ejemplo, Al-Reza et al. (2010), evaluaron la actividad inhibitoria del radical DPPH del aceite esencial y extractos de metanol, acetato de etilo y cloroformo de *Cestrum nocturnum*, concluyendo que el aceite esencial y el extracto de metanol tuvieron una

actividad notable para inhibir los radicales libres. Otra investigación con *C. nocturnum* coincide en que el extracto metanólico de sus hojas muestra el mayor potencial antioxidante (Ahmad et al., 2023). Por otro lado, en el artículo de Manzoor et al. (2020), se comparó el efecto antioxidante de los extractos metanólicos de hojas y tallos de *Cestrum nocturnum* y *Cestrum diurnum*, encontrando que los extractos de tallos y hojas de *C. diurnum* tuvieron una actividad antioxidante más alta, ya que su potencial antioxidante fue de 89% y 88%, respectivamente, además, destacan que este potencial fue incluso más alto que el del ácido ascórbico (81%).

Con respecto al género *Cynanchum*, al igual que en esta investigación, en el estudio de Demir et al. (2011) el extracto etanólico de *C. acutum* demostró tener la mayor actividad antioxidante en comparación a las otras especies examinadas (*Cionura erecta* y *Trachomitum venetum*), aunque no superó la acción del ácido ascórbico. Por otra parte, Wu et al. (2019), descubrieron que los extractos de acetato de etilo de las raíces de las especies *C. wilfordii* y *C. bungei*, también han mostrado una buena actividad antioxidante.

Se conoce que los fenoles y flavonoides son dos grupos de metabolitos secundarios que revelan un alto potencial antioxidante contra los radicales libres (Adebayo et al., 2018). Ambos extractos de sauco contienen flavonoides, mientras que, el extracto de lechango contiene fenoles, esto indica que las especies usadas en conjunto pueden ayudar a disminuir la formación de radicales libres y el estrés oxidativo que se produce en las ubres de las vacas por la mastitis, promoviendo desinflamación y la recuperación de los tejidos perjudicados (Yang & Li, 2015).

4.8. Actividad antibacteriana

Los resultados de la actividad antibacteriana se detallan en la **Tabla 12.** y **Anexo 36.** para las bacterias Gram Positivas y en la **Tabla 13.** y **Anexo 37.** para las bacterias Gram Negativas.

Tabla 12. Resultados de la actividad antibacteriana en bacterias Gram Positivas

Bacterias Gram Positivas										
Bacterias	<i>Staphylococcus aureus</i>					<i>Streptococcus agalactiae</i>				
Extractos	A	C	E	D1	D2	A	C	E	D1	D2
Hojas	3+	-	1+	-	-	3+	-	2+	2+	1+
Tallos		-	1+	-	-		-	2+	2+	1+
Lechango		-	1+	1+	1+		-	2+	2+	2+

Nota: En la tabla se especifican los grados de inhibición de los extractos de Hojas, Tallos y Lechango, y sus respectivas diluciones frente a bacterias Gram positivas. Los rangos de diámetros son: Pasivo (inferior a 7 mm (-)), Relativamente activo (entre 7-9 mm (1+)), Activo (entre 9-12 mm (2+)) y Muy Activo (superior a 12 mm (3+)).

Elaborado por: (Los autores, 2024)

Tabla 13. Resultados de la actividad antibacteriana en bacterias Gram Negativas

Bacterias Gram Negativas										
Bacterias	<i>Escherichia coli</i>					<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
Extractos	A	C	E	D1	D2	A	C	E	D1	D2
Hojas	3+	-	1+	1+	-	3+	-	1+	-	-
Tallos		-	1+	1+	-		-	1+	-	-
Lechango		-	1+	1+	1+		-	1+	1+	1+

Nota: En la tabla se especifican los grados de inhibición de los extractos de Hojas, Tallos y Lechango, y sus respectivas diluciones frente a bacterias Gram negativas. Los rangos de diámetros son: Pasivo (inferior a 7 mm (-)), Relativamente activo (entre 7-9 mm (1+)), Activo (entre 9-12 mm (2+)) y Muy Activo (superior a 12 mm (3+)).

Elaborado por: (Los autores, 2024)

En la **Tabla 12.** y **Tabla 13.,** se pudo observar que los extractos de hojas y tallos de sauco presentaron una acción antibacteriana de relativamente activa (1+) a pasiva (-), frente a *S. aureus* (Gram +), *E. coli* y *P. aeruginosa* (Gram -), a medida que la concentración del extracto disminuyó. Esto coincide con la investigación realizada por Jerves et al. (2014), donde *Cestrum peruvianum* tuvo una inhibición limitada contra *S. aureus*, además, Bussmann et al. (2010), menciona que los extractos etanólicos de *Cestrum auriculatum*, tuvieron una actividad antibacteriana nula frente a *E. coli* y *S.*

aureus, mientras que los extractos acuosos tuvieron una actividad limitada contra las mismas bacterias. Otros estudios han demostrado que los extractos metanólicos de *Cestrum nocturnum*, poseen actividad antimicrobiana frente a las mismas cepas bacterianas, debido a la presencia de compuestos bioactivos como: alcaloides, saponinas, fenoles, flavonoides y taninos (Prasad et al., 2013; Punjabi et al., 2015).

En la **Tabla 12.**, también se evidencia que los extractos de tallos y hojas de sauco generaron una acción antibacteriana de activa (2+) a relativamente activa (1+) frente a *Streptococcus agalactiae* (Gram +). La actividad antibacteriana de *C. peruvianum* contra a *S. agalactiae* es un área inexplorada; sin embargo, algunas especies del mismo género como *C. elegans*, *C. nocturnum* y *C. parqui*, han puesto en manifiesto que la presencia elevada de compuestos bioactivos como saponinas, alcaloides y fenoles, contribuyen a actividades antibacterianas frente a una serie de patógenos, entre ellos están *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Proteus vulfaris*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y algunas especies del género *Streptococcus* (Ali Khan et al., 2011; Padilla et al., 2021). Si bien hacen falta datos específicos sobre *Cestrum peruvianum*, las estrechas relaciones fitoquímicas dentro del género *Cestrum*, sugieren que el sauco puede poseer mayores propiedades antibacterianas al utilizar otro tipo de solventes para elaborar los extractos como el metanol.

De la misma forma, la **Tabla 12.** y **Tabla 13.** evidencian que el extracto de lechango presenta una acción antibacteriana relativamente activa (1+), en todas sus diluciones, frente a *S. aureus* (Gram +), *E. coli* y *P. aeruginosa* (Gram -). En contraposición, el extracto muestra una acción antibacteriana activa (2+) frente a *S. agalactiae* (Gram +). Los estudios de esta especie son muy limitados o incluso escasos;

sin embargo, en una investigación sobre la actividad antimicrobiana de *Cynanchum acutum*, se encontró que los extractos elaborados con etanol al 90% mostraron buenos efectos antimicrobianos contra *S. aureus* (25 mm), *B. subtilis* (20 mm), *P. aeruginosa* (17 mm), *P. vulgaris* (15 mm) y *E. coli* (15 mm) (Dehghani et al., 2012). En contraste, en otro estudio se encontró que los extractos etanólicos de *Cynanchum acutum* resultaron ser relativamente activos contra *E. coli* ATCC 25922, pero no hubo inhibición frente a las demás bacterias evaluadas (*E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. fecalis* ATCC 292112, *B. cereus* NRLLB-3008, *B. subtilis* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923, *C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 13803) (Demir et al., 2011).

Los resultados revelaron que todos los extractos poseen una actividad antibacteriana activa sobre *S. agalactiae*. Este patógeno es uno de los causantes más comunes de la mastitis en el ganado vacuno, provocando diferentes afecciones a los ejemplares y pérdidas económicas (Ma et al., 2023; Torres et al., 2023). Por este motivo, se considera favorable la posibilidad de utilizar ambas especies (sauco y lechango) para el desarrollo de fitofármacos antibacterianos de uso veterinario, para su aplicación como tratamiento en la mastitis bovina.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se recolectaron dos especies vegetales empleadas en el área de la etnoveterinaria para el tratamiento de la mastitis bovina, en la comunidad de Paquiestancia, las cuales fueron *Cynanchum microphyllum* Kunth (Lechango) y *Cestrum peruvianum* Willd ex Roem. & Schult. (Sauco). A raíz de ello, se logró la identificación de la taxonomía y características específicas de cada especie, mediante la evaluación macromorfológica y el análisis molecular con la herramienta BLAST. Por un lado, el sauco es un espécimen reconocible porque es un arbusto grande con tallos erectos, cuyas hojas son lanceoladas y pertenece a la familia Solanaceae. Mientras que, el lechango, perteneciente a la familia Apocynaceae, se caracteriza por ser trepador y contener látex en su interior.

La implementación del control de calidad tanto para el material molido como para los extractos fue un paso inicial fundamental, ya que permitió demostrar la importancia de adherirse a los parámetros establecidos en las farmacopeas vigentes. Posterior a ello, se realizó el tamizaje fitoquímico de forma cualitativa de los tres extractos alcohólicos, mediante el cual se dictaminó que los metabolitos encontrados en cada extracto están estrechamente relacionados con su aplicación etnoveterinaria, debido a que poseen propiedades antibacterianas, antioxidantes y antiinflamatorias, las cuales resultan beneficiosas en el tratamiento de la mastitis bovina.

Los resultados de la prueba toxicológica frente a *Artemia salina* demostraron que los tres extractos etanólicos podrían considerarse como una fuente prometedora para el desarrollo de fitofármacos contra la enfermedad de la mastitis en ganado vacuno, al tener valores de toxicidad de prácticamente no tóxico a ligeramente tóxico.

En la actividad antioxidante se determinó que, el extracto de lechango posee un potencial considerable para contrarrestar la formación de radicales libres, al tener un valor de IC₅₀ igual 1,799 mg/mL, en comparación con los otros dos extractos, sin embargo, ninguno superó el potencial del ácido ascórbico (0,045 mg/mL). Esto comprueba que el uso de *C. microphyllum*, como parte del emplasto que se aplica en las ubres de las vacas, funciona favorablemente para curar la mastitis del ganado, pues sus propiedades antioxidantes están involucradas en la desinflamación y curación de las zonas afectadas.

Finalmente, los extractos de hojas y tallos de sauco y planta completa de lechango presentaron una acción antibacteriana activa (2+), en concentraciones del 30 y 15% frente a *Streptococcus agalactiae*, una bacteria estrechamente vinculada en el desarrollo de la mastitis, por lo que, nuevamente se recomienda el uso de ambas especies dentro de formulaciones veterinarias dirigidas al tratamiento de la mastitis en vacas.

Para futuras investigaciones se sugiere evaluar la actividad toxicológica, antioxidante, antibacteriana y, adicionalmente, antiinflamatoria, con diferentes métodos de extracción y solventes, y en distintas épocas de recolección, para determinar cuál de ellos puede tener las mejores propiedades terapéuticas para la mastitis bovina. Además, se propone efectuar un análisis fitoquímico cuantitativo para conocer, de forma precisa, la cantidad de los principios activos que han sido identificados en las especies estudiadas. Por último, se recomienda elaborar árboles filogenéticos de cada especie, para entender sus relaciones evolutivas a mayor profundidad y tener una visión más clara de su taxonomía, principalmente del lechango, que es un espécimen con información limitada.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adebayo, I., Arsad, H., & Samian, M. (2018). Total phenolics, total flavonoids, antioxidant capacities, and volatile compounds gas chromatography-mass spectrometry profiling of *Moringa oleifera* ripe seed polar fractions. *Pharmacognosy Magazine*, 14(54), 191–194. https://doi.org/10.4103/pm.pm_212_17
- Agrawal, R., & Nirmal, N. (2024). *Technologies for Extraction of Bioactive Compounds and Its Applications*. In: Sarkar, T., Pati, S. (eds) *Bioactive Extraction and Application in Food and Nutraceutical Industries. Methods and Protocols in Food Science*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3601-5>
- Aguirre, Z., Aguirre, N., & Muñoz, J. (2017). Biodiversidad de la provincia de Loja, Ecuador. *Arnaldoa*, 24(2), 523–542. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.242.24206>
- Ahmad, S., Alrouji, M., Alhajlah, S., Alomeir, O., Pandey, R., Ashraf, M., Ahmad, S., & Khan, S. (2023). Secondary Metabolite Profiling, Antioxidant, Antidiabetic and Neuroprotective Activity of *Cestrum nocturnum* (Night Scented-Jasmine): Use of In Vitro and In Silico Approach in Determining the Potential Bioactive Compound. *Plants*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/plants12061206>
- Alejos, P., Aragón, M., & Cornejo, A. (2014). Extracción y purificación de ADN. In A. Cornejo, A. Serrato, B. Rendón, & M. Rocha (Eds.), *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología* (Primera edición, pp. 1–27).
- Alfonso, Y., Noriega, C., Isidró, M., Andraca, L., Alfonso, D., & Rodríguez, D. (2016). Optimization of the protocols of extraction of ADN and of the molecular marker type RAPD in Anonáceas. *Cultivos Tropicales*, 37(especial), 91–98. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3356.1207>
- Ali Khan, M., Khan Abdul Wali Khan, H., Inayat, H., Khan, H., Saeed, M., & Khan, I. (2011). Antimicrobial activities of the whole plant of *Cestrum nocturnum* against pathogenic microorganisms. *Article in African Journal of Microbiology Research*, 5(6), 612–616. <https://www.researchgate.net/publication/268427979>
- Al-Reza, S., Rahman, A., Cho, Y., & Kang, S. (2010). Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oil and Organic Extracts of *Cestrum nocturnum* L. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13(5), 615–624. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/0972060X.2010.10643871>
- Alva, E. (2017). *Etnobotánica y características morfológicas de la vegetación leñosa en un remanente de bosque de la microcuenca río grande, La Encañada-Cajamarca*. [Tesis de grado, Universidad Nacional de Cajamarca]. https://www.academia.edu/81078811/Etnobot%C3%A1nica_y_caracter%C3%ADsticas_morfol%C3%B3gicas_de_la_vegetaci%C3%B3n_le%C3%B1osa_en_un_remanente_de_bosque_de_la_microcuenca_r%C3%ADo_grande_La_Enca%C3%B1ada_Cajamarca

- Amaringo, F., Hormaza, A., & Arias, M. (2011). Thevetin B: glicósido cardiotónico predominante en thevetia peruviana. *Scientia et Technica Año XVI*, 49.
- Angarita, M., Torres, M., & Díaz, A. (2017). Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16(5), 796–807. <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/1651AGRADECIMIENTOS>
- Armas, G. (2012). *Estudio de la actividad antibacteriana y tóxica del kuiship (Jacaranda copaia)* [Tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/4074/1/UPS-QT02908.pdf>
- Arnelas, I., Invernón, V., de la Estrella, M., López, E., & Devesa, J. (2012). Manual de laboratorio de Botánica. El herbario. Recolección, procesamiento e identificación de plantas vasculares. *Reduca (Biología). Serie Botánica*, 5(2), 15–24. <https://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/1014>
- Aruna, T., Hemalatha, G., Vellaikumar, S., Kanchana, S., & Kumutha, K. (2022). Hydrodistillation and Soxhlet Method of Extraction and Analyses of Chemical Composition of Citrus Peel Essential Oil. *Madras Agricultural Journal*, 109(Special). <https://doi.org/10.29321/MAJ.10.000627>
- Avellán, R., Zambrano, M., De la Cruz, L., Cedeño, C., Delgado, M., Rezabala, P., & Macías, Y. (2019). Prevalencia de mastitis subclínica en el ganado bovino, mediante la prueba California Mastitis Test, en el cantón Rocafuerte de la provincia de Manabí, Ecuador. *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología*, 8(1), 62–70. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7177567>
- Avilés, N., & Medina, A. (2022). *Comparación de la Prueba California Mastitis Test y Tarro De Fondo Oscuro en el diagnóstico de mastitis subclínica en bovinos lecheros del cantón Cuenca de la provincia del Azuay* [Tesis de grado, Universidad de Guayaquil]. <https://repositorio.ug.edu.ec/server/api/core/bitstreams/05cf16e0-daa9-46aa-a3eb-41d242817975/content>
- Balarezo, K., & Poveda, M. (2018). *Determinación del perfil sanitario del ganado bovino en la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”, Provincia Bolívar - Ecuador*. [Tesis de grado, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/15856/1/T-IASA%20I-005466.pdf>
- Ballesteros, J., & Valdivieso, A. (2018). *Estudio de la problemática epidemiológica de la mastitis bovina en el cantón Cayambe* [Tesis de Grado, Universidad Politécnica Salesiana]. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15261>
- Banti, C., & Hadjikakou, S. (2021). Evaluation of toxicity with brine shrimp assay. *Bio-Protocol*, 11(2). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3895>
- Batiha, G., Beshbishy, A., Alkazmi, L., Adeyemi, O., Nadwa, E., Rashwan, E., El-Mleeh, A., & Igarashi, I. (2020). Gas chromatography-mass spectrometry analysis,

- phytochemical screening and antiprotozoal effects of the methanolic viola tricolor and acetonetic laurus nobilis extracts. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12906-020-2848-2/FIGURES/6>
- Benítez, R., Sarria, R., Gallo, J., Pérez, N., Álvarez, J., & Giraldo, C. (2020). Obtención y rendimiento del extracto etanólico de dos plantas medicinales. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 15(1), 31–40. <https://doi.org/10.18359/RFCB.3597>
- Bezerra, J. J. L., Pinheiro, A. A. V., & Lucena, R. B. de. (2023). Poisoning in ruminants caused by species of the genus *Cestrum* L. (Solanaceae) in Brazil: A review of toxicological and phytochemical evidence. *Toxicon*, 236, 107348. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2023.107348>
- Bhatla, S. (2018). *Plant Physiology, Development and Metabolism* (1st ed.). Springer Nature Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-2023-1>
- Bonifaz, N., & Conlago, F. (2016). Prevalencia e incidencia de mastitis bovina mediante la prueba de California Mastitis Test con identificación del agente etiológico, en Paquiestancia, Ecuador. *La Granja*, 24(2), 43–52. <https://doi.org/10.17163/lgr.n24.2016.04>
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia, fitoquímica plantas medicinales* (2nd ed., Vol. 1). Editorial ACRIBIA, S.A.
- Bussmann, R. W., Malca-García, G., Glenn, A., Sharon, D., Chait, G., Díaz, D., Pourmand, K., Jonat, B., Somogy, S., Guardado, G., Aguirre, C., Chan, R., Meyer, K., Kuhlman, A., Townesmith, A., Effio-Carbajal, J., Frías-Fernandez, F., & Benito, M. (2010). Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 132(1), 101–108. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2010.07.048>
- Caballero, 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. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00524>
- Calderón, L., & Ojeda, A. (2022). *Composición química y estudios autobiográficos de actividad biológica de la especie Clinopodium brownei (Sw.) Kuntze* [Tesis de maestría]. Universidad Politécnica Salesiana.
- Canal, D. (2011). *Cestrum de Colombia (Solanaceae): estudio taxonómico de las especies de tricomas simples* [Tesis de maestría]. Universidad Nacional de Colombia.
- Carballo, C., Alfaro, T., Palazón, Z., Ramos, R., Rodríguez, C., Cabezas, C., Acosta, L., & Reyes, M. (2002). Desinfección química de plantas medicinales II. *Plantago lanceolata* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 7(3), 131–135. <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v7n3/pla04302.pdf>

- Carrodeaguas, A., & Zúniga, A. (2021). Aplicación de herramientas moleculares para el mejoramiento genético de pasturas. *Pastos y Forrajes*, 44(1), 1–11. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942021000100021
- Cerna, M., & Miño, J. (2018). Identificación molecular del género *Passiflora* (Passifloraceae), en la región norte del Ecuador mediante el método DNA Barcoding. *Bionatura*, 1(1). <https://doi.org/10.21931/rb/cs/2018.01.01.11>
- Cerón, C., & Quevedo, A. (2002). *Etnobotánica del Putzalagua Cotopaxi Ecuador*. 3(1), 95–102. <https://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/CINCHONIA/article/view/2312>
- Chaouche, T., Haddouchi, F., Boudjemai, O., Ghellai, I., & Senhadji, S. (2021). Physicochemical parameters of oil extracted from *Ricinus communis* L. seeds. *Journal of Natural Product Research and Application*. <https://doi.org/https://doi.org/10.46325/jnpra.v1i01.5>
- Chatterjee, M., & Mukherjee, A. (2021). Evaluation of Bioactivity of Green Nanoparticles Synthesized from Traditionally Used Medicinal Plants: A Review. *Springer Nature Singapore*, 799–815. https://doi.org/10.1007/978-981-15-8127-4_38
- Chávez, Á. (2022). *Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo rojo (Thymus zygis) mediante la técnica de Kirby-Bauer en Staphylococcus aureus aislada de mastitis bovina* [Tesis de grado, Universidad Estatal de Bolívar]. <https://dspace.ueb.edu.ec/bitstream/123456789/4677/1/TESIS%20ANGEL%20CHAVEZ.pdf>
- Checa, A., Santillas, O., & Andrade, A. (2017). Método: Extracción de ADN plasmídico (Lisis alcalina modificado). *Conogasi*.
- Cheng, W., & Han, S. (2020). Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 33(11), 1699–1713. <https://doi.org/10.5713/AJAS.20.0156>
- Chuncho, G., Chuncho, C., & Aguirre, Z. (2019). *Anatomía y morfología vegetal*. <https://cloudflare-ipfs.com/ipfs/bafykbzaceb2r6b36esdmtp5te6esmne2krfl56x7yovcjjlo67mrnibpfpq?filename=Guillermo%20Chuncho%2C%20Carlos%20Chuncho%2C%20Zhoife%20Aguirre.%20-%20Anatom%20y%20morfolog%20vegetal-Universidad%20Nacional%20de%20Loja%20%282019%29.pdf>
- Ciangherotti, C., Buitriago, D., & Morales, A. (2004). Estudio de los componentes químicos de las hojas y tallos de *Cestrum buxifolium* Kunth. *Revista de La Facultad de Farmacia*, 46(1), 31–34.

- Cobirka, M., Tancin, V., & Slama, P. (2020). Epidemiology and classification of mastitis. In *Animals* (Vol. 10, Issue 12, pp. 1–17). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ani10122212>
- Collaguazo, D., & Márquez, A. (2022). *Estudio farmacognóstico y fitoquímico de cuatro especies vegetales referidas para el tratamiento de mastitis en la práctica ancestral de la comunidad de Paquiestancia, cantón Cayambe* [Tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiana]. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/22977>
- Contreras, J., & Ramirez, M. (2022). Uso de plantas medicinales que se comercializan en Guayaquil, Ecuador. *Manglar*, 19(4), 309–316. <https://doi.org/10.57188/manglar.2022.039>
- Cortez, V., Macedo, J., Hernández, M., Arteaga, G., Espinosa, D., & Rodríguez, J. (2004). Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Revista Biomed*, 15(2), 123–136. <http://www.uady.mx/sitios/biomedic/revbiomed/pdf/rb041527.pdf>
- Corzo, D. (2012). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Cestrum buxifolium* Kunth. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43(3), 81–86. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v43n3/v43n3a9.pdf>
- Council of Europe. (2013). *European Pharmacopoeia* (8th ed., Vol. 1). Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM). <https://archive.org/details/EuropeanPharmacopoeia80/page/n1163/mode/2up?view=theater>
- Cuenca, M., García, D., Reinoso, L., González, J., & Torracchi, J. (2021). Detección de Mastitis Subclínica Bovina y factores asociados, en fincas lecheras de la Provincia del Cañar – Biblián, Ecuador. *Revista Científica de La Facultad de Veterinaria*, 31(3), 93–97. <https://doi.org/10.52973/rcfcv-luz313.art3>
- Dehghani, M., Ganjali, Z., Javadian, F., Estakhr, J., & Heidari, A. (2012). Anti-Microbial Activity of Ethanolic and Aqueous Extract of *Cynanchum acutum*. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, 3(4), 177–180.
- Demir, H., Ergin, E., Açıık, L., Vural, M., Rastilantie, M., & Açıık, L. (2011). Antimicrobial and antioxidant activities of *Cynanchum acutum*, *Cionura erecta* and *Trachomitum venetum* subsp. *sarmatiense* grown wild in Turkey WFL Publisher Science and Technology Antimicrobial and antioxidant activities of *Cynanchum acutum*, *Cionura erecta* and *Trachomitum venetum* subsp. *sarmatiense* grown wild in Turkey. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 9(1), 186–189. <https://www.researchgate.net/publication/295669131>
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of Visualized Experiments*, 45. <https://doi.org/10.3791/2565>
- Díaz, A., & Guamangallo, J. (2023). *Aplicación del sistema de identificación molecular Barcode para especies del género (Epidendrum) en Pichincha, Ecuador* [Tesis de

- El Aziz, M., Ashour, A., & Melas, A. (2019). A review on saponins from medicinal plants: chemistry, isolation, and determination. *Journal of Nanomedicine Research*, 7(4), 282–288. <https://doi.org/10.15406/jnmr.2019.07.00199>
- Eltahir, A., Ahmed, R., & El-Kamali, H. (2018). Pharmacognostical Study of the Fruits of *Acacia nilotica*, *Ammi visnaga* and *Pimpinella anisum*. *JOURNAL OF THE FACULTY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 5, 39–45. <https://doi.org/https://doi.org/10.52981/jfst.vi5.364>
- Faramayuda, F., Ratnawati, J., & Nurlaeni, N. (2014). Uji Bioaktivitas Ekstrak dan Fraksi Daun Kembang Dayang (*Cestrum nocturnum* Linn.) Terhadap *Artemia salina* Leach Dengan Menggunakan Metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Test). *Proceeding Seminar Nasional Ilmu Pengetahuan Dan Teknologi Universitas Jenderal Achmad Yani*, 49–53.
- Farinango, Á. (2015). *Prevalencia de mastitis bovina mediante la prueba de California Mastitis Test con identificación del agente etiológico, en el Centro de Acopio de Leche de la comunidad de Pulisa, Cayambe – Ecuador, 2014* [Tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9826/1/UPS-YT00250.pdf>
- Figueroa, M. (2016). *Determinación de la prevalencia de mastitis subclínica e identificación de Staphylococcus aureus, en las ganaderías bovinas de la parroquia Nambacola, del cantón Gonzanamá* [Tesis de grado, Universidad Nacional de Loja]. <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/17268/1/MARLON%20ERMEL%20FIGUEROA%20D%20c3%81VILA.pdf>
- Ge, Y., Liu, P., Yang, R., Zhang, L., Chen, H., Camara, I., Liu, Y., & Shi, W. (2015). Insecticidal constituents and activity of alkaloids from *Cynanchum mongolicum*. *Molecules*, 20(9), 17483–17492. <https://doi.org/10.3390/molecules200917483>
- Gegotek, A., & Skrzydlewska, E. (2022). Antioxidative and Anti-Inflammatory Activity of Ascorbic Acid. *Antioxidants* 2022, Vol. 11, Page 1993, 11(10), 1993. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX11101993>
- Gharu, C. (2022). Defense Mechanism of Natural Antioxidants Against Free Radicals. *Central Asian Journal of Medical and Natural Sciences*, 3(5). <https://doi.org/https://doi.org/10.17605/cajmn.v3i5.1064>
- Ghavam, M. (2018). Plant antioxidants and their evaluation. *Health Biotechnology and Biopharma*, 2(2), 14–18. <https://doi.org/10.22034/HBB.2018.16>
- Gómez, L. (2015). *Identificación y antibiograma de patógenos relacionados con mastitis bovina en seis comunidades de pequeños productores* [Tesis de grado, Universidad de Las Américas (UDLA)]. <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/4545/1/iniapsctG633i.pdf>

- González, C. (2008). *Módulo de Farmacognosia* (J. Leal, G. Herrera, R. Salazar, & M. Córdoba, Eds.; 2nd ed.). Universidad Nacional Abierta y a Distancia.
- González, R., & Vidal del Río, M. (2021). Mastitis bovina y calidad de la leche, un desafío para la salud humana. *Revista Universidad y Sociedad*, 13 (S1), 89–96.
- Google Earth. (2024). *Paquiestancia - Google Maps*. <https://www.google.com/maps/place/Paquiestancia/@0.064931,-78.0941141,14z/data=!3m1!4b1!4m6!3m5!1s0x8e2a060d42f187ed:0x2f91c67883a62ab!8m2!3d0.0593586!4d-78.0937171!16s%2Fg%2F11b77fs3db?entry=ttu>
- Guo, H., Yang, M., & Qi, Q. (2014). Insecticidal and antifeedant effects of two alkaloids from *Cynanchum komarovii* against larvae of *Plutella xylostella* L. *Journal of Applied Entomology*, 138(1–2), 133–140. <https://doi.org/10.1111/jen.12075>
- Gutiérrez, L. (2010). *Inventario florístico del sector de buga alto, del Bosque de Paquiestancia, Cayambe - Ecuador 2008*. [Tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/4590>
- Haggag, M. I. (2022). Phytochemical profile for *Cestrum nocturnum* leaves ethanolic extract and isolation of a rare flavonoid using different chromatographic and spectroscopic techniques. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 10(2), 143–150. <https://doi.org/10.22271/PLANTS.2022.V10.I2B.1403>
- Hamidi, M., Jovanova, B., & Kadifkova, T. (2014). Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, 60(01), 9–18. <https://doi.org/10.33320/maced.pharm.bull.2014.60.01.002>
- Han, L., Zhou, X., Yang, M., Zhou, L., Deng, X., Wei, S., Wang, W., Wang, Z., Qiao, X., & Bai, C. (2018). Ethnobotany, Phytochemistry and Pharmacological Effects of Plants in Genus *Cynanchum* Linn. (Asclepiadaceae). *Molecules* 2018, Vol. 23, Page 1194, 23(5), 1194. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23051194>
- Hao, D.-C., Lin, Y., Xu, M., Liu, H., Liu, J., Mu, X., Liang, J., Zhang, J., Qiang, T., Li, H., Li, B., & Zhang, B. (2022). Metabolic profiling on the analysis of different parts of *Schisandra chinensis* based on UPLC-QTOF-MS with comparative bioactivity assays. *Plant Science*, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.970535>
- Hechem, V., Ezcurra, C., & Zuloaga, F. (2012). Estudio sistemático del género Sudamericano *Diplolepis* (Apocynaceae). *DARWINIANA*, 50(2), 296–317.
- Hendrawati, T., Utami, A., Nugrahani, R., Hasyim, U., & Ramadhan, A. (2019). The effects of types and concentrations of adsorbents on aloe vera gel opacity. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 674(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/674/1/012011>

- Heredia, C., Orozco, M., Pérez, C., & Martin, D. (2019). Actividad antibacteriana de extractos alcohólicos de hojas de *Solanum dolichosepalum* (Bitter). *Informador Técnico*, 83(2), 121–130. <https://doi.org/10.23850/22565035.2061>
- Hogeveen, H., Steeneveld, W., & Wolf, C. (2019). *Annual Review of Resource Economics Production Diseases Reduce the Efficiency of Dairy Production: A Review of the Results, Methods, and Approaches Regarding the Economics of Mastitis*. <https://doi.org/10.1146/annurev-resource-100518>
- Hussein, R., & Anssary, A. (2019). Plants Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants. In *Herbal Medicine*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76139>
- Ifeanyi, O. (2018). A Review on Free Radicals and Antioxidants. *International Journal of Current Research in Medical Sciences*, 4(2), 123–133. <https://doi.org/10.22192/ijcrms.2018.04.02.019>
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. (2023a). *Boletín Técnico: Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC)*. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2022/Bolet%C3%ADn_tecnico_ESPAC_2022.pdf
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. (2023b). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC)*. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2022/PPT_%20ESPAC_%202022_04.pdf
- Jerves, L., León, F., Peñaherrera, E., Cuzco, N., Tobar, V., Ansaloni, R., Maes, L., & Wilches, I. (2014). Medicinal plants used in South Ecuador for gastrointestinal problems: An evaluation of their antibacterial potential. *Journal of Medicinal Plant Research*, 8(45), 1310–1320. <https://doi.org/10.5897/JMPR2014.5656>
- Jiménez, K. (2022). *Determinación de la prevalencia y factores de riesgo de mastitis; la calidad de la leche cruda y la presencia de adulterantes en explotaciones ganaderas de la zona del noroccidente de la provincia de Pichincha* [Tesis de grado, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/36545/1/IASA%20I-TIC-0006.pdf>
- Jiménez, S. del C., Torres, L., Parra, J., Rodríguez, J., García, F., & Patiño, R. (2020). Perfil de resistencia antimicrobiana en aislamientos de *Staphylococcus* spp. obtenidos de leche bovina en Colombia. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.05.004>
- Kagawad, P., Gharge, S., Jivaje, K., Hiremath, S. I., & Suryawanshi, S. S. (2021). Quality control and standardization of Quercetin in herbal medicines by spectroscopic and

- chromatographic techniques. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(1).
<https://doi.org/10.1186/s43094-021-00327-y>
- Kumar, P., Ojasvita, Deora, A., Sharma, H., Sharma, S., Mittal, D., Bhanot, V., Prakash, A., Yadav, R., & Diwakar, R. (2020). Bovine Mastitis: A Review. *Middle-East Journal of Scientific Research*. <https://doi.org/10.5829/idosi.mejsr.2020.497.507>
- Lakshmanan, M. (2022). Plant Extraction Methods. *Introduction to Basics of Pharmacology and Toxicology: Volume 3: Experimental Pharmacology: Research Methodology and Biostatistics*, 3, 773–783. https://doi.org/10.1007/978-981-19-5343-9_54
- León, H. (2010). *Inventario Florístico del sector de buga bajo del Bosque de Paquiastancia Cayambe - Ecuador 2008* [Tesis de grado]. Universidad Politécnica Salesiana.
- Liede, S. (1997). American *Cynanchum* (Asclepiadaceae): A Preliminary Infrageneric Classification. *Source: Novon*, 7(2), 172–181.
<https://doi.org/https://doi.org/10.2307/3392191>
- Lima, L., Andrade, F., Alves, D., de Moraes, S., & Vieira, R. (2021). Anti-acetylcholinesterase and toxicity against *Artemia salina* of chitosan microparticles loaded with essential oils of *Cymbopogon flexuosus*, *Pelargonium x ssp* and *Copaifera officinalis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 1361–1370. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.090>
- Lončar, M., Jakovljević, M., Šubarić, D., Pavlić, M., Služek, V. B., Cindrić, I., & Molnar, M. (2020). Coumarins in food and methods of their determination. In *Foods* (Vol. 9, Issue 5). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
<https://doi.org/10.3390/foods9050645>
- Ma, X., Chen, H., Wang, F., Wang, S., Wu, Y., Ma, X., Wei, Y., Shao, W., & Zhao, Y. (2023). Molecular characterisation and antimicrobial resistance of *Streptococcus agalactiae* isolates from dairy farms in China. *Journal of Veterinary Research (Poland)*, 67(2), 161–167. <https://doi.org/10.2478/JVETRES-2023-0027>
- Machado, I., Mendes, K., Tavares, M., Aredes, A., & Cerqueira, G. (2022). *Ethnobotanical and Pharmacological Study of *Aspidosperma nitidum* Benth (Apocynaceae) - a Review*. 12(1), 1–10.
<https://doi.org/10.37002/biobrasil.v12i1.1716>
- Manzoor, A., Qaisar, U., Parveen, Z., Siddique, S., Sardar, A. A., & Ishaq, N. (2020). In vitro anticancer and antioxidant potential of *Cestrum* species. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33(4), 1535–1541.
<https://doi.org/10.36721/PJPS.2020.33.4.REG.1535-1541.1>
- Mencias, H., & Salazar, T. (2018). *Estudio fitoquímico, actividad antioxidante de especies de orquídeas de los géneros *Epidendrum*, *Oncidium* y *Caucaea** [Tesis de

- Mora, E. (2023). *Mastitis subclínica bovina y factores de riesgo ambientales en pequeños productores de ganado bovino doble propósito en el Cantón Babahoyo Provincia de Los Ríos*. [Tesis de grado, Universidad Técnica de Babahoyo]. [http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/15268/PI-UTB-FACIAG-VETERINARIA-REDISE%
c3%91ADA-000061.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/15268/PI-UTB-FACIAG-VETERINARIA-REDISE%c3%91ADA-000061.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Mora, F., & Orozco, C. (2002). Lista Preliminar de las especies de *Cestrum* L. (Solanaceae) para Colombia. *Biota Colombiana*, 3(1), 131–140. <https://revistas.humboldt.org.co/index.php/biota/article/view/110/110>
- Mróz, M., Malinowska-Pañczyk, E., Bartoszek, A., & Kusznierevich, B. (2023). Comparative Study on Assisted Solvent Extraction Techniques for the Extraction of Biologically Active Compounds from *Sideritis raeseri* and *Sideritis scardica*. *Molecules* 2023, Vol. 28, Page 4207, 28(10), 4207. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28104207>
- Muharrami, L., Munawaroh, F., Ersam, T., & Santoso, M. (2020). Phytochemical screening of ethanolic extract: a preliminary Test on five medicinal plants on Bangkalan. *Jurnal Pena Sains*, 7(2), 96–102. <https://doi.org/10.21107/jps.v7i2.8722>
- Mukhametov, A., Paliivets, M., Berechikidze, I., & Serikkyzy, M. (2023). Evaluating the recovery of bioactive compounds and antioxidant activity of unripe red grape liquid extracts obtained by maceration. *Food Science and Technology*, 43, e117922. <https://doi.org/10.1590/FST.117922>
- Mushtaq, S., Shah, A. M., Shah, A., Lone, S. A., Hussain, A., Hassan, Q. P., & Ali, M. N. (2018). Bovine mastitis: An appraisal of its alternative herbal cure. *Microbial Pathogenesis*, 114, 357–361. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2017.12.024>
- Nasr, S. M., Elwan, N. M., Mohamed, M. A., Abdel-Aziz, A. W. A., & Ghareeb, M. A. (2021). Phytochemical Investigation and Differential Effects of *Cestrum elegans* Isolated Compounds as Antimicrobial and Virucidal against Hepatitis A Virus. *Egyptian Journal of Chemistry*, 64(7), 3729–3738. <https://doi.org/10.21608/EJCHEM.2021.71934.3581>
- Nava, G., Aldasoro, E., Perezgrovas, R., & Vera, G. (2018). Interacciones del ser humano con animales de traspatio: un estudio desde la Etnoveterinaria en Tabasco, México. *Nova Scientia*, 10(21), 258–309. <https://doi.org/10.21640/ns.v10i21.1532>
- NCBI. (2023). *BLAST: Basic Local Alignment Search Tool*. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Nguyen, L., Fărcaș, A., Socaci, S., Tofană, M., Diaconeasa, Z., Pop, O., & Salanță, L. (2020). An Overview of Saponins – A Bioactive Group. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Food Science and Technology*, 77(1), 25–36. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-fst:2019.0036>

- Niizawa, C. (2020). Los códigos de barra moleculares como una herramienta para la identificación de plantas medicinales. *Mensaje Bioquímico*, 44, 31–37. <http://bq.facmed.unam.mx/tab/>
- Ocaña, E., & Valencia, S. (2023). *Identificación de subespecies de orquídeas pertenecientes al grupo de Epidendrum nocturnum (Orchidaceae), mediante la técnica molecular DNA Barcode* [Tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiana]. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/24295>
- Odewo, S., Ajani, B., Adeniji, K., & Areo, O. (2022). Morphological studies of some Nigerian species of Sida. *Journal of Forestry Research and Management*, 19(2), 140–147. <https://www.jfrm.org.ng/wp-content/uploads/2022/10/15-Odewo-et-al-3-FRJ-2-19.pdf>
- Oktavia, A., Mardiyah, M., & Syarifah, A. (2021). Toxicity Test for Yellow, Red, and Purple Flowers (*Cestrum elegans*) Leaves Using the Brine Shrimp Lethality Test Method. *Pharmadematica: Jurnal Kefarmasian Dan Gizi*, 1(1), 9–15. <https://doi.org/10.54445/pharmadematica.v1i1.6>
- Okumu, M., Mbaria, J., Gikunju, J., Mbuthia, P., Madadi, V., Ochola, F., & Jepkorir, M. (2021). Artemia salina as an animal model for the preliminary evaluation of snake venom-induced toxicity. *Toxicon*, X, 12. <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2021.100082>
- Oleas, N., Ríos, B., Peña, P., & Bustamante, M. (2016). *Plantas de las quebradas de Quito: guía práctica de identificación de plantas de ribera* (Universidad Tecnológica Indoamérica, Secretaría de Ambiente del DMQ, Fondo Ambiental de DMQ, & S. de P. C. FONAG, Eds.; 2nd ed.). Universidad Tecnológica Indoamérica.
- Organización Mundial de la Salud. (2003). *Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales*. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/42870/9243546279-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ormaza, D., Rueda, R., Huera, D., & Ibarra, E. (2022). Mastitis bovina en el cantón Montufar – Carchi. Prevalencia, agente causal y factores de riesgo. *AXIOMA*, 1(26), 5–10. <https://doi.org/10.26621/ra.v1i26.735>
- Pacheco, J. (2011). *Determinación de la toxicidad aguda (CL50) del extracto de polvillo de carbón frente a larvas de Artemia franciscana* [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/7861/598923.2011.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Padilla, N., Guerra, L. de L., & Moujir, L. (2021). Antimicrobial Activity and Mode of Action of Celastrol, a Nortriterpen Quinone Isolated from Natural Sources. *Foods* 2021, Vol. 10, Page 591, 10(3), 591. <https://doi.org/10.3390/FOODS10030591>

- Patel, A., Hirani, K., Bhuva, V., & Panchal, P. (2020). Assessment of quality control parameters and standardization of peggard syrup: a polyherbal formulation. *INTERNATIONAL AYURVEDIC MEDICAL JOURNAL*, 3620–3627. <https://doi.org/10.46607/iamj08062020>
- Peñafiel, M. (2003). *Flora y vegetación de Cuicocha* (Ediciones Aya-Yala). https://digitalrepository.unm.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1280&context=abya_yala
- Pérez, É., & Rivas, A. (2021). *Determinación de la sensibilidad de los microorganismos frente a antimicrobianos de origen natural y la concentración mínima inhibitoria (CMI) por métodos fenotípicos*.
- Prasad, M. P., Prabhu, A., Thakur, M. S., & Ruparel, Y. M. (2013). Phytochemical screening, anti-oxidant potential and antimicrobial activities in three species of cestrum plants. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(2), 673–678.
- Pujol, A., Tamargo, B., Salas, E., Calzadilla, C., Acevedo, R., & Sierra, G. (2020). Tamizaje fitoquímico de extractos obtenidos de la planta *Sapindus saponaria* L. que crece en Cuba. *Revista Bionatura*, 5(3). <https://doi.org/10.21931/RB/2020.05.03.7>
- Punjabi, Y., Khilnani, V., & Somaiya, K. J. (2015). The investigation of antibacterial activity of *Cestrum nocturnum*. *Pharmacophore*, 6(2), 81–87. <http://www.pharmacophorejournal.com/>
- Purbosari, N., Warsiki, E., Syamsu, K., & Santoso, J. (2022). The potential of *Eucheuma cottonii* extract as a candidate for fish anesthetic agent. *Aquaculture and Fisheries*, 7(4), 427–432. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2021.06.003>
- Putri, A. (2023). Evaluation of characteristics of cajuput oil by steam-hydro distillation (*Melaleuca leucadendra* L.). *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 20(1), 176–180. <https://doi.org/10.30574/wjarr.2023.20.1.1965>
- Quinchuela, C., & Vaca, I. (2020). *Estudio de las propiedades antibacterianas, antioxidantes y toxicidad de cuatro especies del género Huntleya (Orchidaceae) del Ecuador* [Tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/18435/1/UPS-QT14375.pdf>
- Quispe, R., Peña, G., & Andía, V. (2020). Resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* asalado de leche de vacas con mastitis. *Revista Veterinaria*, 32(1), 79–83. www.vet.unne.edu.ar
- Rahman, J., Jaff, D., Ahamad, J., & Hussain, F. (2021). *Prangos platychlaena*: State of the Art from Ethnopharmacology, Phytochemical, Toxicological and Pharmacological Perspective. *Eurasian Journal of Science and Engineering*, 7(2). <https://doi.org/10.23918/eajse.v7i2p21>
- Ramadevi, D., Jayaram, P., Ganga Rao, B., Dora Babu Asst Professor, N., Radha Assistant Professor, R., Dora Babu, N., & Radha, R. (2020). Detailed

- pharmacognostical studies on Apocyanaceae family root from wild source of South India (Andhra Pradesh). ~ 2229 ~ *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(5). www.phytojournal.com
- Ramírez, N., Fernández, J., & Palacio, L. (2018). Tasa de incidencia de mastitis clínica y susceptibilidad antibiótica de patógenos productores de mastitis en ganado lechero del norte de Antioquia, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, 36, 75–87. <https://doi.org/10.19052/mv.5173>
- Rendón, V., Puentestar, C., Goyes, M., & Medina, G. (2019). Las plantas medicinales y su uso en las parroquias rurales del cantón Babahoyo, Los Ríos, Ecuador. *Journal of Science and Research*, 6(4), 32–49. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5803698>
- Rey, F., & Capdevielle, F. (2020). Aplicación del código de barras de ADN (DNA barcoding) para la identificación de especies vegetales de interés industrial. *INNOTECH*, 20, 117–138. <https://doi.org/10.12461/20.06>
- Reyes, A., Reyes, A., Aguilar, N., & Carrillo, M. (2017). Propiedades antioxidantes de infusiones de neem (*Azadirachta indica*) encapsuladas con proteína de soya. *Revista Electrónica Nova Scientia*, 18(1), 167–185.
- Rivas, C., Oranday, M., & Verde, M. (2016). Investigación en plantas de importancia médica. In *Investigación en plantas de importancia médica* (Vol. 1). OmniaScience. <https://doi.org/10.3926/OMS.313>
- Rodríguez, A., Fung, Y., Ochoa, A., Ortiz, E., & Díaz, U. (2018). Parámetros físicos, físico-químicos y químicos de extractos de *Origanum majorana* l. cultivado utilizando agua magnetizada. *Revista Cubana de Química*, 30(3), 470–482. <https://www.redalyc.org/journal/4435/443557797006/html/>
- Rodríguez, J., Hernández, M., & Méndez, L. (2020). *Manual de prácticas de farmacognosia*.
- Sánchez, E., Castillo, S., & García, P. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica* (C. Rivas, M. Oranday, & M. Verde, Eds.). OmniaScience. <https://doi.org/10.3926/oms.313>
- Sánchez, J., & Torres, L. (2020). Educación, etnobotánica y rescate de saberes ancestrales en Ecuador. *Revista Espacios*, 41(23), 158–170. <https://www.revistaespacios.com>
- Santo, A., Zhu, H., & Li, Y. (2016). Free Radicals: From Health to Disease. *Reactive Oxygen Species*, 2(4). <https://doi.org/10.20455/ros.2016.847>
- Serrato, A., Flores, L., Aportela, J., & Sierra, E. (2014). PCR: reacción en cadena de la polimerasa. In A. Cornejo, A. Serrato, B. Rendón, & M. Rocha (Eds.), *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología* (1st ed., pp. 53–74). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

- Shaikh, J., & Patil, M. (2020). Qualitative tests for preliminary phytochemical screening: An overview. *International Journal of Chemical Studies*, 8(2), 603–608. <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i2i.8834>
- Sharma, S., & Shahzad, A. (2015). Climbers: Evolution and diversification in angiosperm. In *Biotechnological Strategies for the Conservation of Medicinal and Ornamental Climbers* (pp. 3–19). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19288-8_1
- Sharma, T., Pandey, B., Shrestha, B. K., Koju, G. M., Thusa, R., & Karki, N. (2020). Phytochemical Screening of Medicinal Plants and Study of the Effect of Phytoconstituents in Seed Germination. *Tribhuvan University Journal*, 35(2), 1–11. <https://doi.org/10.3126/tuj.v35i2.36183>
- Sharun, K., Dhama, K., Tiwari, R., Gugjoo, M. B., Iqbal Yattoo, M., Patel, S. K., Pathak, M., Karthik, K., Khurana, S. K., Singh, R., Puvvala, B., Amarpal, Singh, R., Singh, K. P., & Chaicumpa, W. (2021). Advances in therapeutic and managerial approaches of bovine mastitis: A comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, 41(1), 107–136. <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1882713>
- Shashikanth, J. (2023). Pharmacognostical studies on the stem bark of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. *International Journal of Pharmacognosy*, 10(9), 502–508. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.IJP.10\(9\).502-08](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.IJP.10(9).502-08)
- Shoaib, G., Shah, G., Shad, N., Dogan, Y., Siddique, Z., Shah, A., Farooq, M., Khan, K., & Nedelcheva, A. (2021). Traditional practices of the ethnoveterinary plants in the Kaghan Valley, Western Himalayas-Pakistan. *Revista de Biologia Tropical*, 69(1), 1–11. <https://doi.org/10.15517/RBT.V69I1.42021>
- Silva, L., & Silva, F. (2023). Bioassay with *Artemia salina* L.: A gateway to understanding the toxicity of medicinal plant extracts. In *Botânica, Ecologia e Sustentabilidade: uma perspectiva multidisciplinar* (pp. 50–69). Editora Científica Digital. <https://doi.org/10.37885/230814206>
- Sinchiguano, C. (2017). *Turismo comunitario agroecológico, eje de Desarrollo Sostenible en el territorio rural indígena Kayambi: estudios de caso Paquiestancia y La Esperanza, localizados en los cantones Cayambe y Pedro Moncayo* [Tesis de Maestría, Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales, FLACSO Ecuador]. <https://repositorio.flacsoandes.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/10469/11792/TFLACSO-2017CESA.pdf?sequence=14&isAllowed=y>
- Sinti, E., & Torres, F. (2017). "Citotoxicidad in vitro del extracto hidroalcohólico de hojas y fruto Para optar el título de QUÍMICO FARMACÉUTICO [Tesis de grado]. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.
- Sonawane, S., Bais, S., & Dhumal, D. (2024). A review: Different evaluation methods of crude drugs. *International Journal of Pharmacy and Herbal Technology*, 2(1),

- 1295–1322. <https://ijprdjournal.com/myapp/uploads/current/73-1295-1322%20Dipali%20Dhumal.pdf>
- Sugiharto, S., Darmanto, W., Astuti, S., Hayati, A., Martha, Y., Olivia, P., & Putri, K. (2019). Antioxidant activities of curcumin to MDA blood serum concentration and lead levels in liver of mice. *Malaysian Journal of Science*, 38(3), 21–29. <https://doi.org/10.22452/mjs.sp2019no3.3>
- Syahputra, R., Sutiani, A., Silitonga, P., Rani, Z., & Kudadiri, A. (2021). Extraction And Phytochemical Screening Of Ethanol Extract And Simplicia Of Moringa Leaf (Moringa Oleifera Lam.) From Sidikalang, North Sumatera. *International Journal of Science*, 2(6), 2072–2076. <https://doi.org/https://doi.org/10.46729/ijstm.v2i6.381>
- Taco, E., & Valdiviezo, J. (2019). *Plan de ordenamiento territorial de la Comunidad de Paquiestancia, parroquia de San José de Ayora* [Tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/17426>
- Talamantes, C., Cortés, M., Balois, R., López, G., & Palomino, Y. (2019). Análisis molecular de la diversidad genética en Guanábana (*Annona muricata* L.) mediante marcadores SRAP. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 42(3), 209–214. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802019000300209
- Talip, N., Amri, C., Rahman, M., Juhari, M., Ghazalli, M., Zohari, A., & Bunawan, H. (2024). Taxonomic significance of pollen, anatomical and morphological characteristics of red and green leaves *Christia vespertilionis* (L.f.) Bakh. f. (Fabaceae). *Pakistan Journal of Botany*, 56(2), 557–565. [https://doi.org/10.30848/PJB2024-2\(37\)](https://doi.org/10.30848/PJB2024-2(37))
- Teixeira, J., Alves, P., Silva de Carvalho, I., Leite, A., Araujo, I., Chiara, E., Rolim-Neto, P., Araújo, L., & Cavalcante da Cruz, E. (2020). Flavonoid enriched extract of *Alternanthera brasiliana* with photoprotective effect: Formulation development and evaluation of quality. *Industrial Crops and Products*, 149. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112371>
- Torkian, B., Hann, S., Preisner, E., & Norman, R. (2020). BLAST-QC: Automated analysis of BLAST results. *Environmental Microbiomes*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s40793-020-00361-y>
- de la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador*. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Torres, F., & Ganoza, M. (2017). Etnobotánica y sistemas de extracción para compuestos fenólicos, actividad antioxidante y toxicidad de plantas de páramos y bosques nublados del norte peruano. *Revista Peruana de Medicina Integrativa*, 2(2), 101–109. <https://rpmi.pe/index.php/rpmi/article/view/608/605>

- Torres, G., Macias, D., Reyes-Velez, J., Rios-Agudelo, P., & Caraballo-Guzmán, A. (2023). Streptococcus agalactiae virulence factors isolated from bovine mastitis and antibiotic treatment response. *Journal of Applied Microbiology*, 134(6). <https://doi.org/10.1093/JAMBIO/LXAD116>
- Torres, X. (2018). *Estudio de la producción de la industria láctea del cantón Cayambe en el período 2009-2015* [Tesis de maestría, Universidad Andina Simón Bolívar]. <http://hdl.handle.net/10644/6052>
- Turchetti, G., & De Santis, D. (2022). Hydrolates: Characteristics, Properties, and Potential Uses in the Food Industry. In *New Findings from Natural Substances* (pp. 183–210). BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS. <https://doi.org/10.2174/9789815051421122010011>
- Valian, M., Borhani, M. S., Sajirani, E. B., Jorjani, E., & Boozarpour, S. (2023). Antibacterial, antibiofilm, and pharmacokinetic properties of some Lamiaceae essential oils against methicillin- and vancomycin-resistant staphylococcus aureus. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 20(142), 82–103. <https://doi.org/10.22034/FSCT.20.142.82>
- Wang, N., Zhou, C., Basang, W., Zhu, Y., Wang, X., Li, C., Chen, L., & Zhou, X. (2021). Mechanisms by which mastitis affects reproduction in dairy cow: A review. In *Reproduction in Domestic Animals* (Vol. 56, Issue 9, pp. 1165–1175). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/rda.13953>
- Weberling, F. (2006). Las Estípulas como Caracteres Sistemáticos Confiables. *Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica*, 41(1–2), 127–150. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-23722006000100012
- World Health Organization. (1998). *Quality control methods for medicinal plant materials*. World Health Organization. https://www.who.int/docs/default-source/medicines/norms-and-standards/guidelines/quality-control/quality-control-methods-for-medicinal-plant-materials.pdf?sfvrsn=b451e7c6_0
- Wu, C., Zhang, M., He, M., Gu, M., Lin, M., & Zhang, G. (2019). Selection of solvent for extraction of antioxidant components from *Cynanchum auriculatum*, *Cynanchum bungei*, and *Cynanchum wilfordii* roots. *Food Science and Nutrition*, 7(4), 1337–1343. <https://doi.org/10.1002/fsn3.967>
- Wulansari, D., Dyah wulandari, D., & Krisdayanti, A. (2022). Comparative study of in-vitro toxicity of raw honey and fermented honey using the BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) Method. *Medical Technology and Public Health Journal*, 6(2), 148–156. <https://doi.org/10.33086/mtphj.v6i2.3477>
- Yang, F., & Li, X. (2015). Role of antioxidant vitamins and trace elements in mastitis in dairy cows. In *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research* (Vol. 2, Issue

- 1, pp. 1–9). Network for the Veterinarians of Bangladesh. <https://doi.org/10.5455/javar.2015.b48>
- Yeo, J., & Shahidi, F. (2019). Revisiting DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay as a useful tool in antioxidant evaluation: A new IC100 concept to address its limitations. *Journal of Food Bioactives*, 7, 36–42. <https://doi.org/10.31665/jfb.2019.7196>
- Yockteng, J. (2017, March 3). *Biología de la Artemia sp.* BIOARTEMIA. <https://www.bioartemia.com/2017/03/03/biologia-de-la-artemia-sp/>
- Zhang, Y., Yang, Y., Yan, C., Li, J., Zhang, P., Liu, R., He, J., & Chang, Y. xu. (2022). A review of the ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Cynanchum atratum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 284, 114748. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2021.114748>
- Zhou, X., Xia, W., Zhang, Y., Ma, J., Zhou, H., Dong, L., & Fu, X. (2020). *Cynanchum paniculatum* (Bunge) Kitag. ex H. Hara: A review of its ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 260, 112994. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2020.112994>
- Zigo, F., Vasil', M., Ondrašovičová, S., Výrostková, J., Bujok, J., & Pecka, E. (2021). Maintaining Optimal Mammary Gland Health and Prevention of Mastitis. In *Frontiers in Veterinary Science* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.607311>

7. ANEXOS

Anexo 1. Tabla de metabolitos vegetales de interés farmacológico

Metabolito	Descripción	Actividad farmacológica
Alcaloides	Estructura de anillos heterocíclicos con compuestos nitrogenados alifáticos (Bhatla, 2018).	Analgésicos, relajantes, anestésicos, estimulantes (Hussein & Anssary, 2019).
Saponinas	Compuestos glicosídicos que están compuestos por una molécula de aglicona y una de glicona (Nguyen et al., 2020).	Antimicrobiana, antiinflamatoria, anticancerígena, insecticida (El Aziz et al., 2019).
Cumarinas	Estructura benzopironas que consta de un anillo de pirona enlazado a un anillo bencénico (Bhatla, 2018).	Antimicrobianas, antivirales, antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas (Lončar et al., 2020).
Triterpenos y esteroides	Compuestos que comparten ruta biosintética, poseen una estructura de cinco carbonos ramificados (Bruneton, 2001).	Antimicrobianos, antiinflamatorios y antineoplásicos (Bruneton, 2001).
Flavonoides	Estructura conformada por dos anillos aromáticos de quince carbonos unidos mediante un triple enlace (Bhatla, 2018).	Antioxidante, antiinflamatorio, antibacteriano y antiviral (Sharma et al., 2020).
Heterósidos cardiotónicos	Estructura química conformada por un núcleo esteroide, un anillo de lactona y un azúcar (Amaringo et al., 2011).	Agente anticancerígeno e inmunomodulador (Amaringo et al., 2011).
Catequinas	Compuestos del grupo de los polifenoles (Hussein & Anssary, 2019).	Antioxidantes, antiinflamatorias, antifúngicas, antibacterianas y antivirales, anticancerígenas, entre otras (Hussein & Anssary, 2019)
Resinas	Estructura variada, no definida. Generalmente conformada por alcoholes	Antitumoral (Bruneton, 2001).

	aromáticos, ácidos aromáticos y alifáticos, entre otros (Bruneton, 2001).	
Fenoles	Grupo de moléculas simples y complejas que conforman una estructura con un anillo aromático enlazado a grupos hidroxilo (Sharma et al., 2020).	Antioxidantes, antiinflamatorios, fungicidas, bactericidas e insecticidas (Sharma et al., 2020).
Taninos	Pertenciente a grupo de los compuestos polifenólicos, disponen una estructura de un grupo hidroxilo en uno o varios anillos fenólicos (Bhatla, 2018)	Antibacterianos, antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenos, antivirales y antiparasitarios (Bhatla, 2018)

Elaborado por: (Los autores, 2024)

Anexo 2. Recolección de especies (*Cynanchum microphyllum*)



Nota: Para la recolección se realizó una identificación previa con ayuda de la tutora, posteriormente las plantas fueron cortadas y almacenadas en fundas de basura nuevas con aireación. En el lugar de la recolección se anotaron los datos en el cuaderno de campo.

Elaborado por: (Los autores, 2024)

Anexo 3. Prensado de especies vegetales



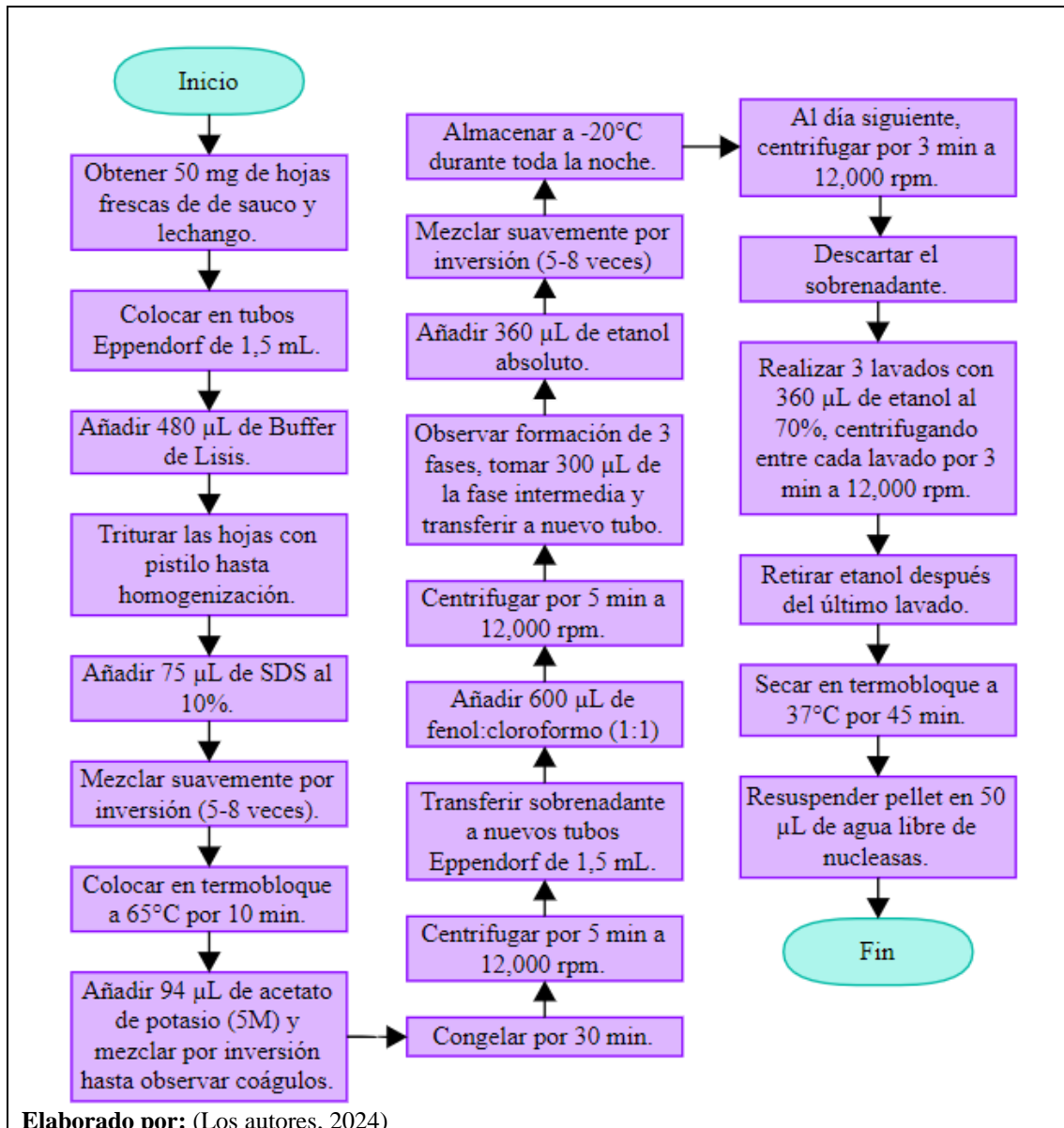
Elaborado por: (Los autores, 2024)

Anexo 4. Filtrado al vacío del extracto macerado



Elaborado por: (Los autores, 2024)

Anexo 5. Diagrama de flujo del protocolo de extracción de ADN



Anexo 6. Equipo NanoDrop 2000 para cuantificación de ADN



Elaborado por: (Los autores, 2024)

Anexo 7. Composición de la mezcla para PCR conforme al protocolo de *Thermo Scientific*

Reactivo	Volumen para 1 muestra (µL)
<i>Phire Plant Direct PCR MasterMix</i>	12,5
<i>Primer forward</i>	1
<i>Primer reverse</i>	1
Agua libre de nucleasas	1,5
MgCl ₂	1
ADN template	8
Volumen final	25

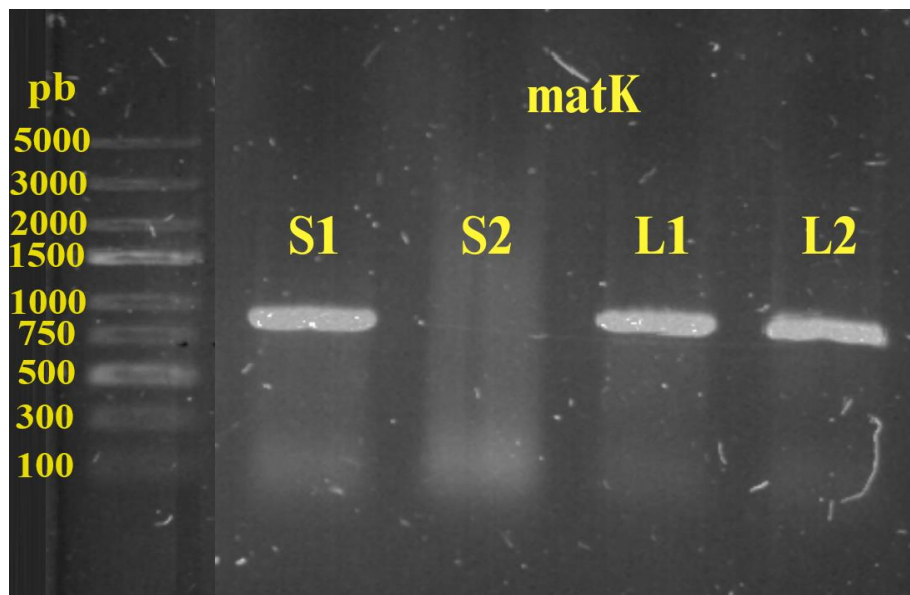
Elaborado por: (Los autores, 2024)

Anexo 8. Carga de productos PCR para electroforesis horizontal



Elaborado por: (Los autores, 2024)

Anexo 9. Electroforesis horizontal de *matK* para Sauco y Lechango



Nota: En la imagen, S1 y S2 es el ADN extraído de *C. peruvianum*, mientras que L1 y L2 es el ADN extraído de *C. microphyllum*, la electroforesis se realizó por duplicado para el marcador *matK*.

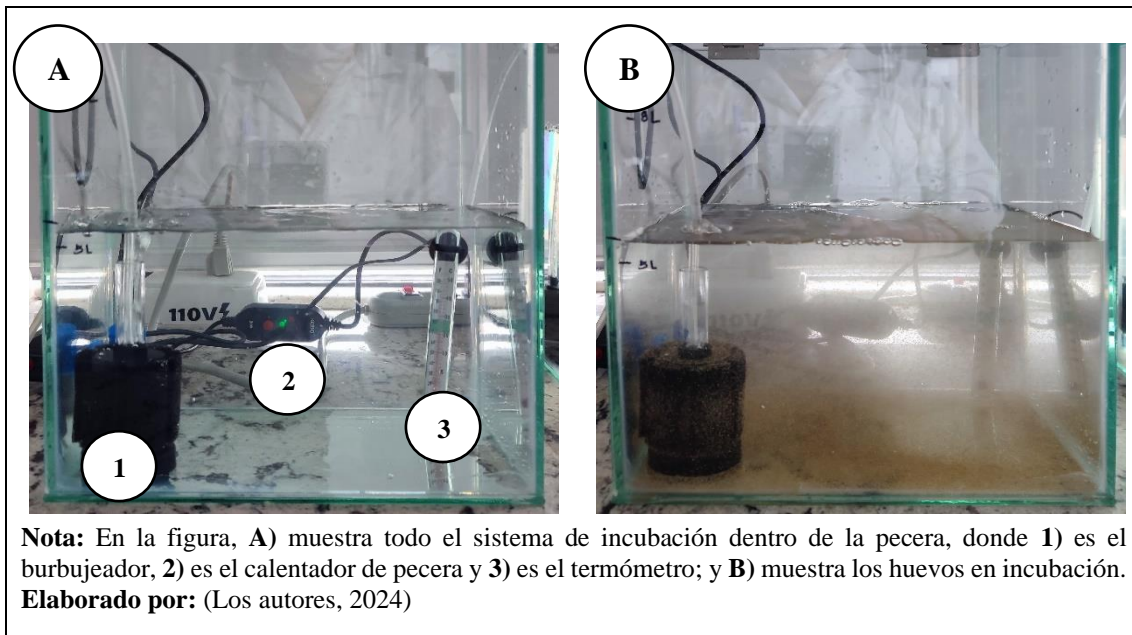
Elaborado por: (Los autores, 2024)

Anexo 10. Huevos de *Artemia salina* de la marca Agripac S.A.

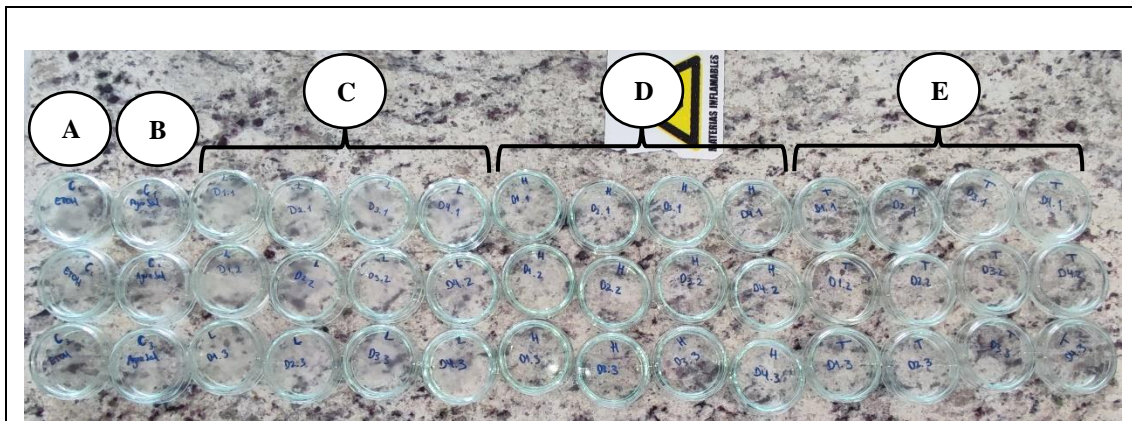


Elaborado por: (Los autores, 2024)

Anexo 11. Incubación de *Artemia salina* en pecera



Anexo 12. Diluciones de extractos y controles



Nota: En la figura, **A)** es el control positivo, **B)** es el control negativo, **C)** son las diluciones del extracto de lechango, **D)** son las diluciones del extracto de hojas y **E)** son las diluciones del extracto de tallos.

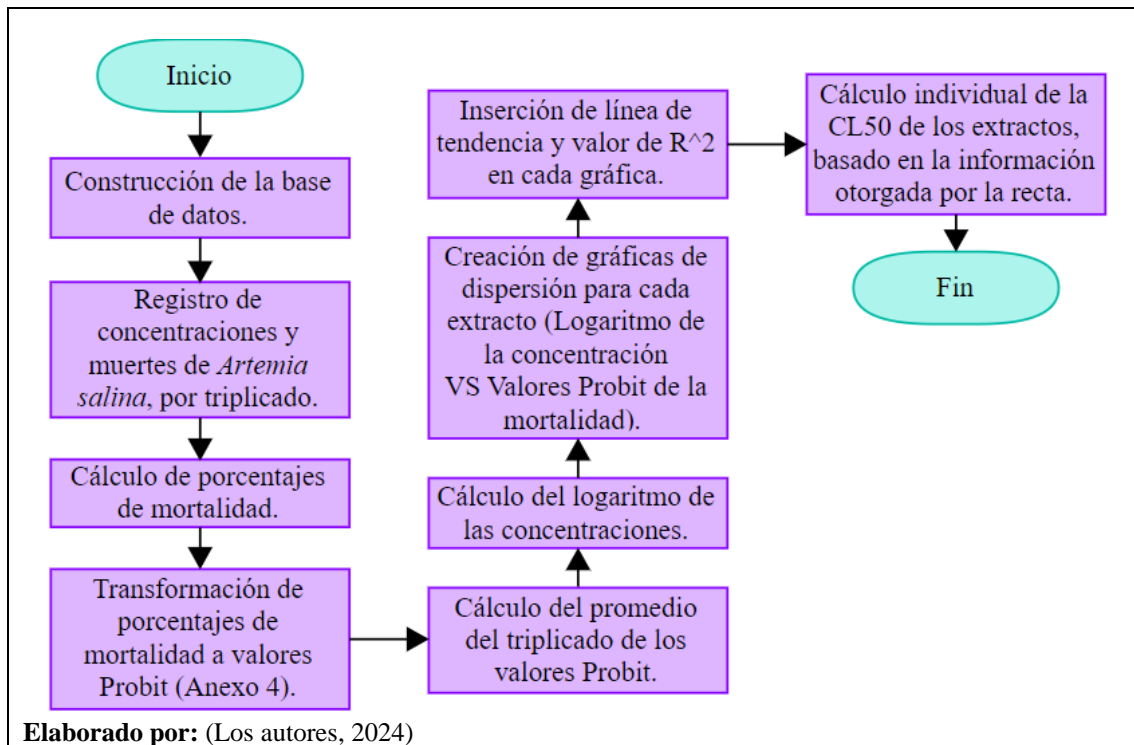
Elaborado por: (Los autores, 2024)

Anexo 13. Nauplio de *Artemia salina* observado bajo el estereoscopio



Elaborado por: (Los autores, 2024)

Anexo 14. Diagrama de flujo del análisis estadístico de la actividad toxicológica en Excel



Anexo 15. Tabla para conversión de porcentaje de mortalidad a Probit

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.25	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

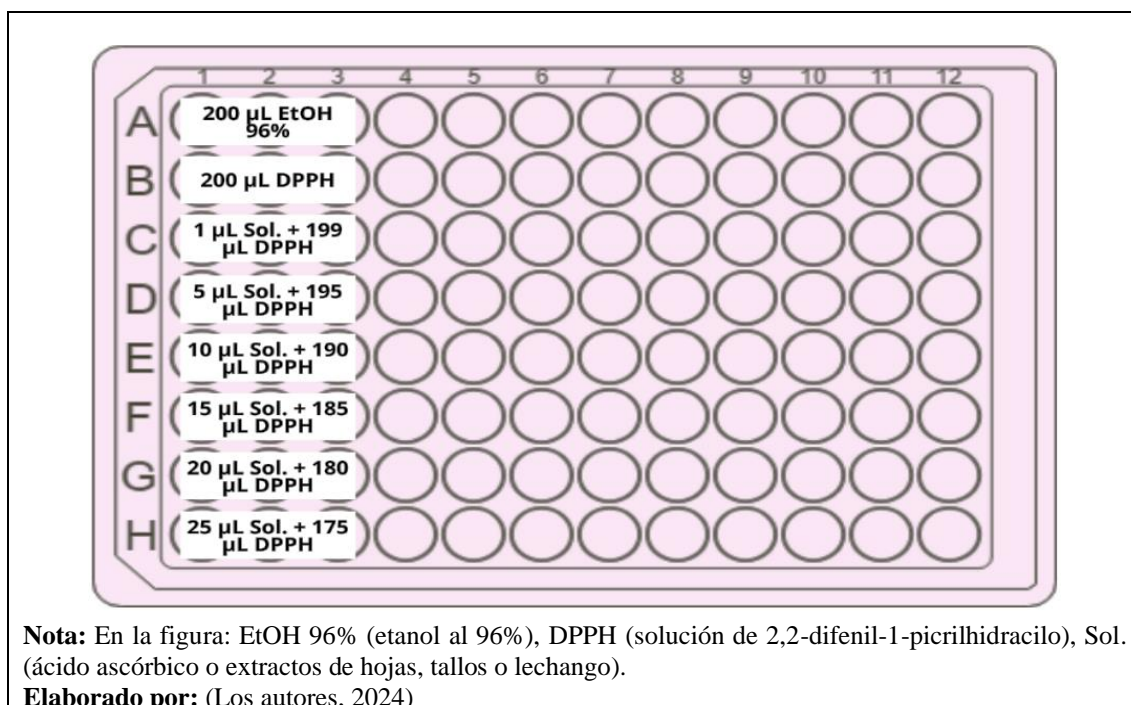
Fuente: (Hamidi et al., 2014)

Anexo 16. Solución DPPH en balón de aforo de 100 mL

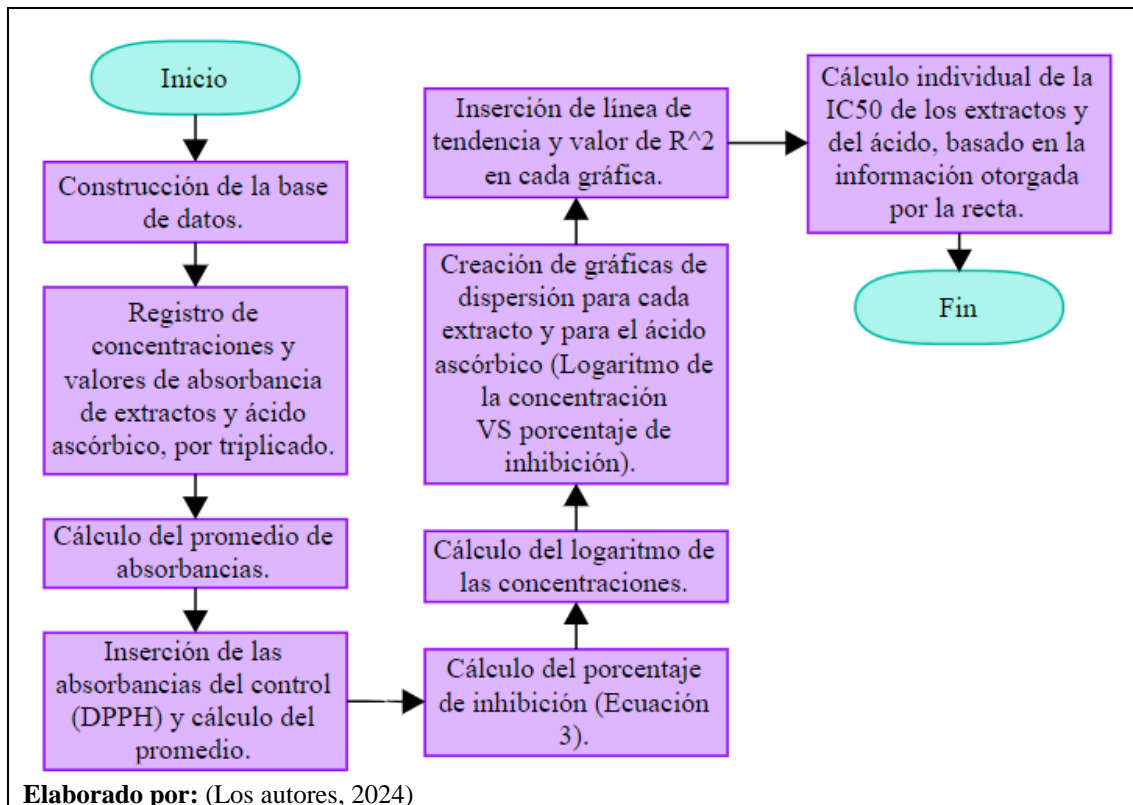


Elaborado por: (Los autores, 2024)

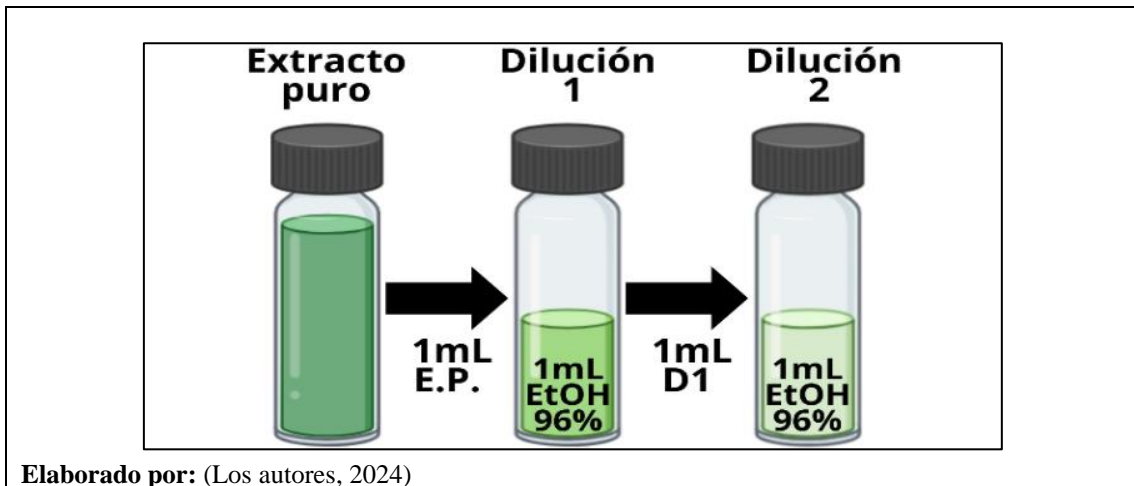
Anexo 17. Esquema del ensayo DPPH en microplaca



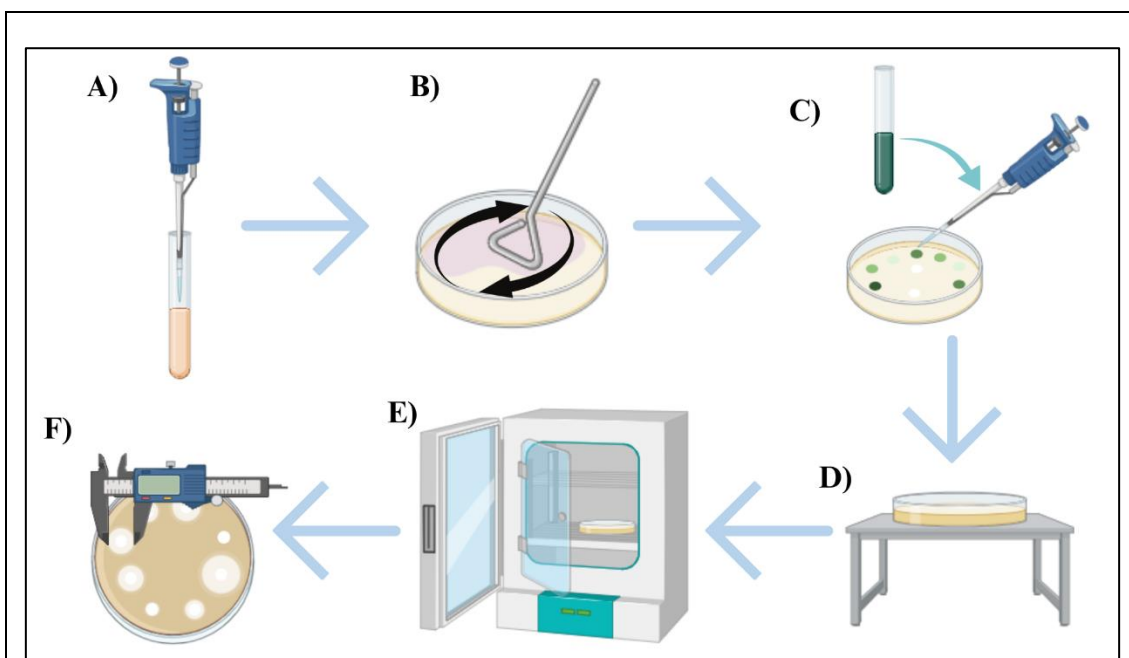
Anexo 18. Diagrama de flujo del análisis estadístico de la actividad antioxidante en Excel



Anexo 19. Esquema del proceso de preparación de diluciones



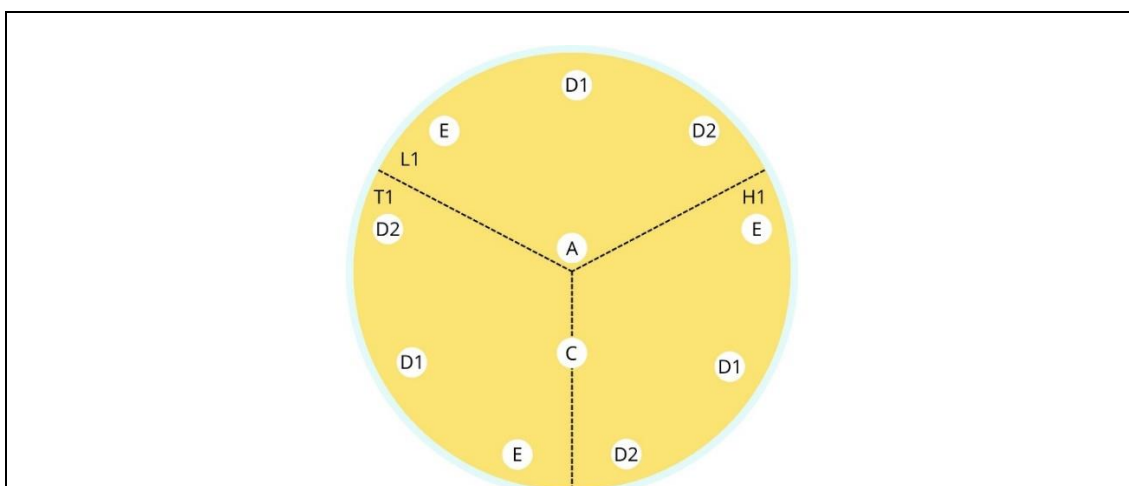
Anexo 20. Diagrama de la elaboración del antibiograma en medio Müller-Hinton



Nota: **A)** Se tomaron 200 μL de la bacteria evaluada; **B)** La bacteria se inoculó en el medio Müller-Hinton, extendiendo completamente en la caja con ayuda de un asa Drigalsky triangular y se dejó secar durante 10 min; **C)** Se colocaron discos en blanco de 6 mm y se embebieron con 15 μL de los extractos al 30%, las diluciones D1 y D2, el control positivo (gentamicina) y el control negativo (agua); **D)** Las cajas se dejaron secar 15 min a temperatura ambiente **E)** Se llevó a incubación a 37°C durante 24 h. **F)** Se midieron los halos.

Elaborado por: (Los autores, 2024)

Anexo 21. Esquema del Antibiograma en la caja Petri

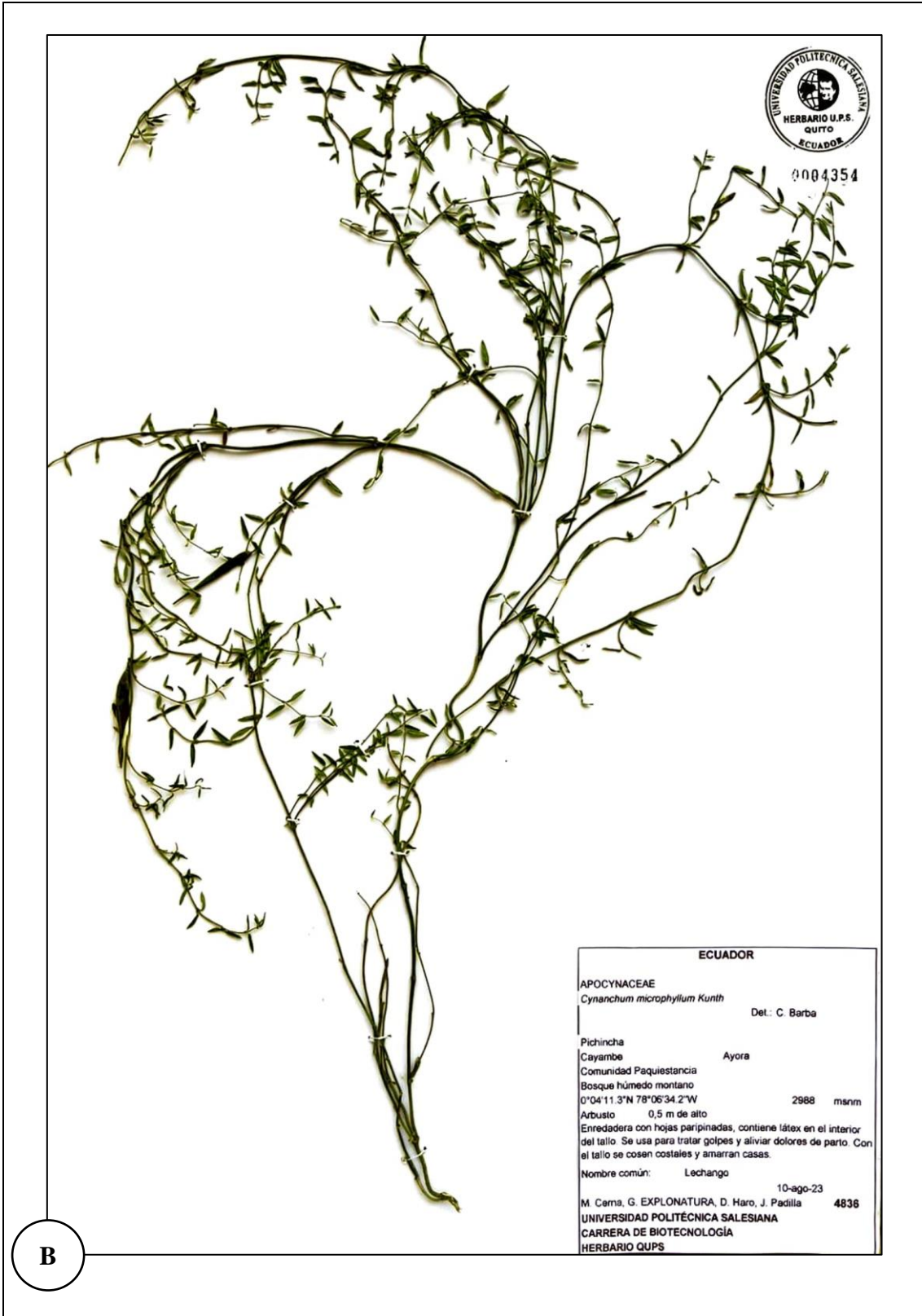


Nota: L1 (Lechango), H1 (Hojas), T1 (Tallos), E (Extracto puro), D1 (Dilución 1), D2 (Dilución 2), C (Control) y A (Antibiótico).

Elaborado por: (Los autores, 2024)

Anexo 22. Carpetas botánicas de (A) Sauco y (B) Lechango





0004354

ECUADOR

APOCYNACEAE

Cynanchum microphyllum Kunth

Det.: C. Barba

Pichincha

Cayambe

Ayora

Comunidad Paquestancia

Bosque húmedo montano

0°04'11.3"N 78°06'34.2"W

2988 msnm

Arbusto 0,5 m de alto

Enredadera con hojas paripinadas, contiene látex en el interior del tallo. Se usa para tratar golpes y aliviar dolores de parto. Con el tallo se cosen costales y amarran casas.

Nombre común: Lechango

10-ago-23

M. Cerna, G. EXPLONATURA, D. Haro, J. Padilla

4836

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

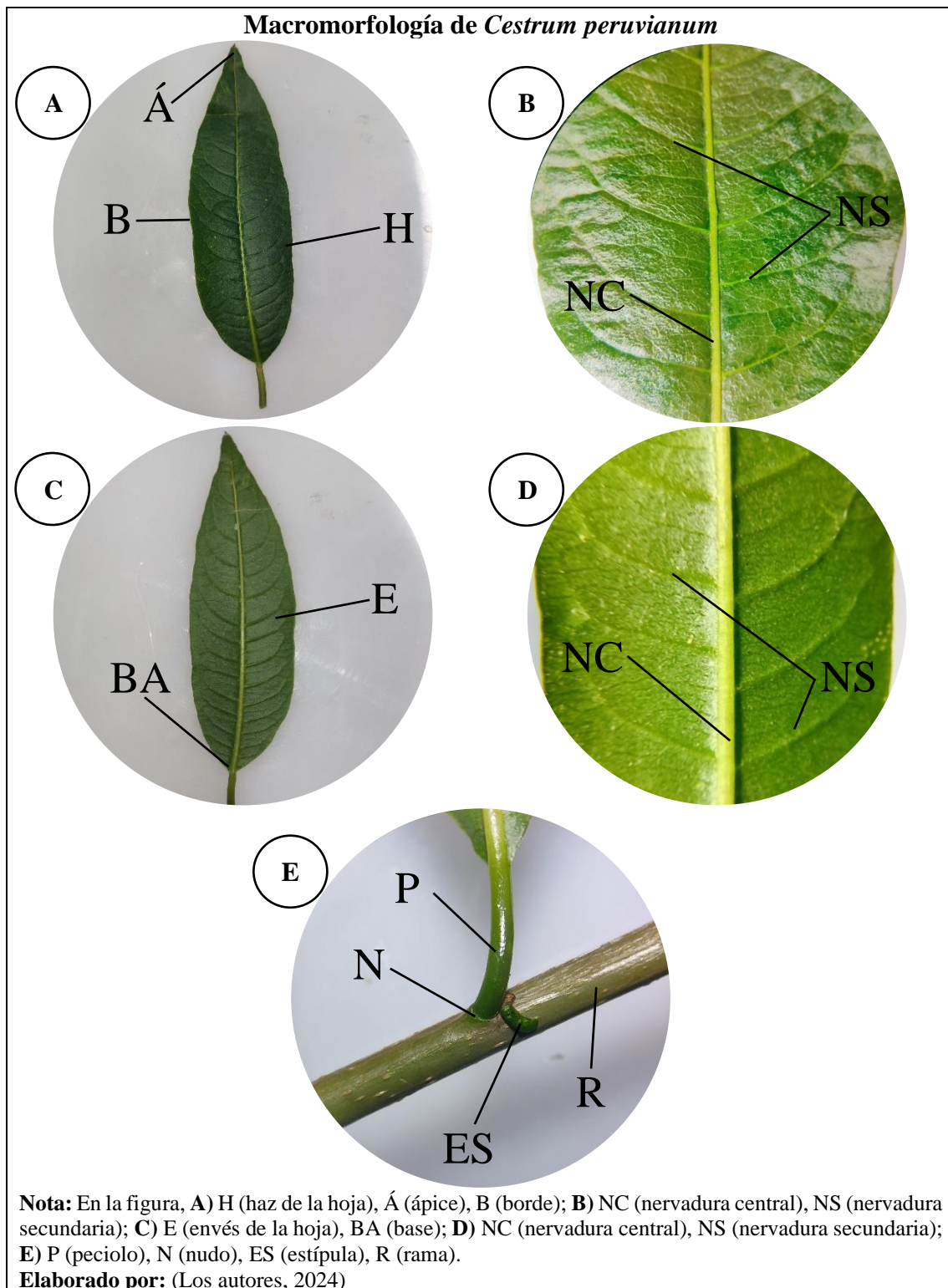
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

HERBARIO QUPS

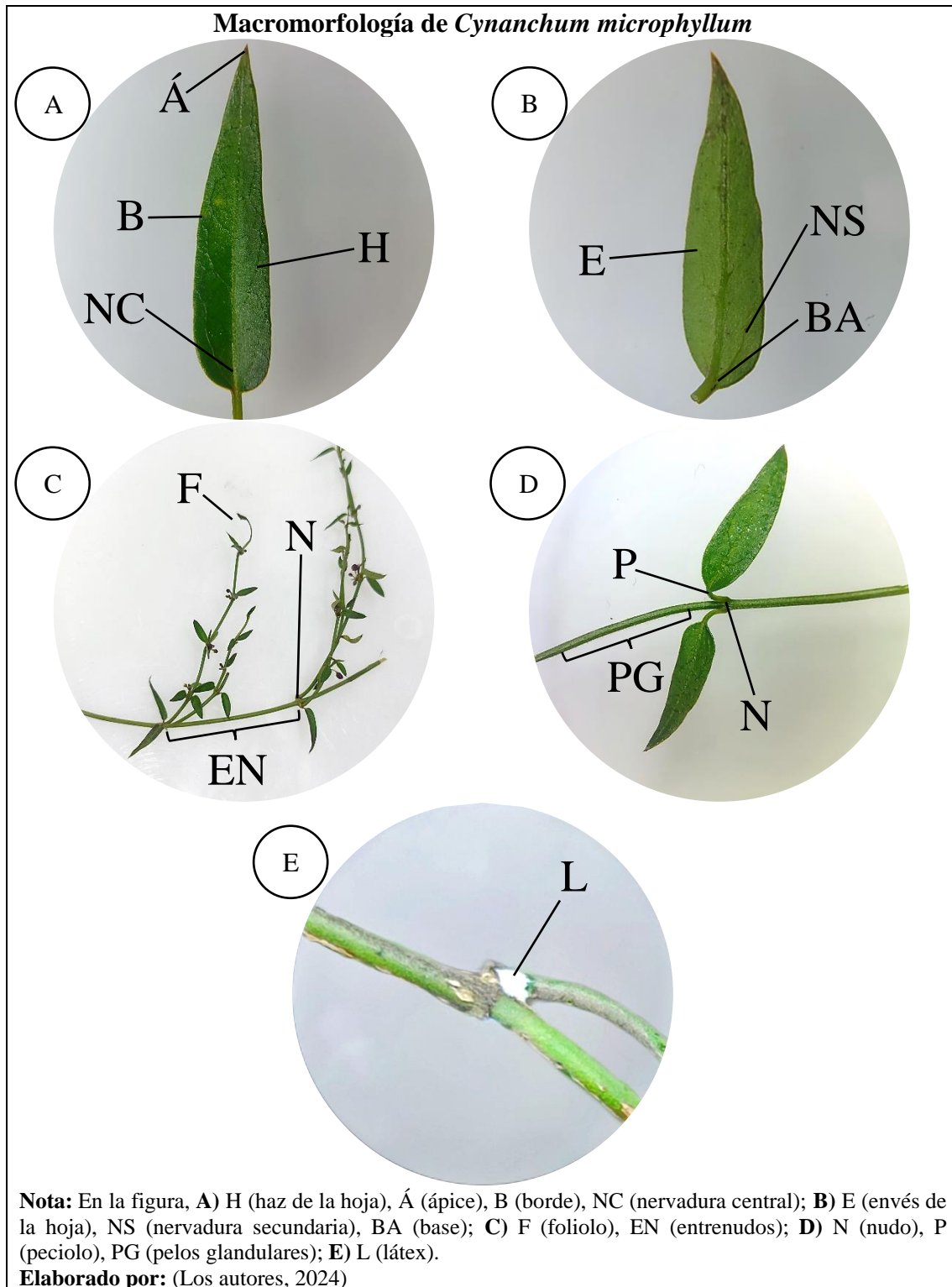
B

Elaborado por: (Los autores, 2024)









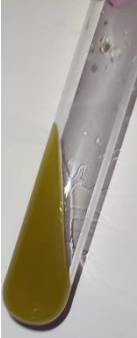


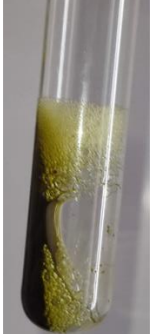
Anexo 23. Macromorfología de *Cestrum peruvianum*






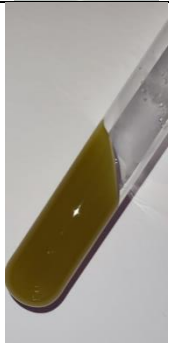


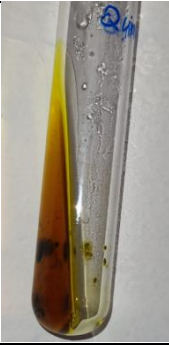
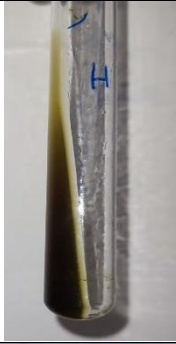



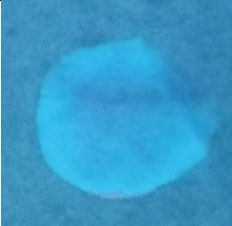
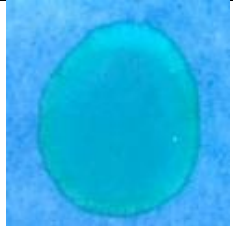





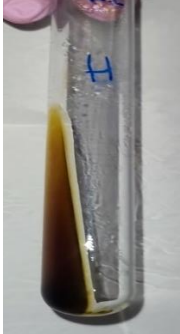


Anexo 24. Macromorfología de *Cynanchum microphyllum*



Anexo 25. Resultados del Tamizaje fitoquímico de cada extracto

Metabolito	Ensayo	Extractos		
		Hojas	Tallos	Lechango
Alcaloides	Ensayo Dragendorff			
	Ensayo Wagner			
Saponinas	Ensayo de espuma			
Flavonoides	Ensayo Shinoda			

Fenoles y Taninos	Ensayo de cloruro férrico			
Resinas	Ensayo de precipitación			
Quinonas	Ensayo Borntrager			
Triterpenos y esteroides	Ensayo Liberman Burchard			
Catequinas	Ensayo carbonato de sodio			

<p>Cumarinas</p>	<p>Ensayo Baljet</p>			
<p>Heterósidos cardiotónicos</p>	<p>Ensayo de Kedde</p>			

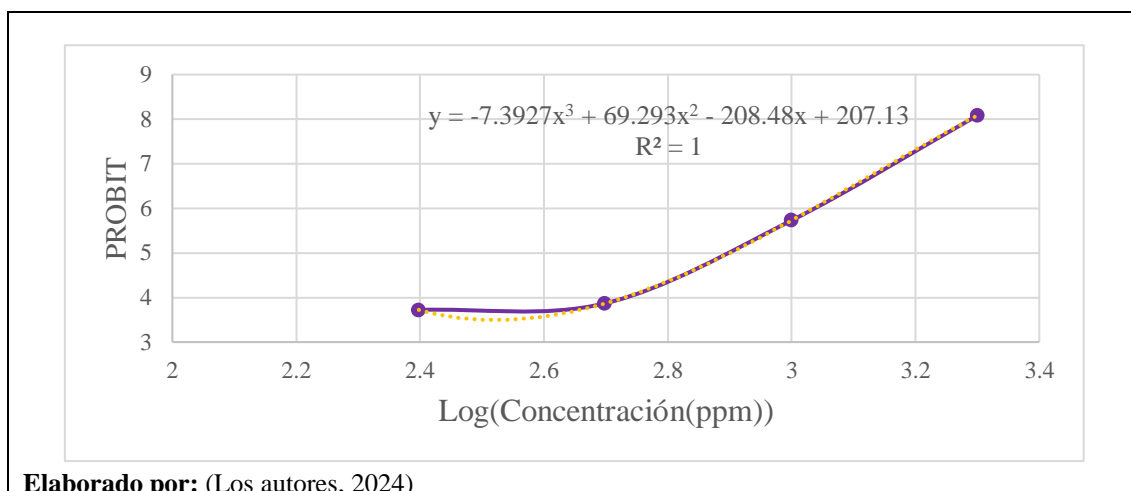
Elaborado por: (Los autores, 2024)

Anexo 26. Datos obtenidos del ensayo de toxicidad para calcular la CL50

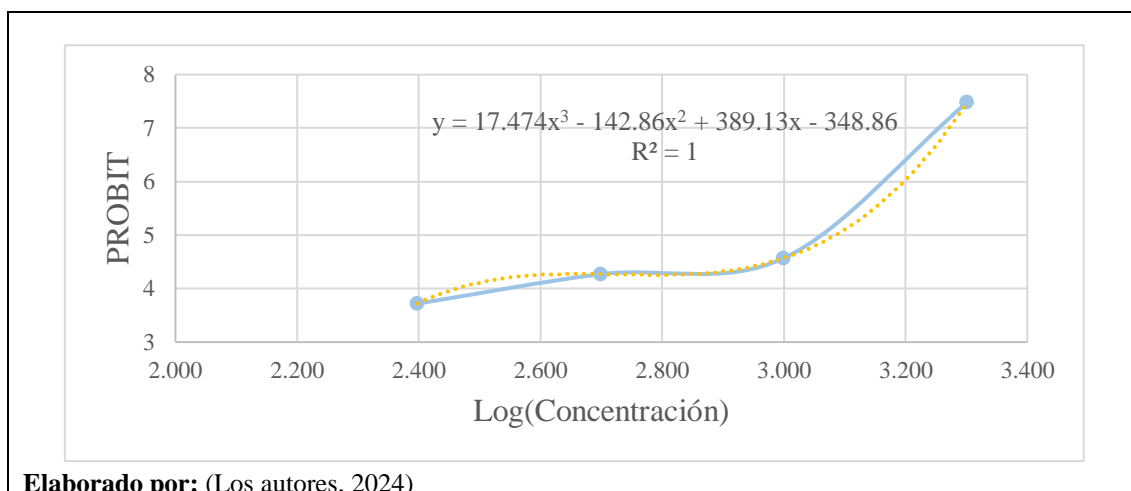
Extracto	Concentración (ppm)	N° Muertos			% Mortalidad			Promedio (% Mortalidad)	Log Concentración	Probit
		1	2	3	1	2	3			
Hojas	2.000	10	10	10	100	100	100	100	3,301	8,09
	1.000	8	7	8	80	70	80	76,67	3,000	5,73
	500	1	1	2	10	10	20	13,33	2,699	3,87
	250	1	2	0	10	20	0	10	2,398	3,72
Tallos	2.000	9	10	10	90	100	100	96,67	3,301	7,48
	1.000	3	4	3	30	40	30	33,33	3,000	4,57
	500	3	1	3	30	10	30	23,33	2,699	4,27
	250	1	1	1	10	10	10	10	2,398	3,72
Lechango	2.000	7	10	10	70	100	100	90	3,301	6,28
	1.000	4	4	7	40	40	70	50	3,000	5
	500	2	3	1	20	30	10	20	2,699	4,16
	250	2	1	1	20	10	10	13,33	2,398	3,87

Elaborado por: (Los autores, 2024)

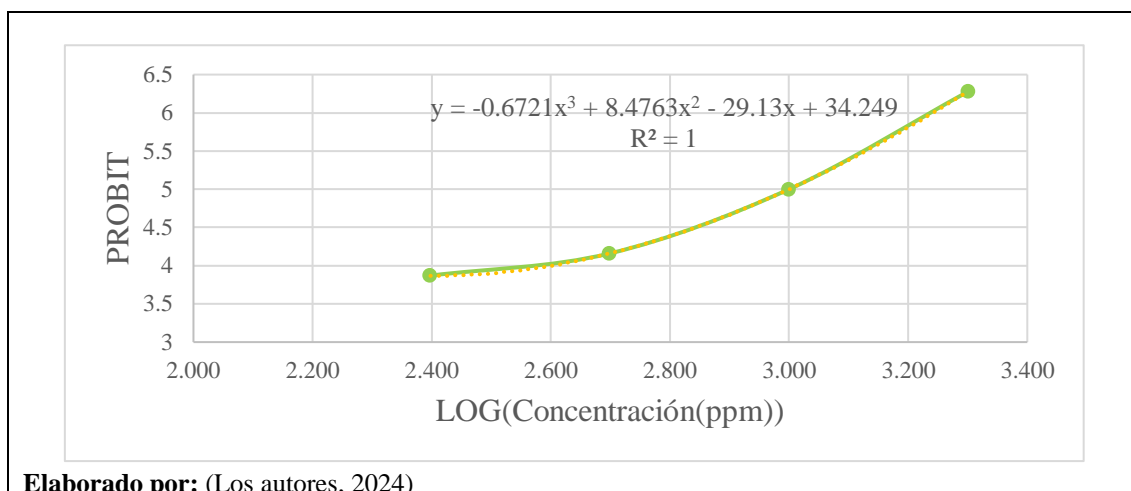
Anexo 27. Gráfica Probit VS Log(Concentración) de hojas de Sauco



Anexo 28. Gráfica Probit VS Log(Concentración) de tallos de Sauco



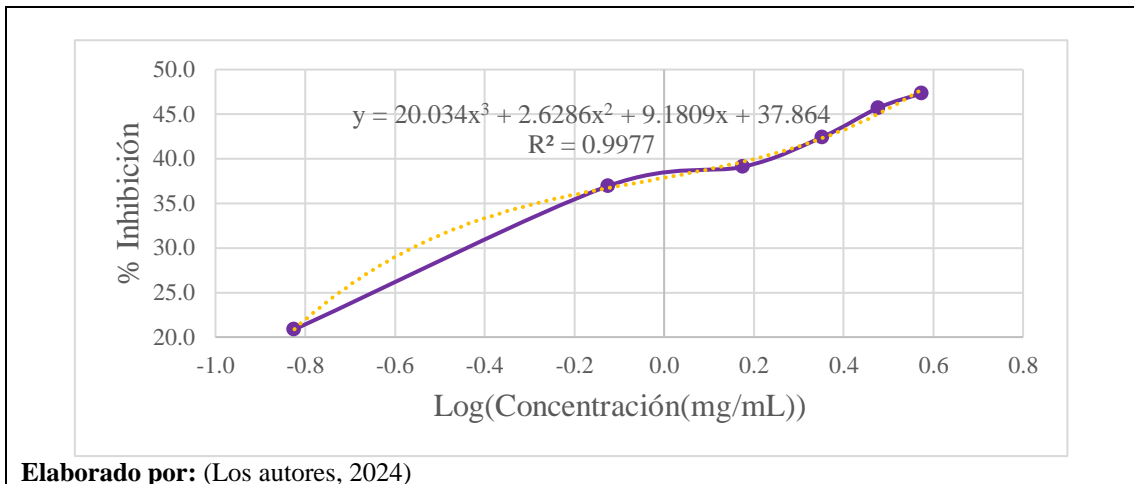
Anexo 29. Gráfica Probit VS Log(Concentración) de planta completa de lechango



Anexo 30. Datos obtenidos del ensayo antioxidante para calcular la IC50

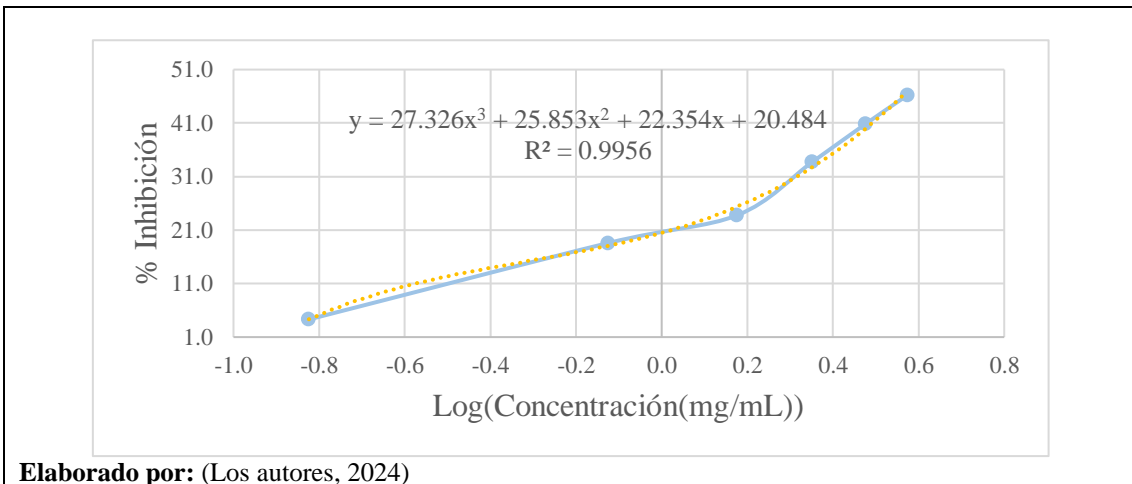
		Absorbancia			Promedio	Log Concentración	% Inhibición	
		1	2	3				
Ensayo de Hojas	DPPH		0,57	0,57	0,57			
	Concentración Hojas (mg/mL)	0,15	0,44	0,45	0,47	0,45	-0,82	20,86
		0,75	0,37	0,35	0,36	0,36	-0,12	36,94
		1,50	0,34	0,35	0,35	0,35	0,18	39,10
		2,25	0,33	0,32	0,33	0,33	0,35	42,43
		3,00	0,32	0,30	0,32	0,31	0,48	45,70
		3,75	0,29	0,30	0,31	0,30	0,57	47,34
Ensayo de tallos	DPPH		0,53	0,52	0,53			
	Concentración Tallos (mg/mL)	0,15	0,50	0,51	0,51	0,50	-0,82	4,30
		0,75	0,44	0,43	0,42	0,43	-0,12	18,58
		1,50	0,40	0,41	0,39	0,40	0,18	23,77
		2,25	0,34	0,37	0,34	0,35	0,35	33,75
		3,00	0,31	0,32	0,30	0,31	0,48	40,90
		3,75	0,28	0,29	0,28	0,28	0,57	46,21
Ensayo de lechango	DPPH		0,53	0,53	0,52			
	Concentración Lechango (mg/mL)	0,15	0,46	0,45	0,45	0,45	-0,82	13,45
		0,75	0,33	0,33	0,33	0,33	-0,12	36,84
		1,50	0,30	0,29	0,29	0,29	0,18	43,85
		2,25	0,23	0,22	0,24	0,23	0,35	56,34
		3,00	0,17	0,18	0,21	0,19	0,48	64,31
		3,75	0,16	0,17	0,17	0,17	0,57	67,88
Ensayo de ácido ascórbico	DPPH		0,54	0,57	0,58			
	Concentración Ácido ascórbico (mg/mL)	0,0025	0,42	0,46	0,45	0,44	-2,60	22,32
		0,0125	0,4	0,39	0,38	0,39	-1,90	31,51
		0,0250	0,36	0,35	0,34	0,35	-1,60	37,75
		0,0375	0,31	0,28	0,31	0,30	-1,43	47,35
		0,0500	0,3	0,24	0,27	0,27	-1,30	52,24
		0,0625	0,27	0,2	0,24	0,24	-1,20	58,48

Anexo 31. Gráfica % Inhibición VS Log(Concentración) de hojas de Sauco

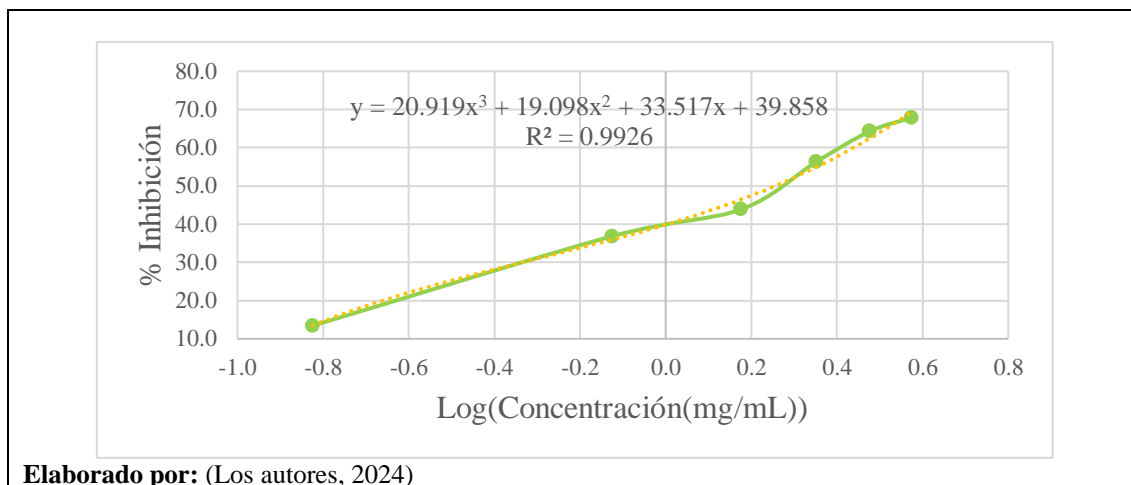


Elaborado por: (Los autores, 2024)

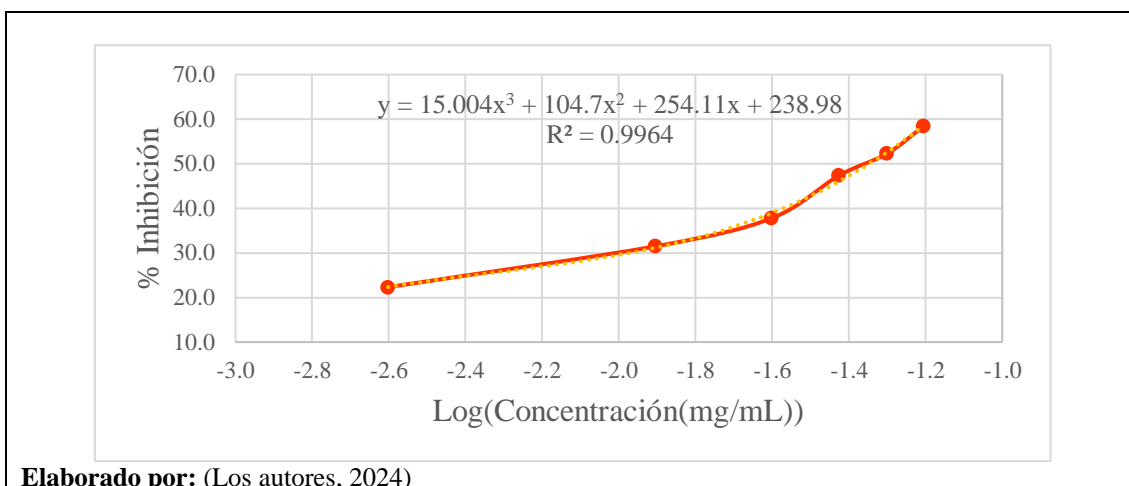
Anexo 32. Gráfica % Inhibición VS Log(Concentración) de tallos de Sauco



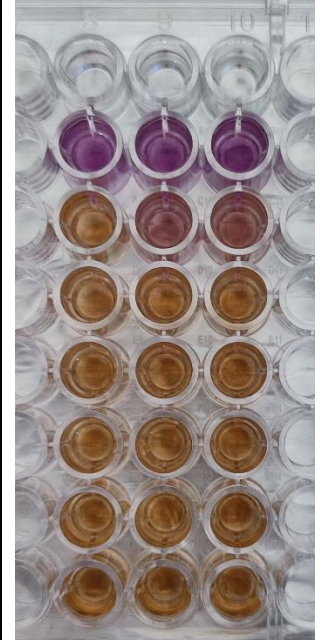


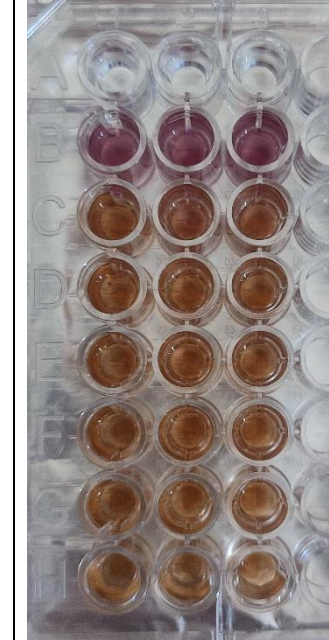
Anexo 33. Gráfica % Inhibición VS Log(Concentración) de planta completa de lechango



Anexo 34. Gráfica % Inhibición VS Log(Concentración) de ácido ascórbico



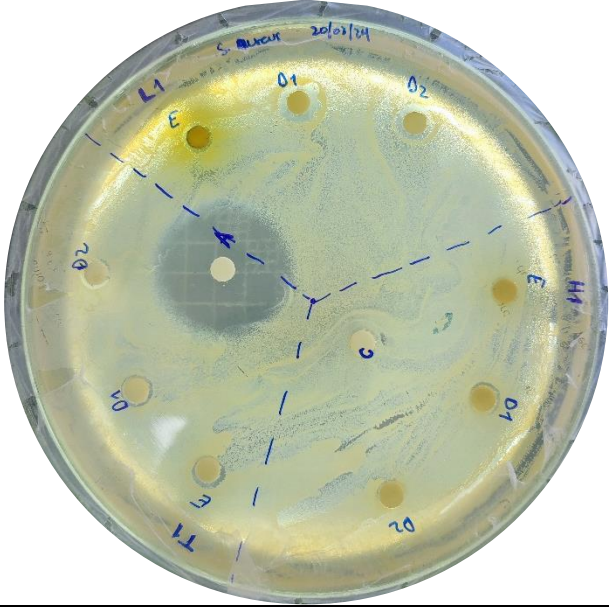
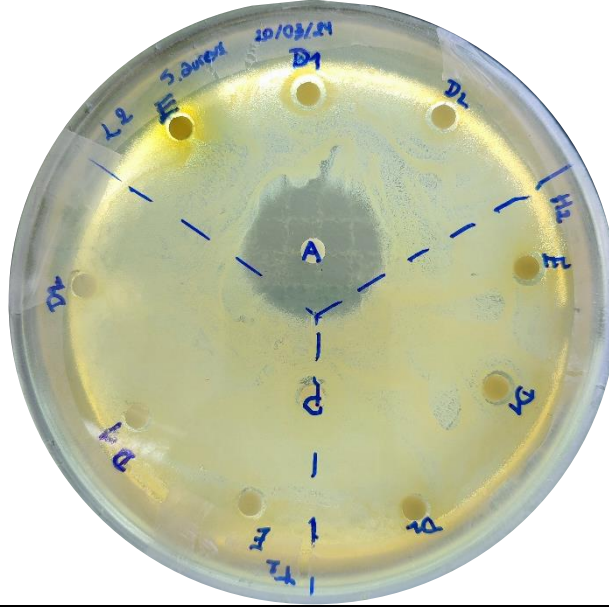
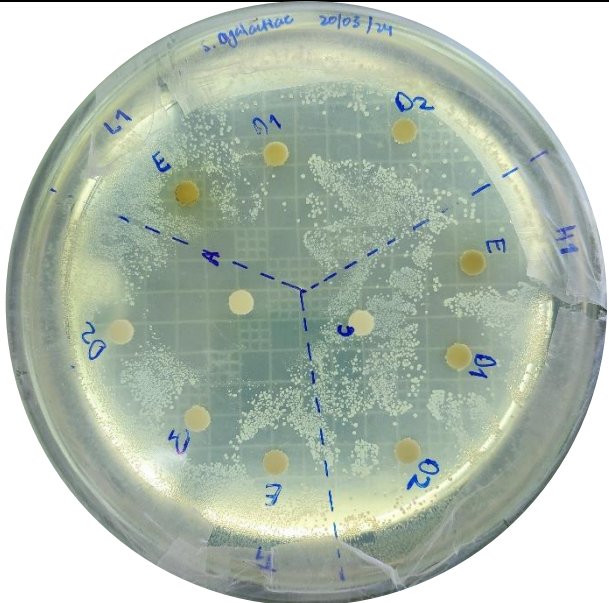
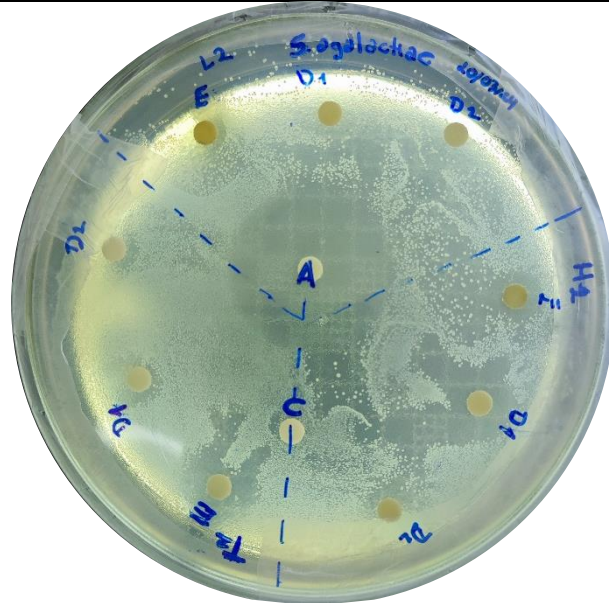
Anexo 35. Resultados de la actividad antioxidante de los extractos y del ácido ascórbico en microplacas

Hojas de Sauco	Tallos de Sauco	Planta completa de Lechango	Ácido Ascórbico
			

Nota: En el anexo se observan los resultados, por triplicado, de los extractos de hojas, tallos y lechango, y del ácido ascórbico, se puede evidenciar los cambios de color de morado a naranja o amarillo, a medida que aumentan las concentraciones.

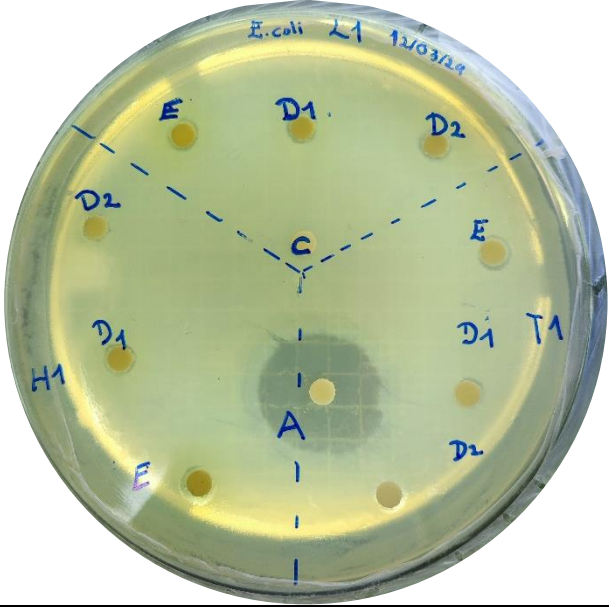
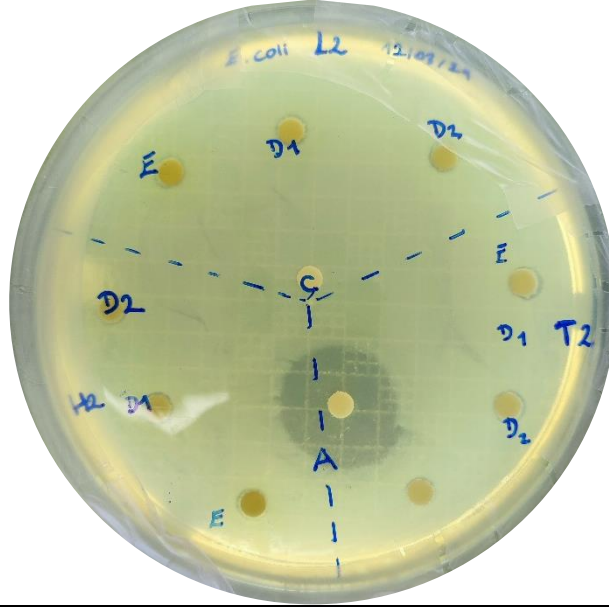
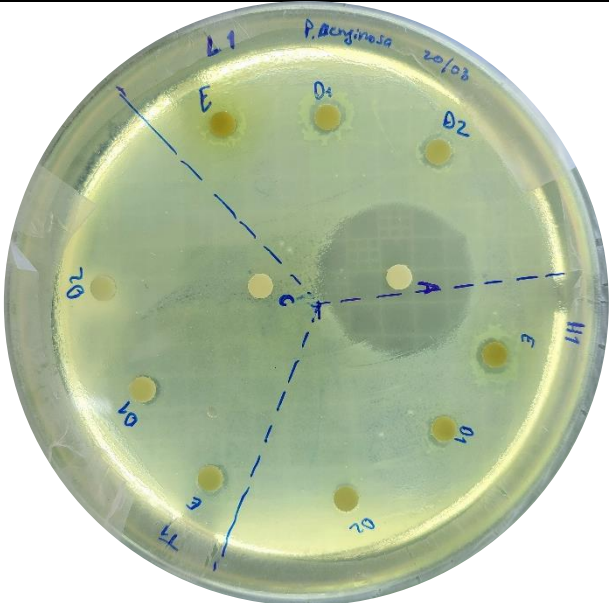
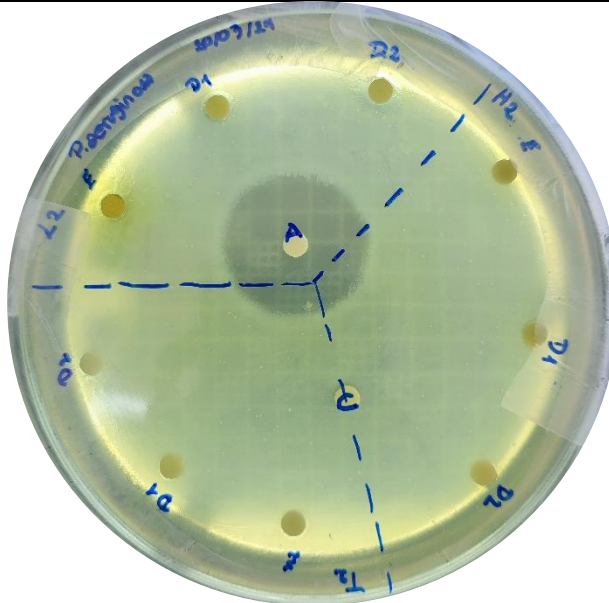
Elaborado por: (Los autores, 2024)

Anexo 36. Resultados de antibiogramas de bacterias Gram positivas

		<i>Staphylococcus aureus</i>		
Bacterias Gram Positivas	Repetición 1		Repetición 2	
				
	Repetición 1		Repetición 2	
				

Elaborado por: (Los autores, 2024)

Anexo 37. Resultados de antibiogramas de bacterias Gram negativas

		<i>Escherichia coli</i>		
Bacterias Gram Negativas	Repetición 1		Repetición 2	
				
	Repetición 1		Repetición 2	
				

Elaborado por: (Los autores, 2024)