



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

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA Y  
TOXICOLÓGICA *IN VITRO* DE EXTRACTOS ALCOHÓLICOS DE  
*SOLANUM NIGRUM* Y *MALVA SYLVESTRIS*, Y SU USO POTENCIAL PARA  
EL TRATAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS CAUSANTES DE LA  
MASTITIS EN EL GANADO VACUNO.**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:  
Ingenieras Biotecnólogas**

**AUTORES: SHEERLY MARIBEL CAIZA CAIZA**

**PRISCILA MONSERRATE MONTENEGRO COBO**

**TUTOR: CECILIA ELIZABETH BARBA GUEVARA**

**Quito-Ecuador**

**2024**

## CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, Sheerly Maribel Caiza Caiza con documento de identificación N° 1725744054 y Priscila Monserrate Montenegro Cobo con documento de identificación N° 1723188577; 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, 15 de Agosto del año 2024

Atentamente,



Sheerly Maribel Caiza Caiza

1725744054



Priscila Monserrate Montenegro Cobo

1723188577

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

Nosotros, Sheerly Maribel Caiza Caiza con documento de identificación No. 1725744054 y Priscila Monserrate Montenegro Cobo con documento de identificación No. 1723188577, 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 de la actividad antioxidante, antibacteriana y toxicológica *in vitro* de extractos alcohólicos de *Solanum nigrum* y *Malva sylvestris*, y su uso potencial para el tratamiento de los microorganismos causantes de la mastitis en el ganado vacuno”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieras Biotecnólogas, 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.

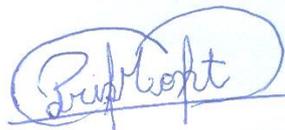
Quito, 15 de Agosto del año 2024

Atentamente,



Sheerly Maribel Caiza Caiza

1725744054



Priscila Monserrate Montenegro Cobo

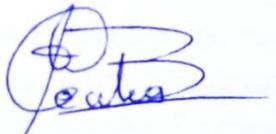
1723188577

## CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Cecilia Elizabeth Barba Guevara con documento de identificación N° 1707482921, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaró que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA Y TOXICOLÓGICA *IN VITRO* DE EXTRACTOS ALCOHÓLICOS DE *SOLANUM NIGRUM* Y *MALVA SYLVESTRIS*, Y SU USO POTENCIAL PARA EL TRATAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS CAUSANTES DE LA MASTITIS EN EL GANADO VACUNO, realizado por Sheerly Maribel Caiza Caiza con documento de identificación N° 1725744054 y por Priscila Monserrate Montenegro Cobo con documento de identificación N° 1723188577, 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, 15 de Agosto del año 2024

Atentamente,



Bioq. Cecilia Elizabeth Barba Guevara MSc.

1707482921

## **DEDICATORIA**

Agradezco a Dios por la salud que me ha otorgado y por la claridad en las decisiones que he tomado cada día, guiándome hacia este logro académico.

Dedico este logro a mis padres, cuyo amor y apoyo incondicional nunca a flaqueado. Son mi fortaleza, mi pilar donde me apoyo cada día. Agradezco a mi hermano, quien ha sido un ejemplo de superación y dedicación. También extiendo mi gratitud a mis mascotas, que han estado a mi lado desde la niñez, acompañándome en cada etapa de mi crecimiento.

A mi mejor amiga, mejor amigo y amigas del colegio, quienes han estado a mi lado en los momentos felices y tristes a lo largo de mi vida personal y académica. Su apoyo constante, risas compartidas y palabras de aliento han sido fundamentales para superar cada desafío y celebrar cada éxito. Gracias por ser una parte indispensable de mi viaje y por su valiosa amistad.

Sheerly Maribel Caiza Caiza.

Dedico este trabajo a Dios, quien ha llenado mi vida de bendiciones y ha permitido que culmine mi formación académica universitaria, durante la cual viví momentos inolvidables y conocí a personas increíbles.

A mis padres, Rubén Montenegro y Martha Cobo, por su apoyo incondicional, amor y confianza, por ser los pilares fundamentales para que yo cumpla cada meta que me propongo. A mi hermano, Fabricio Montenegro, por ser el cómplice en cada paso de mi vida, por su cariño y compañía.

A mis amigos que me brindaron su apoyo y ayuda, en especial a Samantha Vasco y Tania Aymacaña, quienes con cariño me han acompañado en las diferentes etapas de mi vida. Gracias por sus palabras reconfortantes y su apoyo incondicional, por estar a mi lado en los momentos de alegrías y tristezas, gracias por nunca soltar mi mano.

Priscila Monserrate Montenegro Cobo

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecemos a Dios por darnos fortaleza y dedicación para la elaboración de este proyecto y brindarnos la sabiduría para solucionar cada problema que se nos presentó en el camino.

Agradecemos a la Universidad Politécnica Salesiana por abrirnos las puertas para nuestra formación profesional, convirtiéndose en un espacio de aprendizaje y convivencia para formarnos como profesionales basados en valores, ética y moral. Este camino de enseñanza no hubiera sido posible sin el valioso apoyo de cada docente que nos acompañó a lo largo de este recorrido.

Expresamos nuestro más sincero agradecimiento a nuestra tutora, Dra. Cecilia Barba, por su tiempo y paciencia al brindarnos sus valiosos conocimientos, lo que hizo posible el desarrollo de esta investigación. Gracias a sus exigencias nos fomentó a ser personas más críticas, observadoras, ordenadas y capaces de encontrar soluciones sin rendirnos a los obstáculos.

Nuestra gratitud profunda a los Laboratorios de Ciencia de la Vida por brindarnos acceso a sus instalaciones. En particular, queremos agradecer a nuestro profesor de laboratorio, Bryan Ramos, por su constante disposición a ayudarnos y guiarnos en cada paso del proceso, por nunca dejarnos solas y estar al pendiente de nuestros requerimientos, más que un profe se convirtió en un amigo.

También extendemos nuestro agradecimiento a Henry Solís, colaborador de investigación de nuestro proyecto, quien compartió generosamente su conocimiento en el área de Biología Molecular, siempre dispuesto a resolver nuestras dudas y ofrecernos valiosos consejos.

A todos nuestros amigos por ser parte de este proceso importante para la culminación de nuestra formación profesional, gracias por su amistad y compartir con nosotras nuestras alegrías, tristezas y preocupaciones. Infinitas gracias por el apoyo incondicional que nos brindaron.

## Resumen

El exceso de terapias con antibióticos en el tratamiento de la mastitis en bovinos puede ocasionar que los microorganismos patógenos se adapten y desarrollen resistencia a los fármacos sintéticos. El objetivo del presente estudio fue evaluar las características taxonómicas, fitoquímicas, antioxidantes, antibacterianas y toxicológicas de las especies *Solanum nigrum* y *Malva sylvestris* utilizadas para el control de mastitis en bovinos. Se realizó la identificación molecular y taxonómica de las especies en estudio. Se prepararon extractos etanólicos al 96% de hojas y tallos de las especies vegetales. Se realizó el tamizaje fitoquímico para determinar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios, además se evaluó la actividad antibacteriana por el método *Kirby-Bauer*, la actividad antioxidante por el método DPPH y la actividad toxicológica en *Artemia salina*. En cuanto al análisis antibacteriano se observó que las plantas motivo del presente estudio poseen actividad antibacteriana frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*. En la actividad antioxidante los valores de IC<sub>50</sub> en hojas y tallos de *M. sylvestris* fueron 6,728 mg/mL y 5,048 mg/mL respectivamente, mientras que en hojas y tallos de *S. nigrum* se obtuvo 6,509 mg/mL y 22,85 mg/mL respectivamente. Por otro lado, en la evaluación toxicológica resultaron altamente tóxicos los tallos de *S. nigrum* (CL<sub>50</sub>=56,23 µg/mL) y las hojas de *M. sylvestris* (CL<sub>50</sub>=77,62 µg/mL) y *S. nigrum* (CL<sub>50</sub>=38,90 µg/mL), mientras que los tallos de *M. sylvestris* son altamente tóxicos (CL<sub>50</sub>=3,66 µg/mL). Se concluye que las especies en estudio por sus propiedades antioxidantes y antibacterianas pueden ser consideradas para el tratamiento de la mastitis en el ganado vacuno.

**Palabras clave:** mastitis, antioxidante, antibacteriana, toxicológica, *Solanum nigrum*, *Malva sylvestris*

## Abstract

Excessive antibiotic therapies in the treatment of mastitis in cattle can cause pathogenic microorganisms to adapt and develop resistance to synthetic drugs. The objective of the present study was to evaluate the taxonomic, phytochemical, antioxidant, antibacterial and toxicological characteristics of the species *Solanum nigrum* and *Malva sylvestris* used for the control of mastitis in cattle. The molecular and taxonomic identification of the species under study was carried out. Ethanolic extracts of 96% of leaves and stems of plant species were prepared. Phytochemical screening was carried out to qualitatively determine the presence of secondary metabolites, in addition the antibacterial activity was evaluated by the *Kirby-Bauer* method, the antioxidant activity by the DPPH method and the toxicological activity in *Artemia salina*. Regarding the antibacterial analysis, it was observed that the plants involved in the present study have antibacterial activity against *S. aureus* and *S. epidermidis*. In the antioxidant activity, the IC<sub>50</sub> values in leaves and stems of *M. sylvestris* were 6.728 mg/mL and 5.048 mg/mL respectively, while in leaves and stems of *S. nigrum* 6.509 mg/mL and 22.85 mg/mL were obtained. mL respectively. On the other hand, in the toxicological evaluation the stems of *S. nigrum* (CL<sub>50</sub>=56.23 µg/mL) and the leaves of *M. sylvestris* (CL<sub>50</sub>=77.62 µg/mL) and *S. nigrum* (CL<sub>50</sub>=38.90 µg/mL) were highly toxic, while the stems of *M. sylvestris* are highly toxic (CL<sub>50</sub>=3.66 µg/mL). It is concluded that the species under study, due to their antioxidant and antibacterial properties, can be considered for the treatment of mastitis in cattle.

**Keywords:** mastitis, antioxidant, antibacterial, toxicological, *Solanum nigrum*, *Malva sylvestris*

## Índice de contenido

<b>1</b>	<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Fundamentación Teórica.....</b>	<b>4</b>
2.1	<i>Mastitis bovina</i> .....	4
2.1.1	Definición.....	4
2.1.2	Agentes infecciosos.....	4
2.1.3	Clasificación.....	5
2.1.4	Factores de riesgo.....	5
2.2	<i>Etnobotánica</i> .....	6
2.2.1	Etnoveterinaria.....	6
2.2.2	Fitoterapia en la mastitis.....	6
2.3	<i>Solanum nigrum</i> .....	7
2.3.1	Descripción botánica.....	7
2.3.2	Usos medicinales.....	8
2.4	<i>Malva sylvestris</i> .....	9
2.4.1	Descripción botánica.....	9
2.4.2	Usos medicinales.....	10
2.5	<i>Metabolitos secundarios</i> .....	10
2.5.1	Clasificación y propiedades farmacológicas.....	11
2.6	<i>Fitoquímica</i> .....	12
2.6.1	Métodos de extracción de fitoquímicos.....	12
2.6.2	Tamizaje fitoquímico.....	12
2.7	<i>Secuencias Barcode</i> .....	13
2.8	<i>Actividad antibacteriana</i> .....	14
2.8.1	Método cualitativo y cuantitativo.....	14
2.9	<i>Actividad antioxidante</i> .....	15
2.9.1	Método DPPH.....	15
2.10	<i>Actividad toxicológica</i> .....	16
2.10.1	Ensayos toxicológicos en <i>Artemia salina</i> .....	16
<b>3</b>	<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>18</b>
3.1	<i>Recolección del material vegetal</i> .....	18
3.2	<i>Elaboración de la carpeta botánica</i> .....	18
3.2.1	Prensado y secado.....	18
3.2.2	Montaje y etiquetado.....	19
3.3	<i>Identificación molecular</i> .....	19
3.3.1	Extracción de ADN y amplificación PCR.....	19
3.3.2	Secuenciación.....	21
3.3.3	Análisis bioinformático.....	21
3.4	<i>Análisis farmacognóstico</i> .....	22
3.4.1	Desinfección y secado.....	22
3.4.2	Molienda y tamizaje.....	22

3.5	<i>Control de calidad del material vegetal seco</i> .....	22
3.5.1	Porcentaje de humedad .....	22
3.5.2	Porcentaje de cenizas totales.....	23
3.6	<i>Obtención del extracto etanólico</i> .....	24
3.7	<i>Control de calidad del extracto etanólico</i> .....	24
3.7.1	Sólidos totales .....	24
3.7.2	Índice de refracción.....	24
3.7.3	Determinación de pH .....	25
3.8	<i>Tamizaje fitoquímico</i> .....	26
3.8.1	Identificación de fenoles .....	26
3.8.2	Identificación de taninos .....	26
3.8.3	Identificación de flavonoides .....	26
3.8.4	Identificación de saponinas.....	26
3.8.5	Identificación de glucósidos cardiotónicos.....	26
3.8.6	Identificación de resinas .....	27
3.8.7	Identificación de lactonas .....	27
3.8.8	Identificación de triterpenos esteroides .....	27
3.8.9	Identificación de alcaloides.....	27
3.8.10	Identificación de catequinas .....	28
3.8.11	Identificación de cumarinas.....	28
3.9	<i>Evaluación de la actividad antibacteriana</i> .....	28
3.9.1	Preparación del inóculo bacteriano.....	28
3.9.2	Elaboración del antibiograma .....	29
3.9.3	Interpretación de resultados .....	30
3.10	<i>Evaluación de la actividad antioxidante</i> .....	30
3.10.1	Preparación de la solución DPPH.....	30
3.10.2	Preparación del estándar de ácido ascórbico .....	30
3.10.3	Preparación de las soluciones de extracto a analizar.....	30
3.10.4	Determinación del porcentaje de inhibición e IC50 .....	31
3.11	<i>Evaluación de la actividad toxicológica</i> .....	32
3.11.1	Descapsulación .....	32
3.11.2	Incubación de huevos .....	32
3.11.3	Ensayo de toxicidad.....	32
3.11.4	Conteo de nauplios muertos .....	33
3.11.5	Concentración letal 50 y grado de toxicidad .....	33
<b>4</b>	<b>Resultados y Discusión</b> .....	<b>35</b>
4.1	<i>Recolección del material vegetal y elaboración de la carpeta botánica</i> .....	35
4.2	<i>Identificación molecular</i> .....	36
4.2.1	Análisis bioinformático.....	36
4.3	<i>Control de calidad del material vegetal seco</i> .....	37
4.4	<i>Obtención del extracto etanólico</i> .....	37
4.5	<i>Control de calidad del extracto etanólico</i> .....	38
4.6	<i>Tamizaje fitoquímico</i> .....	38

4.7	<i>Actividad antibacteriana</i> .....	39
4.8	<i>Actividad antioxidante</i> .....	42
4.9	<i>Actividad toxicológica</i> .....	46
<b>5</b>	<b>Conclusiones y Recomendaciones</b> .....	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>Bibliografía</b> .....	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Anexos</b> .....	<b>56</b>

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b> Etapas del desarrollo de la patogénia de la mastitis .....	5
<b>Tabla 2</b> Taxonomía de <i>Solanum nigrum</i> .....	8
<b>Tabla 3</b> Taxonomía de <i>Malva sylvestris</i> .....	9
<b>Tabla 4</b> Clasificación y propiedades farmacológicas de los metabolitos secundarios ..	11
<b>Tabla 5</b> Componentes para la muestra PCR .....	21
<b>Tabla 6</b> Composición de los discos de papel filtro para la elaboración del antibiograma .....	29
<b>Tabla 7</b> Preparación de extractos de <i>Malva sylvestris</i> para evaluar la actividad antioxidante. ....	31
<b>Tabla 8</b> Preparación de extractos de <i>Solanum nigrum</i> para evaluar la actividad antioxidante. ....	31
<b>Tabla 9</b> Escala del grado de toxicidad .....	33
<b>Tabla 10</b> Resultados del porcentaje de humedad y cenizas totales .....	37
<b>Tabla 11</b> Resultados de los parámetros fisicoquímicos de los extractos vegetales .....	38
<b>Tabla 12</b> Resultados de la identificación cualitativa de compuestos fitoquímicos .....	38
<b>Tabla 13</b> Resultados de la evaluación antibacteriana de los extractos vegetales a las 24 y 48 horas .....	40
<b>Tabla 14</b> Resultados de la evaluación de la actividad antioxidante de los extractos vegetales .....	42
<b>Tabla 15</b> Resultados de la evaluación de la actividad toxicológica de los extractos vegetales .....	47

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> Estructura física de <i>Solanun nigrum</i> .....	8
<b>Figura 2</b> Estructura física de <i>Malva sylvestris</i> .....	9
<b>Figura 3</b> Medición de halos en antibiograma .....	15
<b>Figura 4</b> Elaboración de la carpeta botánica.....	18
<b>Figura 5</b> Cebadores de <i>matK</i> .....	21
<b>Figura 6</b> Diagrama del procedimiento para determinar el porcentaje de humedad.....	23
<b>Figura 7</b> Diagrama del procedimiento para determinar el porcentaje de cenizas totales .....	23
<b>Figura 8</b> Diagrama del procedimiento para determinar sólidos totales.....	24
<b>Figura 9</b> Diagrama del procedimiento para determinar el índice de refracción .....	25
<b>Figura 10</b> Diagrama del procedimiento para determinar pH.....	25
<b>Figura 11</b> Carpeta botánica de las especies estudiadas. ....	35
<b>Figura 12</b> Gel de electroforesis de la región <i>matk</i> de los productos PCR .....	36
<b>Figura 13</b> Gráfica del porcentaje de inhibición del extracto de hojas de <i>S. nigrum</i> .....	44
<b>Figura 14</b> Grafica del porcentaje de inhibición del extracto de tallos de <i>S. nigrum</i> .....	44
<b>Figura 15</b> Gráfica del porcentaje de inhibición del extracto de hojas de <i>M. sylvestris</i> .	44
<b>Figura 16</b> Gráfica del porcentaje de inhibición del extracto de tallos de <i>M. sylvestris</i> .	44
<b>Figura 17</b> Comparación de los valores de IC50 (mg/mL) de los extractos vegetales ...	45

## Índice de Ecuaciones

<b>Ecuación 1</b> Determinación del porcentaje de inhibición .....	32
<b>Ecuación 2</b> Determinación del porcentaje de mortalidad .....	33

## Índice de Anexos

<b>Anexo 1</b> Condiciones del termociclador para el proceso de amplificación de secuencias .....	56
<b>Anexo 2</b> Resultados control de calidad del material vegetal seco .....	57
<b>Anexo 3</b> Resultados del control de calidad del extracto vegetal .....	58
<b>Anexo 4</b> Resultados de la evaluación de la actividad antioxidante.....	59
<b>Anexo 5</b> Resultados de la evaluación de la actividad toxicológica.....	61
<b>Anexo 6</b> Resultados tamizaje fitoquímico.....	62
<b>Anexo 7</b> Resultados de los antibiogramas a las 24 horas.....	65
<b>Anexo 8</b> Resultados de los antibiogramas de <i>S. epidermidis</i> y de <i>S. aureus</i> . .....	67
<b>Anexo 9</b> Secuencias enviadas por la empresa Macrogen.....	68
<b>Anexo 10</b> Resultados de la plataforma BOLDSYSTEMS.....	69

## **1 Introducción**

La mastitis es una de las enfermedades con mayor prevalencia e importancia en el ganado lechero, se estima que alrededor del 15% al 20% de las vacas en un rodeo lechero se encuentran afectadas por alguna forma de mastitis (González & Vidal, 2021). A nivel mundial es considerada como una de las enfermedades infecciosas más costosas de las vacas lecheras, es la responsable de la disminución de la producción del 4 al 30% de la leche, además incrementa los costos de tratamiento, servicios veterinarios y genera pérdidas tanto en leche como en animales (Diaz-Monroy et al., 2022).

La mastitis se caracteriza por la inflamación de las glándulas mamarias, su desarrollo se encuentra estrechamente relacionado con los factores medioambientales en los que se encuentra el ganado y factores a nivel de producción, vinculados al mal manejo y fallas en la máquina de ordeño, favoreciendo a la aparición de microorganismos patógenos. En la actualidad se han reportado más de 100 microorganismos causantes de infección intramamaria, los mismos que van a ingresar al interior de la ubre por el conducto glandular o pezón, ocasionando la inflamación del tejido mamario y como consecuencia dolor, molestia y estrés en los animales (González & Vidal, 2021b).

Generalmente el tratamiento de la mastitis se realiza con antibióticos, los mismos que van a tener repercusiones en la cantidad y calidad de la leche, afectando también a los productos de procesamiento, en los cuales se va a reducir el tiempo de conservación, calidad, sabor y aroma (Diaz-Monroy et al., 2022). Dentro de este panorama se puede mencionar que el exceso de terapias con antibióticos va a generar residuos en la leche que se convierten en un problema para el consumidor, afectando a la salud pública, además, puede ocasionar que los microorganismos se adapten y desarrollen resistencia a los fármacos sintéticos (González & Vidal, 2021b). Las comunidades indígenas alrededor del mundo han utilizado las plantas desde la antigüedad en base

a su conocimiento empírico para la prevención y control de las enfermedades del ganado, de esta manera aparece la etno-veterinaria y la fito-farmacología, basadas en la aplicación de la medicina tradicional, buscan aprovechar los principales compuestos orgánicos producidos en la célula vegetal, mediante el uso de las plantas y sus extractos (Bravo et al., 2023).

En el estudio realizado por Moura et al. (2021) sobre el uso de productos naturales en la medicina veterinaria en bovinos, menciona que las plantas medicinales se utilizan para el tratamiento de aproximadamente 15 problemas de salud en el ganado, destacando el tratamiento de inflamaciones especialmente de la ubre. En los reportes obtenidos se evidenció que entre las partes de la planta a utilizar se encuentran el fruto, hojas, tallos, cogollos y semillas, estructuras destinadas a la fabricación de preparados o remedios herbales, que pueden ser en base a una o la combinación de varias especies vegetales.

En la comunidad de Paquiestancia se desarrollan emplastos o preparaciones empíricas en base al conocimiento ancestral con las especies *Cinanchum mycophyllum*, *Sabucus nigra L.*, *Malva sylvestris* y *Solanum nigrum* para mejorar las molestias del ganado ocasionadas por la mastitis. Es así como surge la importancia del desarrollo de este proyecto, para fomentar la búsqueda de alternativas eficaces como sustitutos de los químicos convencionales, que no causen daños al ambiente y a la salud pública y motivar a la investigación académica de la Universidad Politécnica Salesiana con la vinculación a la comunidad, no obstante, se espera que los resultados de la investigación puedan ser utilizados como punto de partida para la elaboración de fitofármacos que ayuden al tratamiento de la mastitis.

Por lo expuesto anteriormente, surge la necesidad de saber si ¿Los extractos alcohólicos de *Solanum nigrum* y *Malva sylvestris* poseen actividad antibacteriana, antioxidante y toxicológica?,

por tanto, esta investigación tuvo como objetivo principal evaluar las características antibacterianas, antioxidantes y toxicológicas de las especies *Solanum nigrum* y *Malva sylvestris*, utilizadas para el control de los microorganismos causantes de la mastitis en bovinos.

Con respecto a los objetivos específicos se identificó: La taxonomía de las especies vegetales y sus secuencias moleculares mediante Barcode, análisis de los compuestos fitoquímicos de las especies vegetales en extracto etanólico, el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico a concentraciones diferentes de antibiótico en medio Muller Hinton, el efecto antioxidante *in vitro* del extracto etanólico por espectrofotometría y el porcentaje de mortalidad que ocasiona el extracto etanólico en larvas de *Artemia salina*

## **2 Fundamentación Teórica**

### **2.1 Mastitis bovina**

#### **2.1.1 Definición**

El término mastitis se origina de las palabras griegas “mastos” que significa “mamas” e “itis” que quiere decir “hinchazón de”. Por lo tanto, la mastitis es una enfermedad intramamaria, que se caracteriza por la inflamación del tejido de la ubre, específicamente en las glándulas mamarias, como respuesta a infecciones causadas por microorganismos. Esta respuesta inflamatoria genera cambios físicos o químicos en las glándulas mamarias provocando dolor, estrés y malestar en las vacas y como consecuencia impactos negativos en la producción, bienestar animal y calidad de la leche (Sharun et al., 2021).

#### **2.1.2 Agentes infecciosos**

Los agentes infecciosos comúnmente relacionados con la aparición de la mastitis bovina son los pertenecientes a los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* y algunas bacterias Gram negativas. Estos patógenos pueden clasificarse en: contagiosos y ambientales. Los patógenos contagiosos como *S. aureus*, *S. dysgalactiae* y *S. agalactiae* se caracterizan por adaptarse a sobrevivir dentro de la glándula mamaria, su transmisión se da de una vaca infectada a una no infectada generalmente durante el proceso de ordeño por la contaminación de las pezoneras y de las manos de los ordeñadores (Naranjo-Lucena & Slowey, 2023).

Los patógenos ambientales como *E. coli* y *S. uberis* son microorganismos invasores oportunistas que provienen del ambiente contaminado donde se encuentran las vacas, su transmisión se da desde el ambiente a la vaca cuando la punta del pezón está en exposición a materiales como estiércol, camas, polvo, tierra y agua que sirven como fuentes de patógenos y su

multiplicación se ve favorecida bajo condiciones de humedad, la infección ocurre principalmente entre ordeños y durante el periodo seco por la contaminación de la piel de la ubre, en donde las bacterias colonizan y eventualmente penetran por el canal del pezón (Naranjo-Lucena & Slowey, 2023). La descripción del desarrollo de la patogenia de la mastitis se describe en la **Tabla 1**.

**Tabla 1** Etapas del desarrollo de la patogenia de la mastitis

<b>Etapas</b>	<b>Descripción general</b>
Invasión	Los microorganismos del exterior de la ubre invaden el canal del pezón y se multiplican en el cuarto mamario.
Infección	La población bacteriana en los cuartos mamarios se multiplica rápidamente e invaden los tejidos de recubrimiento del pezón, cisternas glandulares y zonas productoras de leche.
Inflamación	Las bacterias sueltan toxinas capaces de destruir las células productoras de leche provocando inflamación

**Fuente:** (Cheng & Han, 2020).

### **2.1.3 Clasificación**

La mastitis según el grado de inflamación se clasifica en: clínica y subclínica. La mastitis clínica se caracteriza por presentar anomalías visibles, en la leche se puede observar una apariencia acuosa con presencia de escamas y coágulos, mientras que en la ubre hay enrojecimiento, hinchazón y endurecimiento, además las vacas presentan fiebre, diarrea y bajo consumo de alimento. Por lo contrario, la mastitis subclínica no presenta cambios visibles en la ubre o la leche, pero si se evidencian cambios en la producción de leche y su composición, ya que la producción disminuye y el recuento de células somáticas aumenta (Cheng & Han, 2020).

### **2.1.4 Factores de riesgo**

La incidencia de la mastitis bovina está ligada a factores de riesgo asociados al animal y al ambiente. Dentro de los factores asociados al animal se encuentran vacas con un alto número de

partos, elevada productividad, mayor edad, pérdida corporal posterior al parto, ubre en forma pendular, vacas lecheras en periodo de transición y estrés nutricional, mientras que dentro de los factores ambientales esta la frecuencia y tipo de ordeño, clima cálido y húmedo y condiciones de alojamiento de los animales, por ejemplo, mala ventilación, ropa de cama mojada, piso contaminado y gran densidad poblacional (Cheng & Han, 2020).

## **2.2 Etnobotánica**

### **2.2.1 Etnoveterinaria**

Batista et al. (2021) menciona que la etnoveterinaria es el conjunto de conocimientos, habilidades, prácticas y creencias de las personas en base a conocimientos empíricos, transmitidos de generación en generación para mantener a los animales sanos y productivos. En la medicina etnoveterinaria se utilizan las diferentes partes de las plantas incluyendo hojas, tallos, raíces, semillas y cogollos para la elaboración de preparados y remedios caseros como una alternativa para calmar o curar las enfermedades, principalmente las relacionadas con problemas digestivos y respiratorios del ganado vacuno, ovejuno y porcino (Moura et al., 2021).

### **2.2.2 Fitoterapia en la mastitis**

Las especies vegetales representan una alternativa terapéutica con vías de administración oral, tópica e intramamaria en el manejo de la mastitis bovina, convirtiéndose en sustitutos o suplementos de los antibióticos y antipiréticos que generalmente se utilizan en el tratamiento. Existen varias plantas empleadas en la prevención y control de la mastitis, como es el caso de la planta de moringa, su extracto mejora los mediadores inflamatorios, aumenta los sistemas antioxidantes en las células epiteliales de la ubre y la expresión de las proteínas caseínas, ayudando así a curar la inflamación de la ubre y a minimizar el estrés oxidativo (Sharun et al., 2021).

Los compuestos de origen vegetal pueden ser utilizados como agentes antiinflamatorios, antibacterianos e inmunomoduladores en el tratamiento de la mastitis ya que estos no generan efectos adversos en los animales, son de baja toxicidad, no inducen resistencia en las bacterias incluso después de una prolongada exposición, tienen capacidad para inhibir la inflamación producida por patógenos y endotoxinas, causan efectos en la fisiología de las células y son capaces de inhibir o matar directamente a los patógenos causantes de mastitis (Cheng & Han, 2020).

### **2.3 *Solanum nigrum***

#### **2.3.1 Descripción botánica**

Su distribución es abundante, principalmente en los continentes de América central y América del sur, se estima que se distribuye desde el sur de Arizona, México, los Andes de Sudamérica hasta Bolivia (Valdano et al., 2020).

*Solanum nigrum* conocida también con el nombre de Hierba Mora, es un arbusto de la familia, *Solanaceae* que alcanza hasta una altura de 30 a 80 centímetros y se desarrolla a una altitud entre los 1 200 y 2 000 msnm; posee abundantes hojas de tonalidades verde oscuro con forma ovada con un borde entero y peciolo cortos de 12 a 50 milímetros, la flor tiene una inflorescencia racimo de umbelas, sus pétalos son blancos y de tamaño pequeño, por último su fruto es de estructura esférica con un color verde que al tiempo que madura cambian a tonalidades de morado oscuro (Chen et al., 2022; Mandal et al., 2023; Valdano et al., 2020).

A continuación, se describe en la la taxonomía correspondiente de la planta y en la **Figura 1** se presenta la estructura morfológica de la *S. nigrum*.

**Tabla 2** Taxonomía de *Solanum nigrum*

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Filo</b>	<i>Tracheophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Orden</b>	<i>Solanales</i>
<b>Familia</b>	<i>Solanaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Solanum</i>
<i>Solanum nigrum</i>	

**Fuente:** (Mandal et al., 2023)

**Elaborado por:** (Las autoras, 2024).

Hojas, tallos, flores y semillas de *Solanum nigrum*



**Figura 1** Estructura física de *Solanun nigrum*

**Fuente:** (Chen et al., 2022)

### 2.3.2 Usos medicinales

La familia *Solanaceae*, tiene alrededor de 2000 especies, a todas estas se les atribuye propiedades curativas por la actividad antitumoral, antioxidante y antiinflamatoria, que se ha evidenciado mediante análisis fitoquímicos que demuestran la presencia de alcaloides, terpenoides, fenoles, entre otros (Chen et al., 2022; Mandal et al., 2023). Estos compuestos poseen propiedades farmacológicas que a menudo se han utilizado en la medicina, ya que se han empleado para la creación de productos analgésicos, antibióticos y sedantes (Mandal et al., 2023).

Un uso frecuente de *S. nigrum* es su empleo en tratamientos de desinflamación, donde se utilizan extractos de la semilla o infusiones de la planta, que se aplican directamente en la zona afectada. De igual modo, se han realizado infusiones de la especie para tratar afecciones como la tos y el asma, es decir, que también es un descongestionante porque alivia la congestión nasal; de modo similar al tener propiedades antioxidantes, se ha encontrado estudios que *S. nigrum*

contribuye en tratamientos de cáncer reduciendo los procesos de angiogénesis en las células tumorales (Mandal et al., 2023; Valdano et al., 2020).

## 2.4 *Malva sylvestris*

### 2.4.1 Descripción botánica

Su distribución se da en el Norte de América, Europa, norte de África y suroeste de Asia; adaptándose en áreas húmedas como praderas o zonas que estén cerca de canales o cursos de agua (Batiha et al., 2023). *Malva sylvestris*, también conocida como malva común o malva de campo, es una planta herbácea perenne de la familia *Malvaceae*, se estima que llega a una altura de un metro y se desarrolla a una altitud entre 3 200 y 3 850 msnm. Sus flores son de color blanco a violáceo y la forma de sus hojas es orbicular con un borde lobulado y palmatipartido (Batiha et al., 2023; Irfan et al., 2021; Mousavi et al., 2020) .

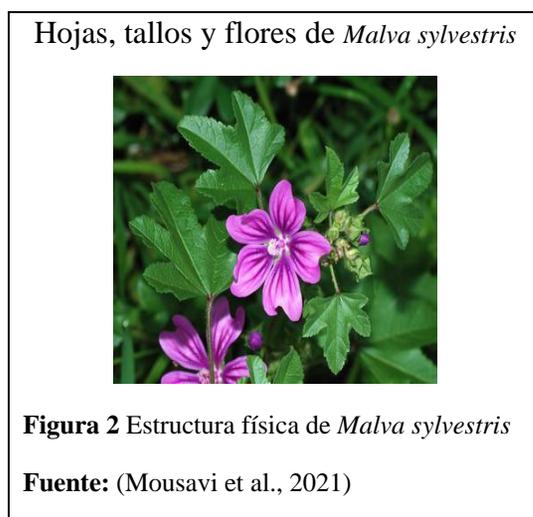
A continuación, se describirá en la **Tabla 3** la taxonomía correspondiente de la planta y en la **Figura 2**, se presenta la estructura morfológica de *M. sylvestris*.

**Tabla 3** Taxonomía de *Malva sylvestris*

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Filo</b>	<i>Tracheophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Orden</b>	<i>Malvales</i>
<b>Familia</b>	<i>Malvaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Malva</i>
<i>Malva sylvestris</i>	

**Fuente:** (Mandal et al., 2023)

**Elaborado por:** (Las autoras, 2024).



### **2.4.2 Usos medicinales**

La familia *Malvaceae* posee 88 géneros y alrededor de 2300 especies (Mousavi et al., 2021), donde la gran mayoría de estas especies han sido usadas en la medicina tradicional para tratar enfermedades como bronquitis, tos, resfriados, dolores musculares y problemas gastrointestinales. Referente a estos usos en la medicina antigua se han realizado análisis fitoquímicos que evidencian la presencia de polisacáridos, fenoles, flavonoides, terpenos, enzimas, ácidos grasos y vitaminas, los cuales contribuyen a la actividad farmacológica de las plantas (Irfan et al., 2021; Mousavi et al., 2021).

Según Batiha et al. (2023) describe diversos compuestos químicos que *M. sylvestris* posee, los mismos que han cooperado en la medicina para la creación de medicamentos que aporten en los tratamientos laxantes, antiinflamatorios y antinociceptivos. Esta especie al ser usada como laxante contribuyó en tratamientos de limpieza estomacal y rectal. Asimismo, por la presencia de flavonoides y polifenoles ha sido empleada para tratar problemas de inflamación, estos compuestos neutralizan los radicales libres que contribuyen al proceso inflamatorio del cuerpo, mientras que la existencia de mucílagos ayuda al manejo de la irritación (Mousavi et al., 2021).

### **2.5 Metabolitos secundarios**

Los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas limitadas en el reino vegetal porque su producción es pequeña y no están en toda la diversidad de plantas; su síntesis dependerá de la familia, género o especie (Gil et al., 2020). En relación con su función, se ha comprobado que estas moléculas no actúan directamente en los procesos de respiración, fotosíntesis, síntesis y transporte de nutrientes, más bien se han determinado funciones específicas en el interior de la planta y en la

interacción con el medio ambiente, ya que son liberadas cuando la planta está bajo condiciones de estrés (Chiocchio et al., 2021).

### 2.5.1 Clasificación y propiedades farmacológicas

Existen más de 200 000 tipos de metabolitos secundarios con una gran variedad de estructuras químicas, clasificados en compuestos fenólicos, terpenos, glicósidos y alcaloides, cómo se describe en la **Tabla 4**, estos compuestos son utilizados como principios activos principalmente en la industria farmacéutica, cosmética y nutracéutica debido a sus propiedades analgésicas, antibacterianas, antioxidantes, antivirales, antitumorales, antifúngicas, inmunoestimulantes, entre otras y por la capacidad que poseen para ejercer acciones farmacológicas o fisiológicas en los humanos y animales (Gil et al., 2020).

**Tabla 4** Clasificación y propiedades farmacológicas de los metabolitos secundarios

Grupo	Compuestos	Estructura química	Propiedades farmaceuticas
Fenoles	Flavonoides Taninos Cumarinas Catequinas	Derivan de un grupo fenol	Antiinflamatorio, anticancerígeno, antioxidante, antihipertensivo, antimicrobiano, antifúngico, antiviral
Terpenos	Carotenoides Lactonas Aceites esenciales	Derivan de la union de unidades de isopreno	Antimicrobiano, antioxidante, antiinflamatorio, analgésico, antiviral, antiparasitario, antifúngico
Alcaloides	Protoalcaloides Pseudoalcaloides Poliamínicos	Formados por anillos heterocíclicos con uno o mas átomos de nitrógeno	Antiinflamatorio, antioxidante, anticancerígeno, antimicrobiano, antihipertensivo, hematoprotector
Glicosidos	Saponinas Glicósidos cardiacos,	Derivan de la condensación de una molécula de azúcar con otra que posee un grupo hidroxilo, resultando	Antimicrobiano, antifúngico, anticancerígeno, antiinflamatorio, insecticida, aleopático

	cianogénicos y glucosinolatos	en la formación de un enlace glucosídico	
--	-------------------------------	--	--

**Fuente:** (Chiocchio et al., 2021)

**Elaborado por:** (Las autoras, 2024).

## **2.6 Fitoquímica**

### **2.6.1 Métodos de extracción de fitoquímicos**

La extracción de los componentes químicos se da por una separación de metabolitos que poseen las especies vegetales a esto se le conoce como extracción fitoquímica, donde se busca separar los fragmentos medicinalmente activos de los inactivos, en función a la solubilidad en diferentes solventes. Sin embargo, se debe considerar la metodología adecuada para la obtención de los metabolitos a necesitar de cada planta, por eso se considera las variables de calor, la naturaleza del disolvente a utilizar y el método de extracción (Garro et al., 2015; Gil et al., 2020). De este último se conoce que los métodos más ocupados son el de maceración y percolación.

La maceración busca separar componentes solubles de los insolubles por contacto entre el material vegetal pulverizado y el solvente, esto se coloca en un recipiente cerrado por un mínimo de 4 días y máximo 14 con agitación reiterada y protección de la luz, al terminar este periodo, el producto debe filtrarse (Lavado et al., 2021). Por otro lado, la percolación trabaja con percoladores, en los que se coloca material vegetal pulverizado con un solvente que puede estar en concentraciones de 50 a 70 %, durante 2 horas, en este tiempo se humedece la muestra, luego se coloca otra cantidad de solvente adicional, dejando macerar de 4 a 12 días (Rodino & Butu, 2019).

### **2.6.2 Tamizaje fitoquímico**

Es una herramienta de investigación de plantas medicinales, puesto que son pruebas cualitativas que ayudan a la identificación de metabolitos secundarios como alcaloides, compuestos

cardiotónicos, fenólicos, cumarinas, flavonoides, terpenos, entre otros. De manera que el tamizaje fitoquímico se basa en separar metabolitos secundarios de la muestra vegetal mediante solventes polares a los principios activos de las plantas, es decir que, al tener nuestro extracto vegetal se le coloca reactivos que den reacciones de color o precipitación correspondientes al grupo metabólico (Lavado et al., 2021).

## 2.7 Secuencias Barcode

En la identificación de las plantas se tiene métodos tradicionales como la caracterización morfológica del material vegetal o el análisis químico de sus componentes, donde el primero se basa en la observación de la estructura física de la planta, es decir, ver la posición, forma y color que asumen las hojas, flores, frutos y tallos. Sin embargo, en la identificación morfológica de la planta puede tener características distintas en su etapa de desarrollo ocasionando una falta de información. Por ello, se crearon herramientas alternativas como la identificación molecular, que estudia regiones específicas del ADN, ARN o proteínas, adquiriendo información confiable sobre el espécimen (Gómez-Serranillos, 2021; Rey & Capdevielle, 2020).

Una técnica de identificación molecular es el *código de barras de ADN* conocida en inglés como *DNA Barcoding*, esta técnica usa secuencias cortas de ADN de regiones específicas con una longitud de 400 a 800 pares de base del genoma que se comparan con una biblioteca de referencia, *Barcode of life Data Systems*, donde se archiva millones de códigos de barras. El objetivo del código de barras molecular es identificar con puntualidad una familia o género, las mismas que pueden ser aisladas y distinguidas para ser utilizadas como etiquetas, su composición es de cuatro nucleótidos que permita identificar un organismo de manera precisa (Yu et al., 2021).

La metodología del código de barras realiza identificación de regiones genéticas estándar, se comenzó realizando con los animales, donde se amplifica la región 5' del gen de la subunidad 1 de la enzima citocromo oxidasa (*cox I*), que se encuentra en el genoma mitocondrial. No obstante, esta región *cox I* para el uso en plantas no es favorable, por la poca sustitución de ADN mitocondrial en las mismas, después de varios análisis se encontró genes funcionales ubicados en el cloroplasto, como regiones estándares conocidas como *rbcL* y *matK* (Niizawa, 2020; Rey & Capdevielle, 2020).

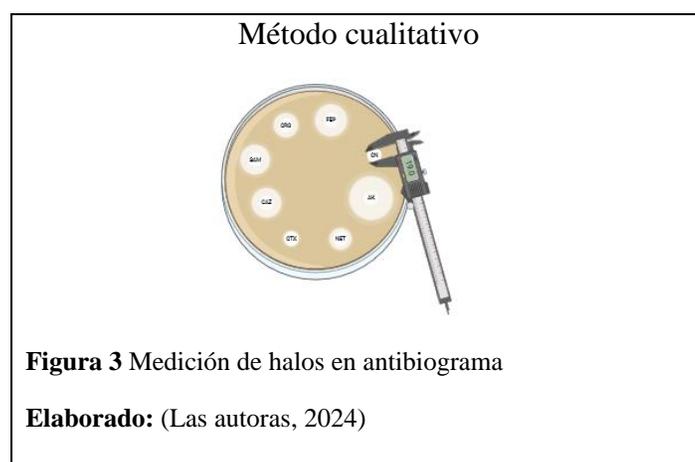
La región *rbcL* es un codificante para la enzima *RuBisCo* que se encuentra en el cloroplasto, esta es muy utilizada por el fácil manejo de amplificación y alineación en la secuenciación de un gran número de especies del GenBank, base de datos. Por otro lado, la región *matK* igual se encuentra en el cloroplasto con la diferencia que esta codifica la enzima maturasa K, donde tiene una alta capacidad de distinción de especies vegetales, el defecto de esta región es la dificultad para su amplificación y alineación (Niizawa, 2020).

## **2.8 Actividad antibacteriana**

Las plantas tienen componentes bioactivos con amplias propiedades medicinales o fitoterapia, una actividad antibacteriana; interfiere en el crecimiento y reproducción de microorganismos patógenos, en otras palabras, la vegetación ha desarrollado un sistema de defensa hacia microorganismos que le afecten. Para evaluar dicha capacidad antibacteriana existen métodos cualitativos como cuantitativos, donde se emplea el extracto de las plantas, para medir su capacidad de inhibición respecto a patógenos comunes que afecten al ser humano o animales, dando a conocer su beneficio terapéutico (Pérez & Rivas, 2021).

### **2.8.1 Método cualitativo y cuantitativo**

Pérez & Rivas (2021) menciona que el método cualitativo se enfoca, en distinguir si existe sensibilidad o resistencia de los microorganismos ante los extractos vegetales, uno de los métodos más conocidos es *Kirby-Bauer* o también llamado difusión en disco. En este método se impregna un disco con la sustancia a estudiar, para posteriormente medir el diámetro del halo de inhibición generado por el extracto como se observa en la **Figura 3**. De igual manera, en el método cuantitativo se emplea los extractos vegetales para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y para ello se cuantifica la concentración mínima donde la sustancia a estudiar inhibe el crecimiento in vitro de una bacteria.



## 2.9 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se basa en la capacidad de los compuestos antioxidantes para absorber y neutralizar los radicales libres producidos durante el metabolismo oxidativo; este proceso puede ocurrir mediante la transferencia de átomos de hidrógeno o mediante la transferencia de electrones (Chaves et al., 2020). Los compuestos antioxidantes tienen la capacidad de retrasar o inhibir la oxidación de otras moléculas al impedir el inicio o propagación de las reacciones oxidativas en cadena, evitando así que sucedan cambios oxidativos en las biomoléculas y como consecuencia la aparición de graves patologías (Garro et al., 2015).

### 2.9.1 Método DPPH

El radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo conocido por las siglas DPPH, puede reaccionar con compuestos antioxidantes mediante un proceso en el que el agente antioxidante cede un átomo de hidrógeno, generando una reacción de pseudo primer orden que se evaluará con la disminución de la absorbancia según el tiempo, además el compuesto reducido experimenta un cambio de color que es directamente proporcional a la concentración del antioxidante en la muestra. Los resultados se reportan con el porcentaje de inhibición que se relaciona con la cantidad neutralizada del radical DPPH por un extracto a una concentración específica (Paucar et al., 2021).

## **2.10 Actividad toxicológica**

Los ensayos de toxicidad son empleados para evaluar y reconocer los posibles efectos tóxicos post administración de cualquier sustancia fisiológicamente activa. Los bioensayos han sido un instrumento alternativo de los análisis químicos tradicionales, ya que en ellos se usan tejido u organismos vivos que responderán al contacto con cualquier sustancia química o mezcla compleja de tóxicos presentes. Los bioensayos *in vitro* se aprobaron ampliamente por su capacidad de generar resultados confiables, efectivos y rápidos, útiles para evaluar los efectos tóxicos en la salud humana y animal (Liza, 2020).

### **2.10.1 Ensayos toxicológicos en *Artemia salina***

La evaluación toxicológica preclínica comúnmente se realiza en ratones, sin embargo, esta práctica representa elevados costos y sufrimiento en los animales, por ello se ha visto la necesidad de buscar metodologías que replacen a los animales de laboratorio, así surge como alternativa los ensayos en *Artemia salina* que es un camarón minúsculo de cuerpo blando, utilizado como organismo modelo en el estudio del impacto de tóxicos, convirtiéndose en una herramienta útil y sencilla para la detección de toxinas, toxicidad de extractos de plantas, metales pesados y predicción de citotoxicidad de compuestos puros (Fidalgo et al., 2009).

García-Alcalde et al. (2023) mencionan que el ensayo de toxicidad en *Artemia salina* se centra en calcular la concentración letal media (CL<sub>50</sub>), que representa la cantidad necesaria de un compuesto natural o químico para ocasionar la muerte del 50% de las larvas de *Artemia* en un periodo de 24 horas en condiciones controladas de salinidad, temperatura, aireación, luz y pH, además destaca que en una población animal a mayor DL<sub>50</sub>, menor toxicidad aguda. Por otro lado, Suarez-Barreiro et al. (2024) asegura que este bioensayo toxicológico es más rápido, sencillo y tiene una buena correlación con las pruebas de toxicidad *in vivo*.

### 3 Materiales y Métodos

#### 3.1 Recolección del material vegetal

*Solanum nigrum* y *Malva sylvestris* fueron recolectadas en marzo del 2024, en la provincia de Pichincha, cantón Cayambe, parroquia Paquiestancia, coordenadas: 0°4'15"N 78°6'39"O. Se seleccionaron plantas en buen estado, sin daños ni enfermedades como lo recomienda la Organización Mundial de la Salud (2023). El material vegetal se colocó en fundas negras plásticas herméticas y fueron transportadas al Laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, campus Girón-Quito.

#### 3.2 Elaboración de la carpeta botánica

##### 3.2.1 Prensado y secado

Las muestras vegetales seleccionadas de *Solanum nigrum* y *Malva sylvestris* fueron sometidas al proceso de prensado para el correcto secado. Las muestras se colocaron en la mitad de papel periódico, cartón y madera, con una correcta distribución de hojas, flores y raíces como se observa en la **Figura 4**, para luego ajustar y amarrar las tablas con una piola. En este proceso, el secado de la planta tuvo una duración de 30 días a temperatura ambiente.



### **3.2.2 Montaje y etiquetado**

Las muestras que se obtuvieron del proceso de prensado se colocaron en cartulinas blancas de tamaño A3, conforme lo indica el Herbario de la Universidad Politécnica Salesiana. En las cartulinas se pegaron las muestras vegetales con goma blanca y se cosieron con hilo blanco. En la esquina inferior derecha de la cartulina se colocó una etiqueta que contiene la siguiente información: Nombre científico, nombre común, número de colección, lugar de recolección, coordenadas, colectores y características de la planta.

### **3.3 Identificación molecular**

La identificación molecular de *Solanum nigrum* y *Malva sylvestris* se realizó en base a la metodología propuesta por Cerda-Granados & Díaz (2013).

#### **3.3.1 Extracción de ADN y amplificación PCR**

Para la extracción del ADN vegetal se recolectaron plantas con hojas sin daños físicos, ni enfermedades visibles y que tengan una coloración verde claro u oscuro. Las muestras de *Solanum nigrum* y *Malva sylvestris* fueron trasladadas al laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Politécnica Salesiana en frascos con agua, para que las especies mantengan sus características. La recolección se realizó 2 horas antes de iniciar el procedimiento en el laboratorio.

En las hojas seleccionadas para la extracción del ADN se cortaron dos circunferencias con el reverso de una punta azul para micropipeta. Las circunferencias se colocaron en un tubo eppendorf de 2 mL, se añadió 480 µl de buffer de extracción lisis y se procede a machacar la muestra con un pistilo de plástico, a continuación, se agrega 75 µl de SDS al 10% y se mezcla por inversión 8 veces, a continuación, se coloca en una plancha de calentamiento por 10 minutos a una temperatura de 65°C.

Al terminar el tiempo en la plancha de calentamiento se agrega 94  $\mu\text{l}$  de acetato de potasio 5M y se mezcla por inversión 8 veces, para después colocar en hielo por 30 minutos. Después se centrifuga por 5 minutos a 12000 rpm y se debe transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 mL y se agrega 600  $\mu\text{l}$  de fenol:cloroformo, para posteriormente centrifugar a las mismas condiciones. En un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL transferir aproximadamente 200  $\mu\text{l}$  de la fase intermedia de la muestra anterior y se adiciona 360  $\mu\text{l}$  de isopropanol frío, se mezcla por inversión 8 veces y se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$  toda la noche.

Al día siguiente, se centrifuga la muestra por 3 minutos a 12000 rpm y se enjuaga el pellet con etanol al 70% tres veces, se debe centrifugar a las mismas condiciones antes de cada lavado, después se retira el etanol y se deja secar en la plancha de calentamiento a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta que se evapore el alcohol restante, aproximadamente 45 minutos. Finalmente, se resuspende el pellet en 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  libre de nucleasas y se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Para el estudio cualitativo del ADN este debe ser amplificado en la región *matK* usando los primers que se visualizan en la **Figura 5**. Este tratamiento se da por la *Reacción en Cadena de la polimerasa* (PCR) convencional; donde uno de los componentes de las muestras vegetales es la *Green TAG*. La muestra PCR se realizó de acuerdo con lo que detalla en la **Tabla 5** Componentes para la muestra PCR, obteniendo un volumen final de 25  $\mu\text{l}$ . El proceso de amplificación se realizó con el equipo *Proflex Thermal Cycler* en las condiciones del **Anexo 1**. Al finalizar la amplificación se verificó la presencia de ADN en el producto PCR mediante la elaboración de una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%, para luego observar el gel en un fotodocumentador.

**Tabla 5** Componentes para la muestra PCR

Componentes	Volúmenes
TAG	12,5 µl
P. forward	1 µl
P. reverse	1 µl
MgCl <sub>2</sub>	1 µl
H <sub>2</sub> O	1,5 µl
ADN	8 µl
TOTAL	25 µl

**Elaborado:** (Las autoras, 2024).

### 3.3.2 Secuenciación

Para la secuenciación de ADN, se trabajó con las muestras obtenidas del proceso de amplificación, tomando 15 µl del producto PCR de cada especie vegetal. Se estima que en los 15 µl exista aproximadamente una concentración de 50 ng/mL. Las muestras son enviadas por la compañía *BioSequence* a la empresa *Macrogen Inc.*, empresa líder a nivel mundial en análisis genómico y biotecnología, brinda el servicio de aplicación de investigación para universidades, instituciones y entidades públicas.

### 3.3.3 Análisis bioinformático

Las secuencias de las especies *S. nigrun* y *M. sylvestris* se estudiaron con el marcador molecular *matK*. Las secuencias obtenidas del proceso experimental fueron abiertas en el programa MEGA 11 para eliminar las señales de ruido de fondo y verificar las bases nitrogenadas. El resultado de este proceso fue comparado con secuencias similar en la plataforma *Barcode of life Data Systems (BOLDSystems)*.

Primers <i>matK</i> forward y reverse
<i>matK 2.1.a – forward</i> (5' - ATCCATCTGGAAATCTTAGTTC - 3')
<i>matK 2.1.a – reverse</i> (5' - GTTCTAGCACAAAGAAAGTCG - 3')
<b>Figura 5</b> Cebadores de <i>matK</i>
<b>Fuente:</b> (Molina, 2020).

### **3.4 Análisis farmacognóstico**

El análisis farmacognóstico de *Solanum nigrum* y *Malva sylvestris* se realizó en base a la metodología propuesta por Fathi et al. (2022).

#### **3.4.1 Desinfección y secado**

En el proceso de desinfección las hojas y tallos de *Solanum nigrum* y *Malva sylvestris* se lavaron con agua y jabón por dos minutos, a continuación, se realizaron tres enjuagues con agua destilada, luego se colocó una solución 1:10 de hipoclorito de sodio al 5% por cinco minutos y se enjuagó tres veces con agua destilada. Para el secado las hojas y tallos se extendieron sobre papel periódico en una superficie plana, dejando 24 y 48 horas respectivamente a temperatura ambiente. Para finalizar el secado las muestras se colocaron en una estufa marca *Memmert*<sup>TM</sup> a 60°C con 10% de humedad, permaneciendo dentro de la estufa 24 horas las hojas y 48 horas los tallos.

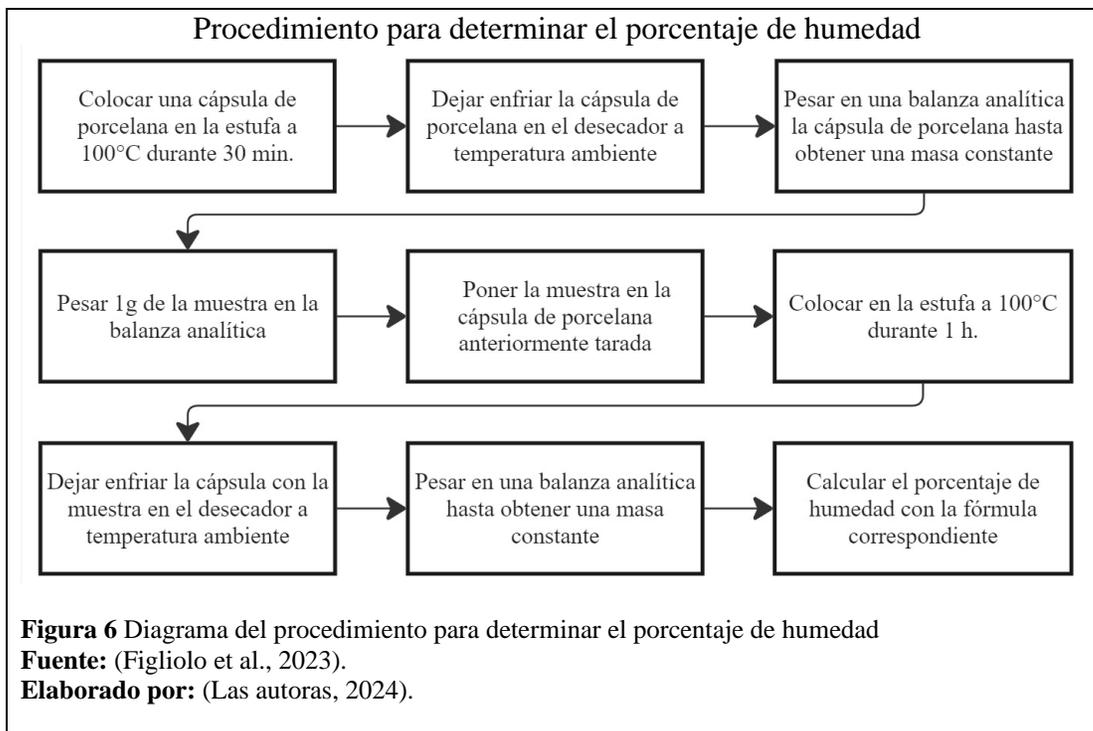
#### **3.4.2 Molienda y tamizaje**

El material vegetal seco fue triturado en una licuadora marca *Oster*<sup>®</sup> *Xpert Series*<sup>TM</sup> hasta obtener una textura fina. Las muestras pulverizadas se pasaron por un tamiz circular para obtener un tamaño de partícula homogénea, finalmente el polvo vegetal fue almacenado en fundas plásticas de cierre hermético.

### **3.5 Control de calidad del material vegetal seco**

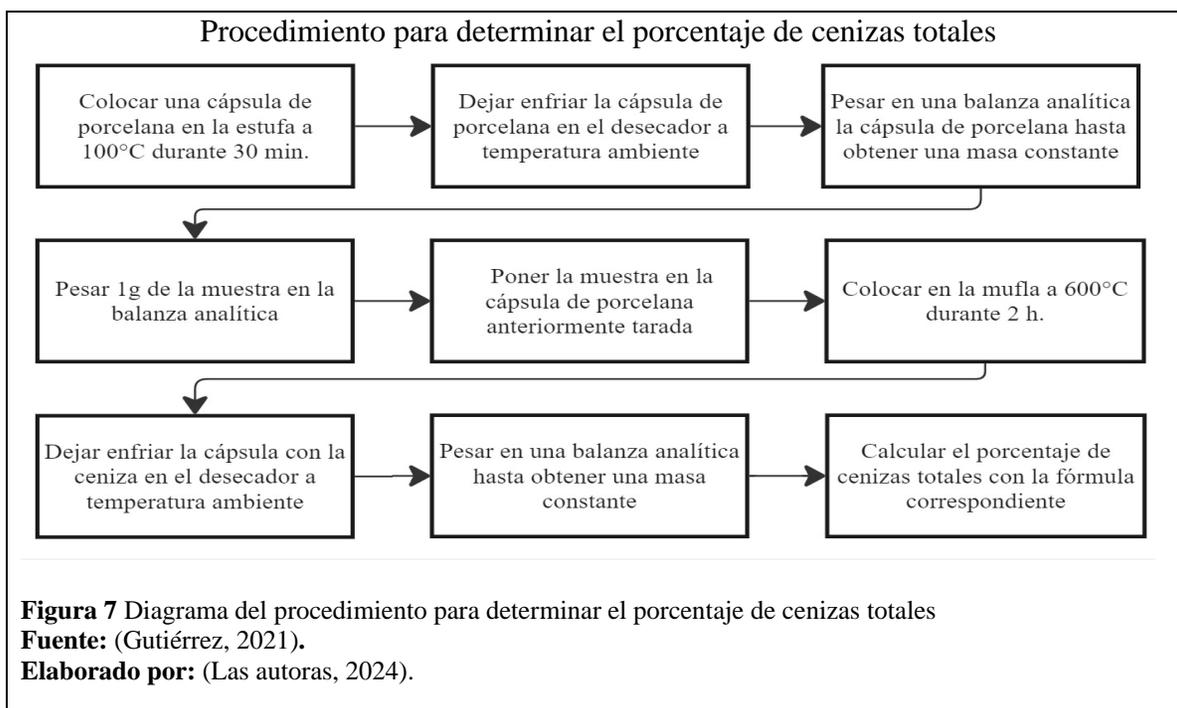
#### **3.5.1 Porcentaje de humedad**

El proceso para determinar el porcentaje de humedad en el material vegetal seco se presenta en el diagrama de la *Figura 6*



### 3.5.2 Porcentaje de cenizas totales

El proceso para determinar el porcentaje de cenizas totales en el material vegetal seco se presenta en el diagrama de la **Figura 7**



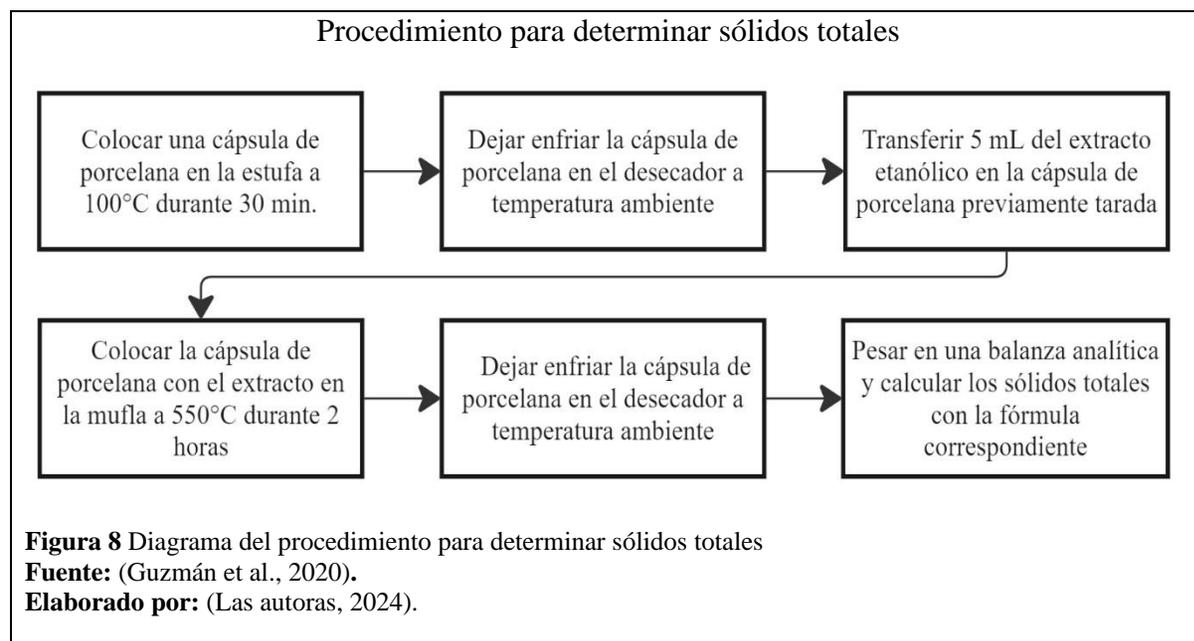
### 3.6 Obtención del extracto etanólico

Se pesó 30 g de material vegetal seco en una balanza analítica marca *Mettler Toledo-MS304*, el material vegetal se depositó en un frasco boeco con 200 mL de etanol al 96%. El frasco fue almacenado por siete días a temperatura ambiente, oscuridad y agitación periódica. Al finalizar el proceso de maceración se realizó una filtración al vacío y el producto del filtrado fue colocado en el rotavapor durante 30 minutos a 40°C y 60 rpm, para obtener el concentrado de los extractos, siguiendo la metodología propuesta por Pesantes et al. (2019).

### 3.7 Control de calidad del extracto etanólico

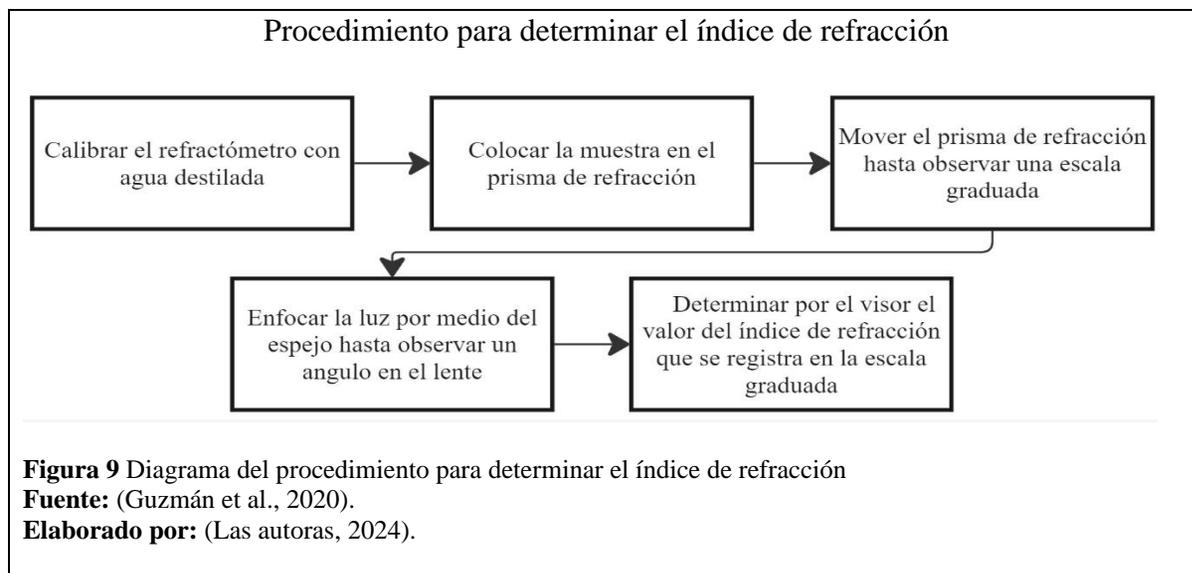
#### 3.7.1 Sólidos totales

El proceso para determinar el porcentaje de sólidos totales en el extracto etanólico se presenta en el diagrama de la *Figura 8*.



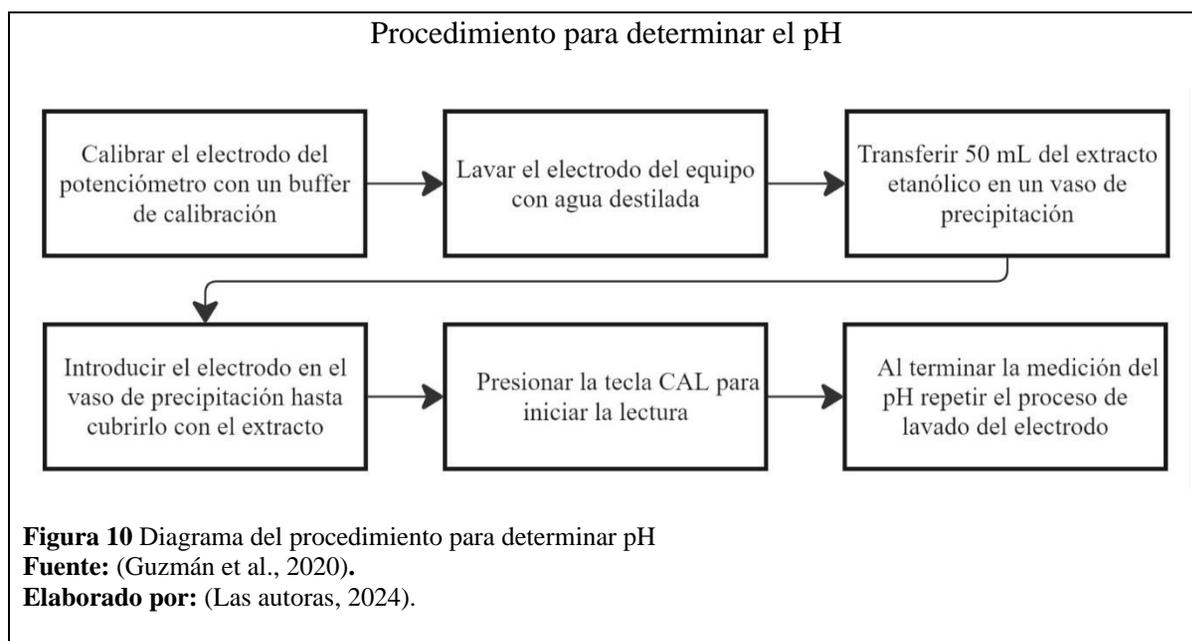
#### 3.7.2 Índice de refracción

El proceso para determinar el índice de refracción del extracto etanólico se presenta en el diagrama de la **Figura 9**.



### 3.7.3 Determinación de pH

El proceso para determinar el pH del extracto etanólico se presenta en el diagrama de la **Figura 10**.



## **3.8 Tamizaje fitoquímico**

### **3.8.1 Identificación de fenoles**

Prueba de cloruro férrico: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto etanólico y 1 mL de cloruro férrico al 1%. Si se observa una coloración roja a vino el resultado se considera positivo (Garcia et al., 2020).

### **3.8.2 Identificación de taninos**

Prueba de cloruro férrico: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto etanólico, 1 mL de cloruro férrico al 5% y 1 mL de solución salina. Si se observa una coloración verde marrón intenso o azul el resultado se considera positivo (Garcia et al., 2020).

### **3.8.3 Identificación de flavonoides**

Prueba de Shinoda: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto etanólico, 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y 1 cm de cinta de magnesio, se homogenizó la muestra y se dejó reposar por 5 minutos. Si se observa una coloración amarilla, naranja o roja el resultado se considera positivo (Garcia et al., 2020).

### **3.8.4 Identificación de saponinas**

Prueba índice de espuma: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto etanólico y 5mL de agua destilada, se agitó la muestra por 30 segundos. Si se observa una espuma constante por 2 minutos el resultado se considera positivo (Garcia et al., 2020).

### **3.8.5 Identificación de glucósidos cardiotónicos**

Prueba de Kedde: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto etanólico y 1 mL del reactivo de Kedde, se homogenizó la muestra y se dejó reposar por 10 minutos. Si se observa una coloración violácea durante 1 a 2 horas el resultado se considera positivo (Lara et al., 2020).

### **3.8.6 Identificación de resinas**

Prueba de resina: En un tubo de ensayo se colocó 2 mL de extracto etanólico y 10 mL de agua destilada. Si se observa la presencia de precipitados el resultado se considera positivo (Lara et al., 2020).

### **3.8.7 Identificación de lactonas**

Prueba de Baljet: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto etanólico y se adicionó 4 gotas del reactivo de Baljet. Si se observa una coloración o precipitado rojo el resultado se considera positivo (Lara et al., 2020).

### **3.8.8 Identificación de triterpenos esteroideos**

Prueba de Liebermann Burchard: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto etanólico y se dejó evaporar el solvente en la estufa marca *Memmert*<sup>TM</sup> a 100°C toda la noche, luego se redisolvió el residuo en 1 mL de cloroformo, a continuación, se agregó 1 mL de anhídrido acético y se homogenizó la muestra, finalmente se resbaló por las paredes del tubo 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Si se observa una coloración roja, rosada, verde, naranja, purpura o azul en la interfase el resultado se considera positivo (Lara et al., 2020).

### **3.8.9 Identificación de alcaloides**

Prueba de Dragendorff: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto etanólico y se dejó evaporar el solvente en la estufa marca *Memmert*<sup>TM</sup> a 100°C toda la noche, luego se redisolvió el residuo en 1 mL de ácido clorhídrico al 1% y se homogenizó la muestra. Después se agregó 3

gotas del reactivo de Dragendorff y se dejó reposar la muestra por 2 minutos. Si se observa un precipitado o coloración roja o anaranjado el resultado se considera positivo (Garcia et al., 2020).

### **3.8.10 Identificación de catequinas**

Con una capilar se tomó una gota del extracto etanólico y se coloca sobre un disco de papel filtro, sobre la mancha se agregó una gota de solución de carbonato de sodio 2 M. La muestra se expuso a la luz UV en una cámara de luz ultravioleta marca CAMAG® a una longitud de onda de 366 nm. Si se observa una mancha verde carmelita en la exposición a la luz UV el resultado se considera positivo (Lara et al., 2020).

### **3.8.11 Identificación de cumarinas**

Con una capilar tomar una gota del extracto etanólico y se coloca sobre un disco de papel filtro, sobre la mancha agregar una gota de hidróxido de potasio 0.5 M. La muestra se expuso a la luz UV en una cámara de luz ultravioleta marca CAMAG® a una longitud de onda de 366 nm. Si se observa fluorescencia en la exposición a la luz UV el resultado se considera positivo (Lara et al., 2020).

## **3.9 Evaluación de la actividad antibacteriana**

La evaluación de la actividad antibacteriana de *Solanum nigrum* y *Malva sylvestris* se realizó en base a la metodología propuesta por Pérez & Rivas (2021).

### **3.9.1 Preparación del inóculo bacteriano**

Para el crecimiento de las bacterias *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) y *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990) proporcionadas por el laboratorio del Girón de la Universidad Politécnica Salesiana. Para la activación de las bacterias se procedió a depositar 5 colonias de cada bacteria en tubos de ensayo

con tapa rosca que contenían 10 mL de caldo soja tripticaseína (TSB). Los tubos se dejaron en una incubadora de agitación serie *TE-420* por 24 horas a 60 rpm y una temperatura de 35°C. Al finalizar el tiempo de incubación se procedió a estandarizar el número aproximado de bacterias según la escala McFarland (0,05), en suspensión de solución salina (NaCl 0,9%).

Para elaboración de la escala McFarland, se desechó el sobrenadante del caldo TSB y se agregó 5 mL de solución salina estéril, a continuación, se homogenizó la muestra en un vortex y se midió la absorbancia de la dilución en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm. Se debe añadir solución salina hasta llegar a tener una absorbancia de 0,200 que equivale a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL.

### 3.9.2 *Elaboración del antibiograma*

Se tomó 100 µl de inóculo bacteriano de escala McFarland y se colocó sobre el medio de cultivo Muller Hinton contenido en una caja petri, inmediatamente se procedió a extender uniformemente en la superficie con un asa de Drigalsky de vidrio. En las cajas petri preparadas, se utilizó discos de papel filtro estériles de aproximadamente 6 mm de diámetro. En cada disco se añadió con una micropipeta 10 µl de las soluciones a ensayar y se colocaron con una pinza metálica estéril sobre el medio de cultivo inoculado ejerciendo una ligera presión. El orden y el contenido de los discos se detalla en la **Tabla 6**. Finalmente se colocaron las cajas petri en una incubadora marca *Memmert*<sup>TM</sup> a 35°C durante 24 horas en posición invertida. Todo el procedimiento se lo realizó en una cabina de flujo laminar.

**Tabla 6** Composición de los discos de papel filtro para la elaboración del antibiograma

N°# Disco	Contenido
1	Extracto etanólico a 2500 ppm
2	Extracto etanólico a 5000 ppm
3	Extracto etanólico a 10000 ppm

5	Control negativo – Agua estéril
6	Control positivo – Antibiótico gentamicina

Elaborador por: (Las autoras, 2024).

### 3.9.3 Interpretación de resultados

Al finalizar el periodo de incubación, se realizó la medición de los halos de inhibición utilizando un calibrador pie de rey y se comparó los valores obtenidos frente a una escala de sensibilidad.

### 3.10 Evaluación de la actividad antioxidante

La evaluación de la actividad antioxidante de *Solanum nigrum* y *Malva sylvestris* se realizó en base a la metodología propuesta por Aronés Jara et al. (2022) y Torrenegra et al. (2019).

#### 3.10.1 Preparación de la solución DPPH

En una balanza analítica marca *Mettler Toledo-MS304* se pesó 10 mg del reactivo DPPH y se disolvió en etanol al 96%, aforando a un volumen de 250 mL. El balón de aforo se cubrió con papel aluminio y se refrigeró hasta el momento de su uso debido a que es un reactivo fotosensible.

#### 3.10.2 Preparación del estándar de ácido ascórbico

A partir de una solución madre de ácido ascórbico a una concentración de 400 ppm, se prepararon soluciones de 0,10,20,40,60,80 y 100  $\mu$ l y se agregó a cada uno 2900  $\mu$ l de DPPH. Se ajustó el volumen final de cada solución a 3 mL con etanol al 96%.

#### 3.10.3 Preparación de las soluciones de extracto a analizar

La muestra madre se preparó tomando 1 mL de cada extracto vegetal y disolviendo en etanol al 96%, aforando a un volumen de 10 mL. A partir de la muestra madre se prepararon en frascos ámbar de 5mL las soluciones a ensayar. La composición de las soluciones se detalla en la **Tabla 7 y Tabla 8**.

**Tabla 7** Preparación de extractos de *Malva sylvestris* para evaluar la actividad antioxidante.

# Frasco	Extracto (μl)	Etanol (μl)	DPPH (μl)
1	0	100	2900
2	10	90	2900
3	20	80	2900
4	40	60	2900
5	60	40	2900
6	80	20	2900
7	100	0	2900

Elaborado por: (Las autoras, 2024).

**Tabla 8** Preparación de extractos de *Solanum nigrum* para evaluar la actividad antioxidante.

# Frasco	Extracto (μl)	Etanol (μl)	DPPH (μl)
1	0	300	2900
2	50	250	2900
3	100	200	2900
4	150	150	2900
5	200	100	2900
6	250	50	2900
7	300	0	2900

Elaborado por: (Las autoras, 2024).

Las muestras se agitaron a 200 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente, al finalizar este tiempo se colocaron las muestras en celdas de vidrio para medir la absorbancia en el espectrofotómetro *UV-VIS* a una longitud de onda de 517 nm. Es importante mencionar que el equipo fue encerado con etanol al 96% y que las lecturas se realizaron de forma ascendente iniciando con el blanco de la muestra correspondiente al frasco número uno.

#### **3.10.4 Determinación del porcentaje de inhibición e $IC_{50}$**

El porcentaje de inhibición se determinó a través de la **Ecuación 1**, con este valor se construyó la gráfica porcentaje de inhibición vs concentración que va a permitir expresar los resultados como una concentración  $IC_{50}$ .

$$AA(\%) = \left[ \frac{A_b - A_m}{A_b} \right] \times 100$$

## **Ecuación 1** Determinación del porcentaje de Inhibición

Donde:

$A_m$  = Valor de la asborbancia de la muestra

$A_b$  = Valor de la asborbancia del blanco

### **3.11 Evaluación de la actividad toxicológica**

La evaluación de la actividad toxicológica de *Solanum nigrum* y *Malva sylvestris* se realizó en base a la metodología propuesta por Fidalgo et al. (2009).

#### **3.11.1 Descapsulación**

En una balanza analítica marca *Mettler Toledo-MS304* se pesó 1g de huevos de *Artemia salina* y se colocaron en un vaso de precipitación para hidratarlos con 1 L de agua destilada durante 30 minutos, a continuación, se agregó 50 mL de hipoclorito de sodio al 5% y se homogenizó con un aireador de pecera por 3 minutos. Repetir este paso hasta llegar a utilizar 250 mL de hipoclorito de sodio. Finalmente, con papel filtro se filtró la solución y se enjuagó los huevos cinco veces con agua destilada.

#### **3.11.2 Incubación de huevos**

En una pecera se agregó 2200 mL una solución de cloruro de sodio al 2% preparada disolviendo en agua destilada 44 g de sal en grano. El pH de 8 a 8,5 se ajustó mediante una solución de bicarbonato de sodio al 10%, añadiendo 1 mL en la solución salina. Se colocó un aireador de pecera para mantener la oxigenación de la solución y posteriormente se agregó los huevos sin capsulas de recubrimiento, dejando en incubación a 24°C durante 48 horas.

#### **3.11.3 Ensayo de toxicidad**

Se preparó una solución patrón de extracto en etanol a una concentración de 100 µg/mL y se dejó en reposo por 24 horas a temperatura ambiente. De la solución patrón se tomó 125, 250 y 500 µl de extracto que se aforó a 5 mL con solución salina al 2%, para obtener las concentraciones de 25,50 y 100 µg/mL respectivamente. Con una pipeta Pasteur se colocaron 10 nauplios en cada caja petri y luego se adicionó las concentraciones de extracto a ensayar en cada caja. Las cajas petri fueron incubadas en una cámara climática marca *BINDER*<sup>TM</sup> a 24°C durante 24 horas. El control negativo fue agua salina y el control positivo etanol al 96 %.

### 3.11.4 *Conteo de nauplios muertos*

Al final de la incubación, se contabilizó en un estereoscopio los nauplios muertos, tomando en cuenta que los nauplios que no se mueven en 20 segundos, se consideran muertos.

### 3.11.5 *Concentración letal 50 y grado de toxicidad*

El porcentaje de mortalidad se determinó a través de la **Ecuación 2**, mediante el análisis estadístico PROBIT se establecieron los valores de  $CL_{50}$  para posteriormente determinar el grado de toxicidad comparado la  $CL_{50}$  con la escala que se detalla en la **Tabla 9**.

$$\%Mortalidad = \frac{Individuos\ vivos\ pruebas - Individuos\ vivos\ control}{Individuos\ vivos\ control} \times 100$$

**Ecuación 2** Determinación del porcentaje de mortalidad

**Tabla 9** Escala del grado de toxicidad

$CL_{50}$ (µg/mL)	Grado de toxicidad
1-10	Extremadamente tóxico
10-100	Altamente tóxico
100-500	Moderadamente tóxico
500-1000	Ligeramente tóxico

1000-1500	Prácticamente no tóxico
>1500	Relativamente inocuo

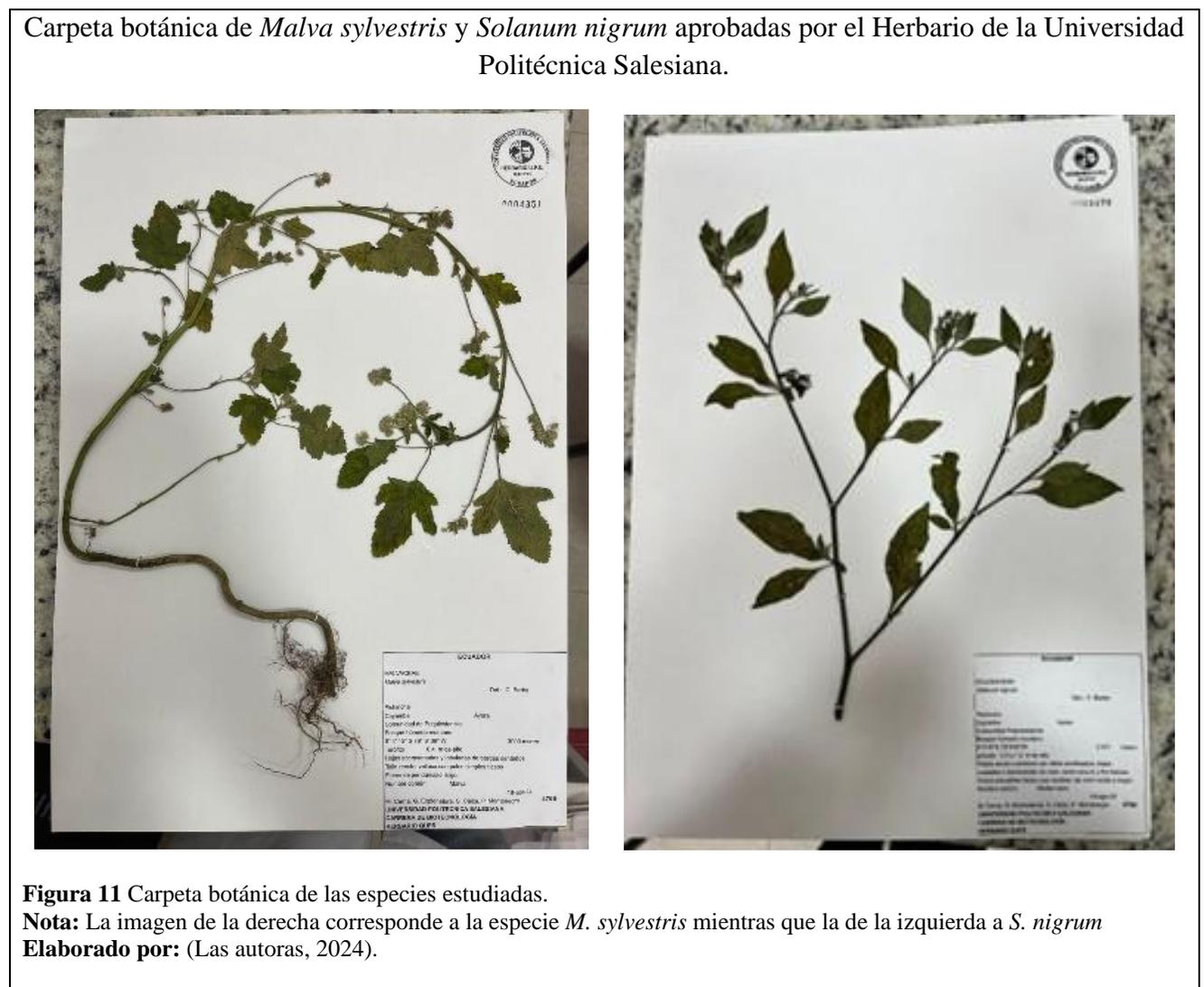
**Fuente:** (Fidalgo et al., 2009).

**Elaborado por:** (Las autoras, 2024).

## 4 Resultados y Discusión

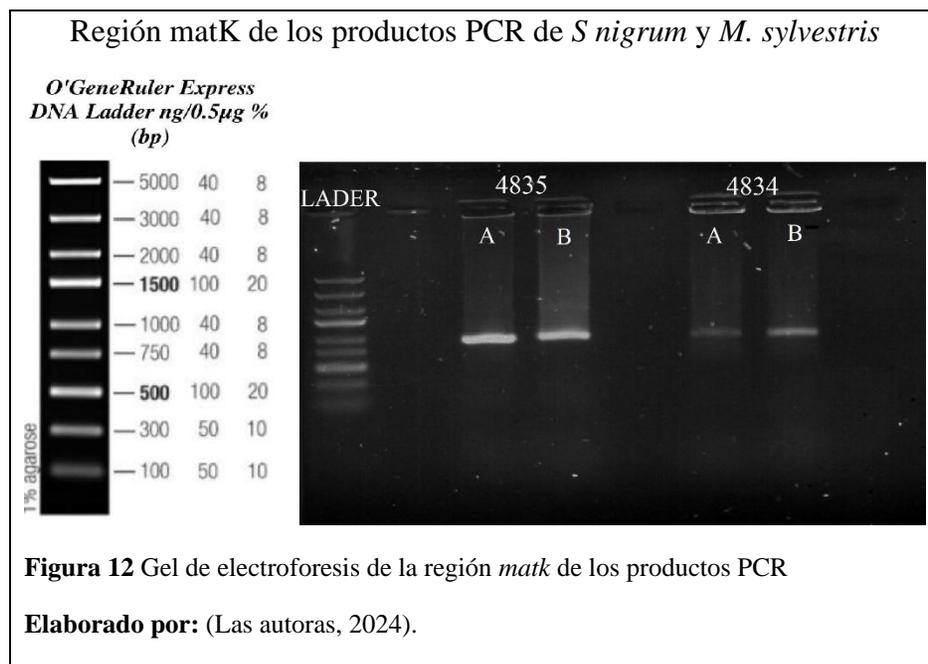
### 4.1 Recolección del material vegetal y elaboración de la carpeta botánica

El ejemplar prensado de las especies vegetales del presente estudio se llevó al Herbario de la Universidad Politécnica Salesiana para su identificación taxonómica. En el Herbario de la UPS- Sede Quito se elaboró la carpeta botánica y se registraron las plantas con un código de colección. Los códigos asignados para cada especie fueron: 4834 *Malva sylvestris* y 4835 *Solanum nigrum*. En la **Figura 11** se observan los resultados del montaje y etiquetado de las especies en estudio.



## 4.2 Identificación molecular

La identificación molecular de *Solanum nigrum* y *Malva sylvestris* se realizó con el marcador molecular *matK* por duplicado como se observa en la **Figura 12**. El resultado obtenido de la muestra 4835 correspondiente a *S. nigrum* indica bandas en 500 bp, señalando una concentración de ADN aproximada de 20 a 100 ng/ $\mu$ L, mientras que los resultados de la muestra 4834 correspondiente a *M. sylvestris* indican bandas en 100 y 300 bp, señalando una concentración de ADN aproximada de 10 a 50 ng/ $\mu$ L.



### 4.2.1 Análisis bioinformático

En el análisis bioinformático se trabajó con las secuencias recibidas por la compañía *Macrogen*. En las secuencias se limpió el ruido de fondo como se muestra en el **Anexo 9**. Las muestras 4834 y 4835 se compararon en la plataforma *BOLDSystems*, que es una base de datos de referencia donde se encuentra información sobre códigos de barras de ADN. Los resultados de este estudio fueron los siguientes: la muestra 4834 con una similitud de 99.10% con respecto a *Malva*

*sylvestris* y su E-value con un valor menor a 2; mientras que para la muestra 4835 tuvo una similitud de 99.65% con respecto a *Solanum nigrum*, con un E-Value igual a cero. Los resultados de similitud se visualizan en el **Anexo 10**.

### 4.3 Control de calidad del material vegetal seco

En la **Tabla 10** se muestran los resultados obtenidos del análisis del contenido de humedad y cenizas totales determinados en el material vegetal seco de *Solanum nigrum* y *Malva sylvestris*. Los resultados obtenidos establecen valores que se encuentran dentro de los límites permitidos por la Organización Mundial de la Salud, correspondiente a valores inferiores al 12% para humedad y 14% para cenizas totales (Lara et al., 2020). Así, el material vegetal seco de las especies en estudio cumple con los parámetros de calidad para preparar extractos. El ensayo se realizó por triplicado como se detalla en el **Anexo 2**.

**Tabla 10** Resultados del porcentaje de humedad y cenizas totales

Especie vegetal		Porcentaje de Humedad %	Porcentaje de cenizas totales %
<i>Solanum nigrum</i>	Hojas	2,12	9,75
	Tallos	5,17	13,84
<i>Malva sylvestris</i>	Hojas	2,38	12,48
	Tallos	4,92	9,90

Elaborado por: (Las autoras, 2024).

### 4.4 Obtención del extracto etanólico

El volumen de extractos obtenidos por el proceso de maceración y concentración en rotavapor arrojó los siguientes volúmenes finales: para *Solanum nigrum* 30 mL en hojas y 65 mL en tallos y para *Malva sylvestris* 20 mL en hojas y 15 mL en tallos. Los extractos se almacenaron en frascos ámbar en refrigeración.

#### 4.5 Control de calidad del extracto etanólico

En la **Tabla 11** se muestran los resultados obtenidos del control de calidad de los extractos etanólicos. Los valores para *Malva sylvestris* son similares a los obtenidos por Sarmiento-Tomalá et al. (2020), quienes mencionan que los parámetros fisicoquímicos del extracto hidroalcohólico de *M. sylvestris* son: índice de refracción 1,36, sólidos totales 1,88 y un pH cercano a neutro con un valor de 6,20. Por otro lado, para la especie *S. nigrum* no se han encontrado estudios previos que detallen valores específicos de estos parámetros de calidad para ser comparados. Los ensayos se realizaron por triplicado como se detalla en el **Anexo 3**.

**Tabla 11** Resultados de los parámetros fisicoquímicos de los extractos vegetales

Especie vegetal		Índice de refracción	Sólidos totales	pH
<i>Solanum nigrum</i>	Hojas	1,36	1,60	6,55
	Tallos	1,36	0,70	5,81
<i>Malva sylvestris</i>	Hojas	1,36	1,58	6,42
	Tallo	1,35	1,28	6,03

Elaborado por: (Las autoras, 2024).

#### 4.6 Tamizaje fitoquímico

Los resultados del tamizaje fitoquímico de las especies vegetales se presentan en la **Tabla 12** y los resultados de manera visual de las pruebas cualitativas se muestran en el **Anexo 6**.

**Tabla 12** Resultados de la identificación cualitativa de compuestos fitoquímicos

Compuestos fitoquímicos	<i>Solanum nigrum</i>		<i>Malva sylvestris</i>	
	Hojas	Tallos	Hojas	Tallos
Fenoles	-	-	-	-
Taninos	+	+	+	+
Flavonoides	-	-	-	-
Saponinas	-	-	+	-

Glucósidos cardiotónicos	-	-	-	-
Resinas	-	-	-	-
Lactonas	-	-	-	-
Triterpenos	+	+	+	+
Alcaloides	+	+	+	+
Catequinas	+	-	+	-
Cumarinas	+	+	+	+

**Nota:** Presencia (+) y Ausencia (-)

**Elaborado por:** (Las autoras, 2024).

En *Solanum nigrum* se registró la presencia de taninos, triterpenos, alcaloides y cumarinas en hojas y tallos, no obstante, solo en hojas hubo resultados positivos para catequinas. Los resultados coinciden con los obtenidos por Caceres & Maza (2023) y López (2022). Sin embargo, se obtuvieron resultados negativos para flavonoides, saponinas, lactonas y fenoles, lo que concuerda con los hallazgos de Cañon & Menco (2018) y López (2022). Por último, la ausencia de glucósidos cardiotónicos y resinas en los extractos se respaldan con la evaluación realiza por Aronés Jara et al. (2022).

En las hojas y tallos de *Malva sylvestris* se identificó la presencia de taninos, triterpenos, alcaloides y cumarinas, mientras que saponinas y catequinas estuvieron presentes únicamente en las hojas. Resultados similares obtuvo Sarmiento-Tomalá et al. (2020), quienes reportaron un alto contenido de estos compuestos en extracto etanólico de hojas, así como la ausencia de glucósidos cardiotónicos y resinas. De igual manera en el estudio realizado por Reza et al. (2020), detallaron la existencia de los mismos compuestos fitoquímicos en extracto etanólico de hojas y tallos, coincidiendo en la ausencia de saponinas en ambos extractos.

#### 4.7 Actividad antibacteriana

Los resultados de la actividad antibacteriana mediante el método *Kirby-Bauer* se presentan en la **Tabla 13**. Los ensayos realizados para *S. nigrum* con *Salmonella typhimurium* y *Escherichia*

*coli* no presentaron formación de halos de inhibición a las 24 horas permaneciendo este resultado hasta las 48 horas de incubación, mientras que para *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* se observaron halos de inhibición de 13 mm a 17 mm en hojas respectivamente y de 10 mm a 15 mm en tallos respectivamente a las 24 horas, manteniéndose el resultado hasta las 48 horas de incubación.

Los ensayos realizados para *M. sylvestris*, con *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* no presentaron formación de halos de inhibición a las 24 horas permaneciendo este resultado hasta las 48 horas de incubación. mientras que para *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* se observaron halos de inhibición de 15 mm a 20 mm en hojas y tallos respectivamente a las 24 horas, manteniéndose el resultado hasta las 48 horas de incubación. Al revisar a las 24 horas se pudo observar el inicio de crecimiento de microorganismos al interior de los halos de inhibición en ambas especies. Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados visuales de los antibiogramas más representativos se muestran en el **Anexo 7**

Con la finalidad de establecer halos francamente limpios se realizó nuevamente el ensayo para estas dos bacterias y se consideró revisar las cajas cada hora a partir de las 11 horas de incubación. Con esto se logró establecer que a partir de las 16 horas de incubación se presentó halos de inhibición francos sin presencia de colonias al interior de los mismos, como se muestra en el **Anexo 8**

**Tabla 13** Resultados de la evaluación antibacteriana de los extractos vegetales a las 24 y 48 horas

Muestra	Concentración (ppm)	Halos de inhibición para cada microorganismo (mm)			
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. typhimurium</i>
	2500	-	-	-	-

<i>Solanum nigrum</i>	Hojas	5000	-	-	-	-
		10000	-	-	-	-
	Tallos	2500	-	-	-	-
		5000	-	-	-	-
		10000	-	-	-	-
	<i>Malva sylvestris</i>	Hojas	2500	-	-	-
5000			-	-	-	-
10000			-	-	-	-
Tallos		2500	-	-	-	-
		5000	-	-	-	-
		10000	-	-	-	-
<b><i>Antibiótico gentamicina Control positivo</i></b>			23,69	31,68	36,45	25,76
<b><i>Agua estéril Control negativo</i></b>			-	-	-	-

**Elaborado por:** (Las autoras, 2024).

Esta novedad en los resultados puede deberse a que la concentración del extracto no es suficiente para mantener la actividad antibacteriana por 24 horas, se debería realizar el ensayo con concentraciones más altas. Lo que determinaría que los resultados se encuentran relacionados con los indicados en la investigación de Villalobos (2019) que menciona que el extracto hidroalcohólico de *S. nigrum*, posee actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, registrando un promedio de 19 mm en el tamaño de los halos de inhibición. Por otro lado, Alarcón et al. (2019) y Balavivekananthan et al. (2021) realizaron la evaluación antimicrobiana con especies del género *Solanum*, reportando que los extractos vegetales presentan actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, mientras que frente a *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, existe mínima a nula inhibición del crecimiento bacteriano.

De acuerdo con Shadid et al. (2021), Fathi et al. (2022) y Dowek et al. (2020) reportaron que el extracto de *M. sylvestris* presenta actividad antibacteriana contra *S. aureus* y que la actividad contra *E. coli* es débil. Sin embargo, en el estudio realizado por Zahid et al. (2023) menciona que no se evidencia acción antibacteriana contra *E. coli*, *S. epidermidis* y *S. aureus*. Por otro lado, Dehghani & Saeidi (2023) encontraron que *S. typhimurium* es sensible al extracto etanólico a una concentración de 50 mg/mL.

#### 4.8 Actividad antioxidante

Los resultados de la actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH se presentan en la **Tabla 14**. El ensayo se realizó por triplicado para cada extracto como se detalla en el **Anexo 4**.

**Tabla 14** Resultados de la evaluación de la actividad antioxidante de los extractos vegetales

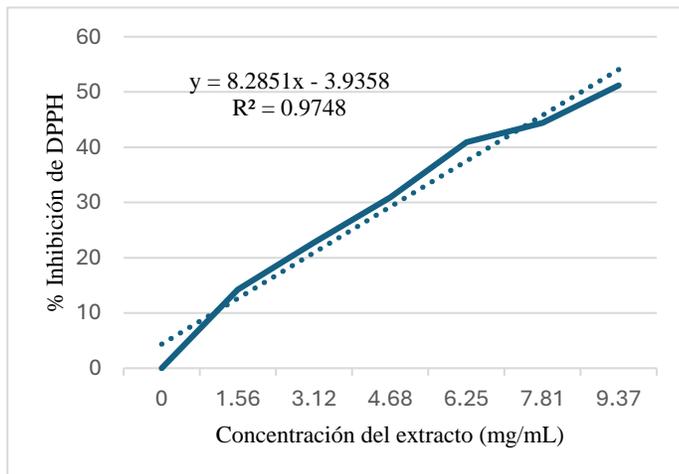
Muestra		Volumen de la muestra (µL)	Concentración (mg/mL)	Absorbancia 517 nm	% Inib. DPPH	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
<i>Malva sylvestris</i>	Hojas	0	0	0,9901	0	6,728
		10	0,50	0,9303	6,03	
		20	1,00	0,8631	12,83	
		40	2,00	0,7757	21,65	
		60	3,00	0,6365	35,71	
		80	4,00	0,5541	44,03	
		100	5,00	0,4627	53,26	
	Tallos	0	0	0,9901	0	5,048
		20	1,33	0,9383	5,22	
		40	2,66	0,7241	26,86	
		60	4,00	0,5783	41,59	
80		5,33	0,5101	48,48		

		100	6,66	0,3966	59,94	
<i>Solanum nigrum</i>	<b>Hojas</b>	0	0	0,9294	0	6,509
		50	1,56	0,7971	14,24	
		100	3,12	0,7177	22,78	
		150	4,68	0,6419	30,93	
		200	6,25	0,5494	40,88	
		250	7,81	0,5168	44,39	
		300	9,37	0,4537	51,18	
	<b>Tallos</b>	0	0	0,9294	0	25,852
		50	0,72	0,9254	0,43	
		150	2,16	0,8958	3,61	
		200	2,88	0,8541	8,10	
		250	3,60	0,8603	7,43	
		300	4,32	0,8452	9,06	

**Elaborado por:** (Las autoras, 2024).

En la **Figura 13**, **Figura 14**, **Figura 15** y **Figura 16** se observa las curvas de calibración obtenidas para determinar la concentración de inhibición del 50% del radical DPPH o  $IC_{50}$ . Se observa que existe una relación directamente proporcional entre la concentración y el porcentaje de inhibición, porque a medida que se aumenta la concentración de los extractos también aumenta la inhibición del DPPH.

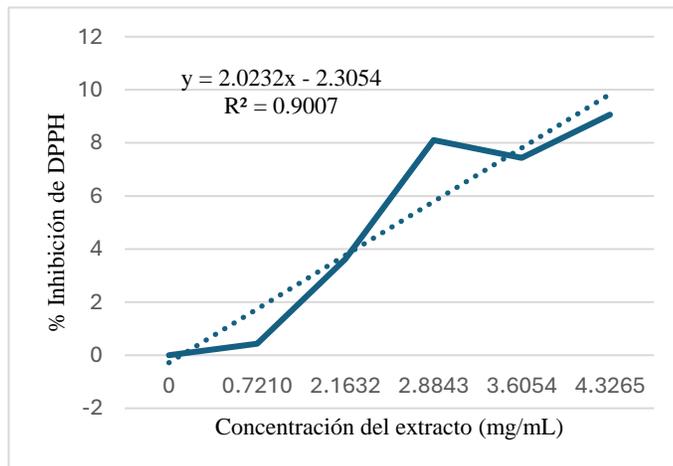
Inhibición de DPPH del extracto de hojas de  
*Solanum nigrum*



**Figura 13** Gráfica del porcentaje de inhibición del extracto de hojas de *S. nigrum*

**Elaborado por:** (Las autoras, 2024).

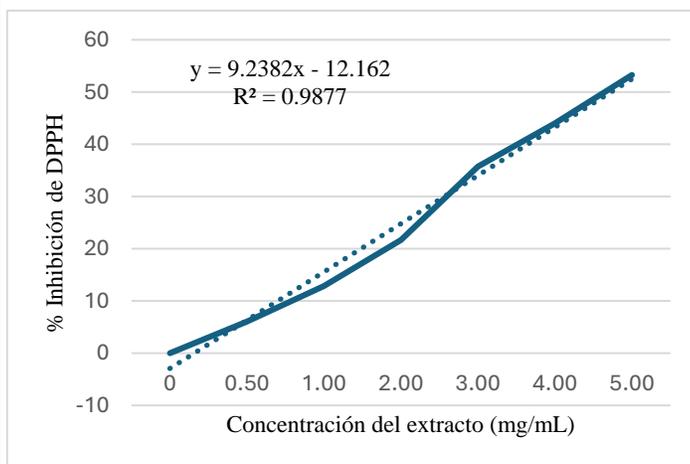
Inhibición de DPPH del extracto de tallos de  
*Solanum nigrum*



**Figura 14** Gráfica del porcentaje de inhibición del extracto de tallos de *S. nigrum*

**Elaborado por:** (Las autoras, 2024).

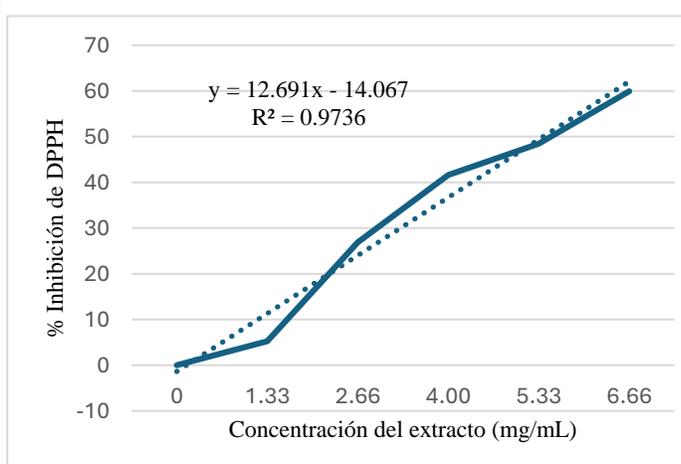
Inhibición de DPPH del extracto de hojas de  
*Malva sylvestris*



**Figura 15** Gráfica del porcentaje de inhibición del extracto de hojas de *M. sylvestris*

**Elaborado por:** (Las autoras, 2024).

Inhibición de DPPH del extracto de tallos de  
*Malva sylvestris*

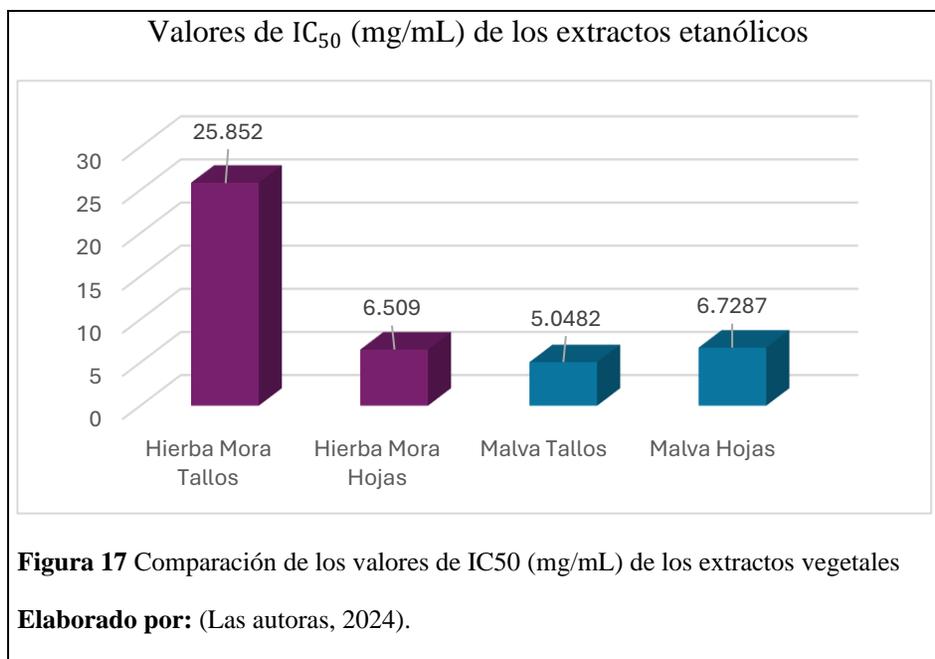


**Figura 16** Gráfica del porcentaje de inhibición del extracto de tallos de *M. sylvestris*

**Elaborado por:** (Las autoras, 2024).

Los valores de  $IC_{50}$  se determinaron según las ecuaciones generadas en las curvas de calibración, las regresiones lineales señalan valores cercanos a 1, lo que establece que son ecuaciones confiables para calcular el  $IC_{50}$ , cifra necesaria para establecer la capacidad antioxidante de cada extracto.

En la **Figura 17** se comparan los valores de  $IC_{50}$  de los extractos de las especies vegetales del presente estudio.



En base a la comparación entre los extractos etanólicos de hojas y tallos de las especies en estudio, se determinó que los resultados de la capacidad antioxidante son: el extracto de tallos de *M. sylvestris* tiene una alta capacidad antioxidante con un  $IC_{50} = 5,048$  mg/mL, seguido de los extractos de las hojas de *S. nigrum* y *M. sylvestris* que presentan capacidad antioxidante con  $IC_{50}$  iguales a 6,509 mg/mL y 6,728 mg/mL respectivamente, sin embargo, en el extracto de tallos de *S. nigrum* se evidenció una actividad antioxidante no significativa con un valor de  $IC_{50} = 25,85$

mg/mL. Esto se determina considerando que a menor valor de IC<sub>50</sub>, mayor será la capacidad antioxidante de las muestras.

Con respecto a los resultados obtenidos de *M. sylvestris* se puede establecer que coinciden con los obtenidos por Moualek et al. (2020) y Boutennoun et al. (2019) quienes mencionan que esta especie vegetal tiene alta capacidad antioxidante debido a que presenta una notable actividad para reducir los radicales DPPH, de igual manera confirman que a medida que aumenta la concentración del extracto lo hace también el efecto de eliminación de los radicales libres y que las concentraciones con los porcentajes más altos de inhibición fueron a 100 µg/mL y 125 µg/mL de extracto con valores de 55,21% y 76.11% respectivamente.

El estudio realizado por Sivaraj et al. (2020), respalda los resultados de la presente investigación respecto al extracto de hojas de *S. nigrum*, porque los autores mencionan que existe una alta capacidad antioxidante en hojas y se contempla que a mayor concentración de extracto mayor eliminación de radicales libres. Los porcentajes de inhibición fueron 73,16 ±5,12% en una concentración de 120 µg/mL. Sin embargo, en el extracto de tallos no se encontró una buena capacidad antioxidante concordando con Chen et al. (2022), quienes mencionan que la mayor capacidad antioxidante de la especie es cuestión se encuentra en los frutos.

#### **4.9 Actividad toxicológica**

Los resultados de la actividad toxicológica se muestran en la **Tabla 15** donde se especifican los valores de CL<sub>50</sub> para cada especie. El ensayo se realizó por duplicado como se detalla en el **Anexo 5**.

**Tabla 15** Resultados de la evaluación de la actividad toxicológica de los extractos vegetales

Especie vegetal		Concentración (µg/mL)	Promedio % Mortalidad	Valor Probit	Logaritmo Concentración	CL <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>Solanum nigrum</i>	Hojas	25	40	4,75	1,3979	38,90
		50	50	5,00	1,6990	
		100	80	5,84	2,000	
	Tallos	25	20	4,16	1,3979	56,23
		50	35	4,61	1,6990	
		100	80	5,84	2,0000	
<i>Malva sylvestris</i>	Hojas	25	100	7,33	1,3979	77,62
		50	45	4,87	1,6990	
		100	50	5,00	2,0000	
	Tallos	25	90	6,28	1,3979	3,66
		50	100	7,33	1,6990	
		100	100	7,33	2,0000	

Elaborado por: (Las autoras, 2024).

En la actividad toxicológica de *S. nigrum*, se encontraron valores de CL<sub>50</sub> iguales a 38,90 µg/mL y 56,23 µg/mL para hojas y tallos respectivamente. De acuerdo con la **Tabla 9** correspondiente a datos de referencia de una escala de toxicidad, los datos de CL<sub>50</sub> reportados indican que la especie es altamente tóxica. Resultados similares obtuvieron Cañon & Menco (2018) para una especie del género *Solanum*, quienes evaluaron la actividad toxicológica de *Solanum crinitipes* e indicaron que tanto las hojas y tallos presentan componentes tóxicos.

Los valores de CL<sub>50</sub> para *M. sylvestris* fueron de 77,62 µg/mL y 3,66 µg/mL para hojas y tallos respectivamente, conforme con la **Tabla 9** estas cifras nos reflejan que las hojas son altamente tóxicas y los tallos extremadamente tóxicos. De acuerdo con Bussmann et al. (2009),

reportaron que *M. sylvestris* es altamente tóxico. Si embargo, en la investigación de Sandoval et al. (2020) y Costa et al. (2022), se indica que la especie vegetal en cuestión es moderadamente tóxica. Con respecto a la diferencia de resultados se puede establecer al tipo de extracto en la investigación. En los estudios de comparación se utilizaron extractos hidroalcohólicos y tintura a diferencia de la presente investigación que fue extracto etanólico por maceración.

## 5 Conclusiones y Recomendaciones

En el presente estudio se logró identificar mediante secuencias Barcode a las especies vegetales en estudio, afirmando con certeza que corresponden a *Solanum nigrum* y *Malva sylvestris*.

En cuanto al objetivo planteado se puede establecer que las dos especies en estudio presentan una potencial actividad antioxidante y antibacteriana. En las infecciones intramamarias los microorganismos patógenos alteran las células polimorfonucleares y la actividad antibacteriana de los neutrófilos se genera a través del estallido respiratorio, que produce radicales libres como el hidroxilo y el oxígeno. Estos radicales son esenciales para la respuesta al agente causante de mastitis. Un estado de estrés oxidativo ocurre cuando el nivel de radicales libres supera la respuesta antioxidante endógena del animal y en exceso provocan daño tisular (Aranguren et al., 2017). En base a lo expuesto anteriormente, se puede considerar a *S. nigrum* y *M. sylvestris* como alternativas terapéuticas para el tratamiento de la mastitis en el ganado vacuno.

Una vez finalizada la investigación teórica y práctica se concluye que: la caracterización fitoquímica de los extractos etanólicos de hojas y tallos de *Solanum nigrum* y *Malva sylvestris* demostró la presencia de taninos, triterpenos, alcaloides, cumarinas y catequinas únicamente en hojas. Los metabolitos secundarios mencionados, pueden ser aprovechados dentro del campo de la Biotecnología para la elaboración de nuevas formulaciones farmacéuticas ya que poseen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas.

En la actividad antibacteriana de las especies vegetales la lectura del cultivo debe planificarse considerando intervalos de lecturas. En el presente estudio se obtuvieron resultados de inhibición franca a partir de las 16 horas de incubación en *S. epidermidis* y *S. aureus*, sin embargo,

a las 24 y 48 horas respectivamente se observó la presencia de colonias dentro del halo de inhibición.

Para la evaluación antioxidante, los valores de  $IC_{50}$  revelaron que las hojas de ambas especies y tallos de *M. sylvestris* poseen una buena capacidad antioxidante y que a medida que se aumenta la concentración mayor es la capacidad para atrapar los radicales libres. No obstante, en la evaluación toxicológica en base a los valores del porcentaje de mortalidad y  $CL_{50}$  se encontró que las hojas de las dos especies y los tallos de *S. nigrum* son altamente tóxicos, mientras que los tallos de *M. sylvestris* corresponden a una categoría de extremadamente tóxico. Para futuros estudios se sugiere realizar bioensayos en animales superiores y considerar extractos obtenidos por percolación.

Se recomienda realizar estudios similares con *Solanum nigrum* y *Malva sylvestris* recolectadas en diferentes temporadas del año para determinar la época donde existe mayor concentración de metabolitos secundarios y continuar investigando sobre las propiedades farmacológicas para su potencial uso en la elaboración de un producto farmacéutico.

## 6 Bibliografía

- Alarcón, L., Peña, A., Usubillaga, A., & Velasco, Y. (2019). Actividad antimicrobiana de los extractos polares de tres especies de Solanum: *S. hypomalocophyllum* Bitter, *S. mammosum* L y *S. sycophanta* Dunal et DC de Venezuela. *Revista Academia - Trujillo - Venezuela*, 69–83. ISSN 1690-3226
- Aranguren, A. J., Flores, C. A., Meléndez, C. E., Márquez, Y. C., & Ortega, A. A. L. (2017). Estrés oxidativo y actividad antioxidante en leche de vacas con mastitis subclínica. *Revista Veterinaria*, 28(2), 103–107. <https://doi.org/10.30972/vet.2822534>
- Aronés Jara, M. R., Cárdenas Landeo, E., Luna Molero, H. R., Barbarán Vilcatoma, S. M., & Gómez Quispe, M. (2022). Tamizaje fitoquímico, contenido de compuestos fenólicos y potencial antioxidante de trece plantas medicinales de los afloramientos rocosos del Bosque de Piedras de Huaraca en Perú. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 88(2), 165–179. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v88i2.388>
- Balavivekananthan, S., Xavier, T. F., Kumar, S. R. S., & Sabitha, R. (2021). *Antibacterial activity of Solanum elaeagnifolium Cav. stem and leaf extract against human pathogenic bacteria*. 14(March), 1339–1345. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2021.00238.9>
- Batiha, G. E. S., Tene, S. T., Teibo, J. O., Shaheen, H. M., Oluwatoba, O. S., Teibo, T. K. A., Alkuraishy, H. M., Al-Garbee, A. I., Alexiou, A., & Papadakis, M. (2023). The phytochemical profiling, pharmacological activities, and safety of malva sylvestris: a review. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 396(3), 421–440. <https://doi.org/10.1007/s00210-022-02329-w>
- Batista, A., Maruri, Mi., Torres, Y., Alvarez, A., Monge, M., Culcay, M., & Santana, W. (2021). Fitoterapia en la producción de la codorniz (*Coturnix coturnix* japónica). *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 5(6), 11421–11434. [https://doi.org/10.37811/cl\\_rcm.v5i6.1177](https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v5i6.1177)
- Boutennoun, H., Bousouf, L., Kebieche, M., Al-qaoud, K., & Madani, K. (2019). Phenolics content, antiproliferative and antioxidant activities of Algerian Malva sylvestris. *European Journal of Biological Research*, 9(1), 10–19. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.2545914>
- Bravo, J., Guillen, M., Guillén, S., & Cueva, T. (2023). Medicinales Para El Ganado Ethnoveterinary Knowledge of Medicinal Plants for Livestock. *ESPAMCIENCIA*, 14. [https://doi.org/https://doi.org/10.51260/revista\\_espamciencia.v14i1.335](https://doi.org/https://doi.org/10.51260/revista_espamciencia.v14i1.335)
- Bussmann, R., Malca, G., Glenn, A., Sharon, D., Nilsen, B., Parris, B., Dubose, D., Ruiz, D., Saleda, J., Martinez, M., Carrillo, L., Walker, K., Kuhlman, A., & Townesmith, A. (2009). Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. *Behavioral Brain Research*, 205(1), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.071>. Toxicity
- Caceres, A., & Maza, M. (2023). *Actividad cicatrizante de una crema base del extracto metanolico de Solanum nigrum L (Tomatillo del diablo)* [Universidad María Auxiliadora]. <https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://repositor>

io.uma.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12970/1760/TESIS%2520CACERES-MAZA.pdf%3Fsequence%3D1%26isAllowed%3Dy&ved=2ahUKEwicsd2K6f-GAxVkSzABHWQhD\_wQFnoECBIQAQ&usg=AOvVaw0eUWAZs

- Cañon, T., & Menco, M. (2018). *Estudio fitoquímico de la especie vegetal Solanum crinitipes Dunal (Solanaceae) y evaluación de uso como agente antimicrobiano* [Universidad de Ciencias Aplicadas Ambientales]. <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/993>
- Cerda-Granados, D. A., & Díaz, V. (2013). ADN genómico para *Pinus tecunumanii*. *Encuentro*, 94, 82–92.
- Chaves, N., Santiago, A., & Alías, J. C. (2020). Quantification of the antioxidant activity of plant extracts: Analysis of sensitivity and hierarchization based on the method used. *Antioxidants*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/antiox9010076>
- Chen, X., Dai, X., Liu, Y., Yang, Y., Yuan, L., He, X., & Gong, G. (2022). *Solanum nigrum Linn .: An insight into current research on traditional uses , phytochemistry , and pharmacology*. 13(August), 1–32. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.918071>
- Cheng, W. N., & Han, S. G. (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/https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156>
- Chiocchio, I., Mandrome, M., Tomasi, P., Mariancich, L., & Poli, F. (2021). *Plant Secondary Metabolites : An Opportunity for Circular Economy*. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules26020495>
- Costa, F., Mota, M., Rocha, A., Larocca, J., Kozłowski, V., & Rezende, M. (2022). Avaliação da toxicidade de diferentes concentrações de tinturas de malva e calêndula através do bioensaio com *Artemia salina*. *Research, Society and Development*, 11(3), e20511326255. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i3.26255>
- Dehghani, M., & Saeidi, S. (2023). Antimicrobial Effects of Medicinal Plant Species on *Salmonella typhimurium* Strains Isolated from Poultry Feces Samples. *Jentashapir Journal of Cellular and Molecular Biology*, 14(4). <https://doi.org/10.5812/jjcmb-135947>
- Diaz-Monroy, B., Baquero-Tapia, M., Guzñay-Apugllon, E., & Diaz-Arrieta, R. (2022). Diagnostico microbiologico de mastitis bovina y evaluacion de tres tratamientos en vacas jersey. *Polo Del Conocimiento*, 7(8), 625–640. <https://doi.org/10.23857/pc.v7i8>
- Dowek, S., Fallah, S., Basheer-SALIMIA, R., Jazzar, M., & Qawasme, A. (2020). Antibacterial, Antioxidant and Phytochemical Screening of Palestinian Mallow, *Malva Sylvestris L.* *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, October, 12–16. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2020v12i10.39053>
- Fathi, M., Ghane, M., & Pishkar, L. (2022). Phytochemical Composition, Antibacterial, and Antibiofilm Activity of *Malva sylvestris* Against Human Pathogenic Bacteria. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 17(1), 1–9. <https://doi.org/10.5812/jjnpp.114164>

- Fidalgo, L., Sariago, I., Fernández-Calienes, A., Mendiola, J., Monzonte, L., García, M., Acuña, D., Scull, R., & Gutiérrez, Y. (2009). Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Rev Cubana Med Trop*, 61(3), 254–258.
- Figliolo, R., Besil, N., Da Luz-Graña, C., Martínez, G., Porley, G., Míguas Borghini, I., Cesio, V., & Heinzen, H. (2023). Control de calidad preliminar de hierbas in natura comercializadas en Uruguay. Casos de estudio: manzanilla, marcela y tilo. *Innotec*, 26, 1–21. <https://doi.org/10.26461/26.05>
- García-Alcalde, M., Minaya, D., Alvariño, L., Iannacone, J., & Rodríguez, A. (2023). Ecotoxicological tests to evaluate antibiotics and ansiolytics in the aquatic environment. *Produccion y Limpia*, 18(1), 64–84. <https://doi.org/10.22507/pml.v18n1a5>
- García, A. P., Tamargo, B., Salas, E., Calzadilla, C., Acevedo, R., & Sierra, G. (2020). Phytochemical screening of extracts obtained from the *Sapindus saponaria* L plant that grows in Cuba. *Bionatura*, 5(3), 1209–1214. <https://doi.org/10.21931/RB/20120.05.03.7>
- Garro, A., Cardona, W., Rojano, B., Robledo, S., & Alzate, F. (2015). Actividad antioxidante y citotóxica de extractos de *Pilea dauciodora* Wedd ( *Urticaceae* ) Antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Pilea*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20(1), 88–97.
- Gil-rodríguez, J. R., Herrera-rojas, M. F., Mitre-velasco, Y., & Santamaría-rivas, C. (2020). Compuestos activos en plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana. *Revista RD*, 1(1), 175–200.
- Gómez-serranillos, M. S. (2021). *Plantas medicinales en farmacia comunitaria : de la validación farmacológica al DNA-Barcoding* [Universidad Complutense de Madrid]. <https://hdl.handle.net/20.500.14352/11783>
- González, R., & Vidal, M. (2021a). Mastitis bovina y calidad de la leche, un desafío para la salud humana. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(February), 2021. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/09638288.2019.1595750%0Ahttps://doi.org/10.1080/17518423.2017.1368728%0Ahttp://dx.doi.org/10.1080/17518423.2017.1368728%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.ridd.2020.103766%0Ahttps://doi.org/10.1080/02640414.2019.1689076%0Ahttps://doi.org/>
- González, R., & Vidal, M. (2021b). Mastitis bovina y calidad de la leche, un desafío para la salud humana. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(February), 2021. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/09638288.2019.1595750%0Ahttps://doi.org/10.1080/17518423.2017.1368728%0Ahttp://dx.doi.org/10.1080/17518423.2017.1368728%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.ridd.2020.103766%0Ahttps://doi.org/10.1080/02640414.2019.1689076%0Ahttps://doi.org/>
- Gutiérrez, M. (2021). *Estudio de los parámetros de calidad de la especie*.
- Guzmán, J., Castro, L., & Camones, R. (2020). Caracterización físico-química de la pomada de *Maytenus laevis* “Chuchuhuasi” elaborada en la Farmacia Natural del Hospital III EsSalud Chimbote. *Revista Peruana de Medicina Integrativa*, 5(4), 135–144.

<https://doi.org/10.26722/rpmi.2020.54.186>

- Irfan, A., Imran, M., Khalid, M., Sami Ullah, M., Khalid, N., Assiri, M. A., Thomas, R., Muthu, S., Raza Basra, M. A., Hussein, M., Al-Sehemi, A. G., & Shahzad, M. (2021). Phenolic and flavonoid contents in *Malva sylvestris* and exploration of active drugs as antioxidant and anti-COVID19 by quantum chemical and molecular docking studies. *Journal of Saudi Chemical Society*, 25(8), 101277. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2021.101277>
- Lara, E., Castro, L., & Camones, R. (2020). Control de Calidad de las Plantas Medicinales de la Farmacia Natural del CAMEC - Hospital III Chimbote TT - Quality Control of the Medicinal Plants of the Natural Pharmacy of CAMEC - Hospital III Chimbote. *Rev. Peru. Med. Integr*, 5(2), 68–79. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.26722/rpmi.2020.52.179>
- Lavado, I., Andamayo, D., Castillo, D., & Junchaya, V. (2021). Evaluación preliminar de 10 plantas medicinales del Valle del Mantaro mediante el método cualitativo ( fitoquímico ) para uso farmacéutico. *Visionarios En Ciencia y Tecnología*, 38–48. <https://doi.org/http://doi.org/10.47186/visct.v6il.88>
- Liza, M. (2020). “Efectos toxicos de los lixiviados de la mezcla de colillas de cigarro sobre *Daphnia magna* y *Artemia Franciscana*.” In *Universidad Científica del Sur. Facultad de Ciencias Ambientales. Ingeniería Ambiental*. <https://doi.org/https://doi.org/10.21142/tl.2021.1726>
- López, K. (2022). *evaluación in vitro del efecto neuroprotector de extractos de Oenothera rosea y Solanum nigrum L.* [Universidad Autónoma de Nuevo León]. [https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=http://eprints.ua.nl.mx/25896/&ved=2ahUKEwiRu7\\_d7v-GAxVJgoQIHTAHAYgQFnoECBIQAQ&usq=AOvVaw2cZbRFZITpeIRPMMImRSg4](https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=http://eprints.ua.nl.mx/25896/&ved=2ahUKEwiRu7_d7v-GAxVJgoQIHTAHAYgQFnoECBIQAQ&usq=AOvVaw2cZbRFZITpeIRPMMImRSg4)
- Mandal, S., Vishvakarma, P., Verma, M., Alam, S., Agrawal, A., & Mishra, A. (2023). *Solanum Nigrum Linn : An analysis of the medicinal properties of the plant*. 1595–1600. <https://doi.org/10.47750/pnr.2023.14.S02.194>
- Molina, L. (2020). Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de cinco especies de orquídeas de los géneros *Maxillaria*, *Catasetum* y *Epidendrum*, presentes en el Ecuador. *Tesis*, 1–100. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/18503%0Ahttp://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Moualek, I., Moualek, D., Benarab, K., Sebbane, H., Bariz, K., & Houali, K. (2020). Evaluation of Antioxidant Potential of Algerian *Malva Sylvestris* Aqueous Extract. *PONTE International Scientific Researches Journal*, 76(4). <https://doi.org/10.21506/j.ponte.2020.4.5>
- Moura, G., Freitas, C., Milagres, B., & Cruz Junior, C. (2021). Estudo do uso de plantas medicinais na medicina veterinária em plataformas virtuais. *Pubvet*, 15(4), 1–13. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v15n04a789.1-13>
- Mousavi, S. M., Hashemi, S. A., Behbudi, G., Mazraedoost, S., Omidifar, N., Gholami, A., Chiang, W. H., Babapoor, A., & Pynadathu Rumjit, N. (2021). A Review on Health Benefits



<https://doi.org/10.3303/CET2079062>

- Sarmiento-Tomalá, G. M., Miranda-Martínez, M., Chóez-Guaranda, I. A., Gutiérrez-Gaitén, Y. I., Delgado-Hernández, R., & Carrillo-Lavid, G. (2020). Pharmacognostic, chemical and mucolytic activity study of malva pseudolavatera webb & berthel. And malva sylvestris l. (malvaceae) leaf extracts, grown in ecuador. *Biodiversitas*, *21*(10), 4755–4763. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d211040>
- Shadid, K. A., Shakya, A. K., Naik, R. R., Jaradat, N., Farah, H. S., Shalan, N., Khalaf, N. A., & Oriquat, G. A. (2021). Phenolic content and antioxidant and antimicrobial activities of Malva sylvestris L., Malva oxyloba Boiss., Malva parviflora L., and Malva aegyptia L. leaves extract. *Journal of Chemistry*, *2021*. <https://doi.org/10.1155/2021/8867400>
- Sharun, K., Dhama, K., Tiwari, R., Gugjoo, M. B., Yattoo, I., Patel, S. K., Pathak, M., 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>
- Sivaraj, C., Yamini, S., Yahavi, A., Kumar, R. P., & Arumugam, P. (2020). Antioxidant , antimicrobial activities and GCMS analysis of fruit extract of Solanum nigrum L . *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *9*(4), 1114–1121. e-issn: 2278-4136
- Suarez-Barreiro, J., Suarez, M., & Parada, F. (2024). Efecto ecotóxico y preventivo del uso de aceites esenciales en la mastitis bovina. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*, 29–40. <https://doi.org/https://doi.org/10.37360/blacpma.24.23.1.3> Resumen:
- Torrenegra, M., Granados, C., & León, G. (2019). Extracción, caracterización y actividad antioxidante del aceite esencial de Eucalyptus globulus Labill. *The American Mathematical Monthly*, *44*(10), 659. <https://doi.org/10.2307/2301496>
- Valdano, T., G, T. E., & Juan, B. B. (2020). *Uso medicinal del Solanun nigrum y su relación con la presencia de metabolitos secundarios*. 158–176.
- Villalobos, C. (2019). *Efecto antimicobiano in vitro de los extractos etanólicos de Cinchona officinalis (cascaquilla) y Solanum nigrum (hierba mora) sobre Staphylococcus aureus ATCC 25923*. Universidad César Vallejo.
- Yu, J., Wu, X., Liu, C., Newmaster, S., Ragupathy, S., & Kress, W. J. (2021). Progress in the use of DNA barcodes in the identification and classification of medicinal plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *208*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111691>
- Zahid, P., Aamir, A., Dar, M., & Masoodi, M. (2023). Phytochemistry and Pharmacological Activity of Malva sylvestris L: A Detailed Insight. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, *26*(October). <https://doi.org/10.2174/0113862073269336231009110313>

## 7 Anexos

### Anexo 1 Condiciones del termociclador para el proceso de amplificación de secuencias

Etapas	<i>S. nigrum</i>		<i>M. sylvestris</i>		Ciclos
	Temperatura °C	Tiempo	Temperatura °C	Tiempo	
Desnaturalización inicial	98	5 minutos	98	5 minutos	1
Desnaturalización	98	10 segundos	98	10 segundos	
Alineamiento	53.5	10 segundos	55	10 segundos	40
Extensión	72	40 segundos	72	17 segundos	
Extensión final	72	1 minuto	72	10 minutos	1
Mantenimiento	4	∞	4	∞	

**Elaborado:** (Las autoras, 2024)

**Anexo 2** Resultados control de calidad del material vegetal seco

<i>Solanum nigrum</i>											
Hojas						Tallos					
	E1	E2	E3	Promedio	Humedad		E1	E2	E3	Promedio	Humedad
	(g)	(g)	(g)	(g)	%		(g)	(g)	(g)	(g)	%
M1	0,462	0,408	0,405	0,425	2,12	M1	0,477	0,625	0,456	0,519	5,17
M2	1,471	1,415	1,412	1,433		M2	1,480	1,629	1,460	1,523	
M3	1,451	1,393	1,389	1,411		M3	1,429	1,574	1,411	1,471	
	E1	E2	E3	Promedio	Cenizas		E1	E2	E3	Promedio	Cenizas
	(g)	(g)	(g)	(g)	%		(g)	(g)	(g)	(g)	%
P1	21,288	23,945	23,725	22,985	9,75	P1	24,103	24,036	23,104	23,748	13,84
P2	22,297	24,953	24,734	23,995		P2	25,111	25,041	24,106	24,753	
P3	21,385	24,043	23,822	23,084		P3	24,243	24,172	23,245	23,887	
<i>Malva sylvestris</i>											
Hojas						Tallos					
	E1	E2	E3	Promedio	Humedad		E1	E2	E3	Promedio	Humedad
	(g)	(g)	(g)	(g)	%		(g)	(g)	(g)	(g)	%
M1	0,41	0,414	0,578	0,467	2,38	M1	0,503	0,465	0,491	0,486	4,92
M2	1,417	1,419	1,587	1,474		M2	1,503	1,470	1,494	1,489	
M3	1,393	1,394	1,563	1,450		M3	1,455	1,419	1,445	1,439	
	E1	E2	E3	Promedio	Cenizas		E1	E2	E3	Promedio	Cenizas
	(g)	(g)	(g)	(g)	%		(g)	(g)	(g)	(g)	%
P1	21,440	21,653	21,319	21,471	12,48	P1	26,301	24,727	27,032	26,020	9,9
P2	22,448	22,659	22,327	22,478		P2	27,307	25,736	28,040	27,028	
P3	21,567	21,779	21,443	21,596		P3	26,400	24,827	27,131	26,120	

**Nota:** E1, E2 y E3 corresponde al número de ensayo, M1/P1 = peso del crisol vacío, M2 = peso del crisol más la muestra húmeda, M3 = peso del crisol más la muestra seca, P2 = peso del crisol más la muestra pulverizada y P3= peso del crisol más la ceniza.

**Elaborado:** (Las autoras, 2024)

**Anexo 3** Resultados del control de calidad del extracto vegetal

<i>Malva sylvestris</i>									
Hojas					Tallos				
	M1	M2	Promedio	S. totales		M1	M2	Promedio	S. totales
	(g)	(g)	(g)	%		(g)	(g)	(g)	%
A	24,113	23,183	23,648	1.,58	A	24,790	27,095	25,943	1,28
B	24,034	23,105	23,569		B	24,727	27,032	25,879	
	M1	M2	M3	Índice Ref.		M1	M2	M3	Índice Ref.
	1,361	1,361	1,361	1,361		1,364	1,365	1,340	1,356
	M1	M2	M3	pH		M1	M2	M3	pH
	6,410	6,430	6,430	6,420		6,040	6,030	6,040	6,030
<i>Solanum nigrum</i>									
Hojas					Tallos				
	M1	M2	Promedio	S. totales		M1	M2	Promedio	S. totales
	(g)	(g)	(g)	%		(g)	(g)	(g)	%
A	22,72	22,381	22,550	1,6	A	23,248	25,186	24,217	0,7
B	22,638	22,303	22,470		B	23,204	25,161	24,217	
	M1	M2	M3	Índice Ref.		M1	M2	M3	Índice Ref.
	1,363	1,362	1,362	1,362		1,365	1,365	1,365	1,365
	M1	M2	M3	pH		M1	M2	M3	pH
	6,540	6,560	6,560	6,550		5,820	5,810	5,800	5,810

**Nota:** M1, M2 y M3 corresponde al número de medición, A = peso del crisol más el residuo seco, B= peso del crisol.

**Elaborado:** (Las autoras, 2024)

**Anexo 4** Resultados de la evaluación de la actividad antioxidante

Muestra	Vol.Muestra	Concentración	Absorbancia			Prom. Absorb.	% Inhib. DPPH
	( $\mu$ L)	(mg/mL)	L1	L2	L3		
Ácido ascórbico	0	0	0	0	0	0	0
	10	0,0004	0,70	0,70	0,70	0,70	1,80
	20	0,0007	0,68	0,68	0,68	0,68	5,12
	40	0,0014	0,65	0,65	0,65	0,65	8,61
	60	0,0022	0,63	0,63	0,63	0,63	11,74
	80	0,0029	0,59	0,59	0,59	0,59	17,87
	100	0,0036	0,57	0,57	0,57	0,57	20,12
Hojas <i>Malva sylvestris</i>	0	0	0,98	0,98	0,99	0,99	0
	10	0,5	0,93	0,93	0,92	0,93	6,03
	20	1	0,86	0,86	0,86	0,86	12,83
	40	2	0,78	0,77	0,77	0,77	21,65
	60	3	0,63	0,63	0,63	0,63	35,71
	80	4	0,55	0,55	0,55	0,55	44,03
	100	5	0,46	0,46	0,46	0,46	53,26
Tallos <i>Malva sylvestris</i>	0	0	0,98	0,98	0,99	0,99	0
	20	1,33	0,94	0,93	0,94	0,93	5,22
	40	2,66	0,72	0,72	0,72	0,72	26,86
	60	4	0,57	0,57	0,58	0,57	41,59
	80	5,33	0,50	0,51	0,51	0,51	48,48
	100	6,66	0,39	0,39	0,39	0,39	59,94
Hojas <i>Solanum nigrum</i>	0	0	0,92	0,92	0,93	0,92	0
	50	1,5625	0,79	0,79	0,79	0,79	14,24
	100	3,125	0,71	0,71	0,71	0,71	22,78
	150	4,6875	0,64	0,64	0,63	0,64	30,93
	200	6,25	0,55	0,54	0,54	0,54	40,88

	250	7,81	0,51	0,51	0,51	0,51	44,39
	300	9,375	0,4538	0,4532	0,454	0,4537	51,18
Tallos <i>Solanum nigrum</i>	0	0	0,9288	0,9275	0,932	0,9294	0
	50	0,721	0,92532	0,9248	0,9261	0,9254	0,43
	150	2,1632	0,8943	0,8912	0,9019	0,8958	3,61
	200	2,8843	0,8528	0,8545	0,8551	0,8541	8,10
	250	3,6054	0,8592	0,8587	0,863	0,8603	7,43
	300	4,3265	0,8437	0,8456	0,8463	0,8452	9,06

**Elaborado:** (Las autoras, 2024)

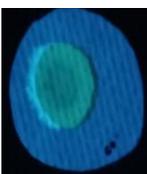
**Anexo 5** Resultados de la evaluación de la actividad toxicológica

Muestra	Concentración (ug/ml)	Ensayo 1			Ensayo 2			Prom. %Mortalidad	Probit	Log. Concentración	CL50 (ug/ml)	Grado toxicidad
		Vivos	Muertos	% Mortalidad	Vivos	Muertos	% Mortalidad					
Hojas <i>Solanum nigrum</i>	25	6	4	40	6	4	40	40%	4,75	1,3979	38,9	Altamente tóxico
	50	5	5	50	5	5	50	50%	5	1,699		
	100	3	7	70	1	9	90	80%	5,84	2		
Tallos <i>Solanum nigrum</i>	25	9	1	10	7	3	30	20%	4,16	1,3979	56,2	Altamente tóxico
	50	7	3	30	6	4	40	35%	4,61	1,699		
	100	2	8	80	2	8	80	80%	5,84	2		
Hojas <i>Malva sylvestris</i>	25	0	10	100	0	10	100	100%	7,33	1,3979	77,6	Altamente tóxico
	50	4	6	60	7	3	30	45%	4,87	1,699		
	100	5	5	50	5	5	50	50%	5	2		
Tallos <i>Malva sylvestris</i>	25	1	9	90	1	9	90	90%	6,28	1,3979	3,66	Extremadamente toxico
	50	0	10	100	0	10	100	100%	7,33	1,699		
	100	0	10	100	0	10	100	100%	7,33	2		
Etanol 96%								100%				
Solución salina 2%								0%				

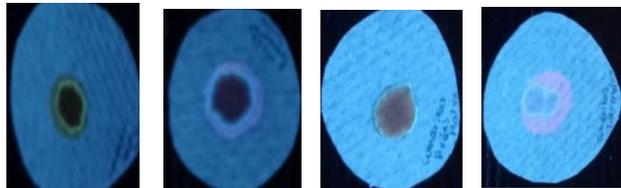
**Elaborado:** (Las autoras, 2024)

**Anexo 6** Resultados tamizaje fitoquímico

Compuestos fitoquímicos	<i>Solanum nigrum</i>		<i>Malva sylvestris</i>	
	Hojas	Tallos	Hojas	Tallos
Fenoles				
Taninos				
Flavonoides				
Saponinas				

Glucósidos cardiotónicos				
Resinas				
Triterpenos				
Alcaloides				
Catequinas				

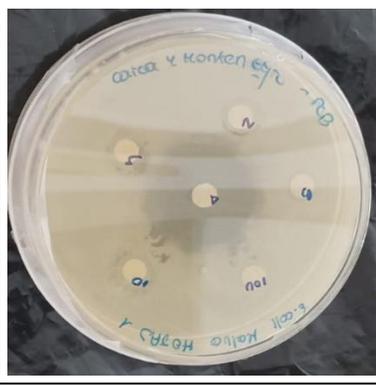
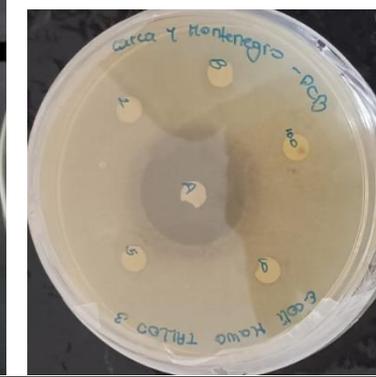
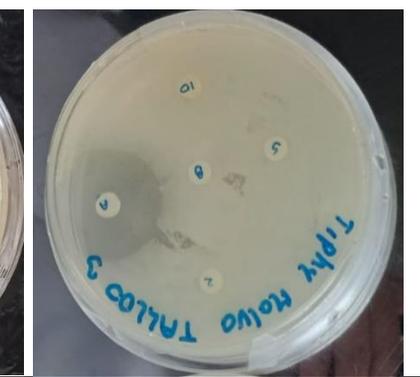
Cumarinas



**Elaborado:** (Las autoras, 2024)

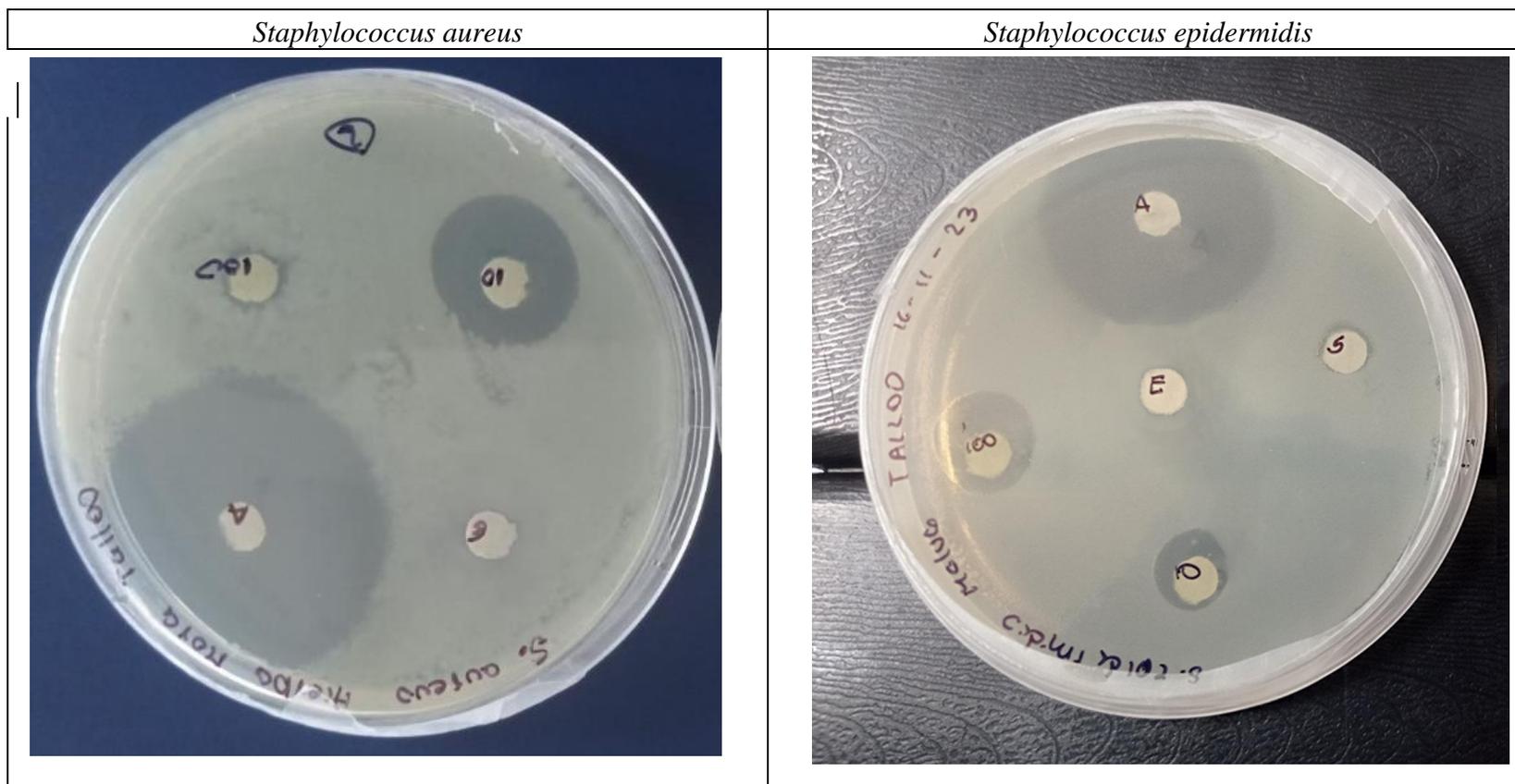
**Anexo 7** Resultados de los antibiogramas a las 24 horas

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
Hojas <i>Solanum nigrum</i>				
Tallos <i>Solanum nigrum</i>				

<p>Hojas <i>Malva sylvestris</i></p>				
<p>Tallos <i>Malva sylvestris</i></p>				

Elaborado: (Las autoras, 2024)

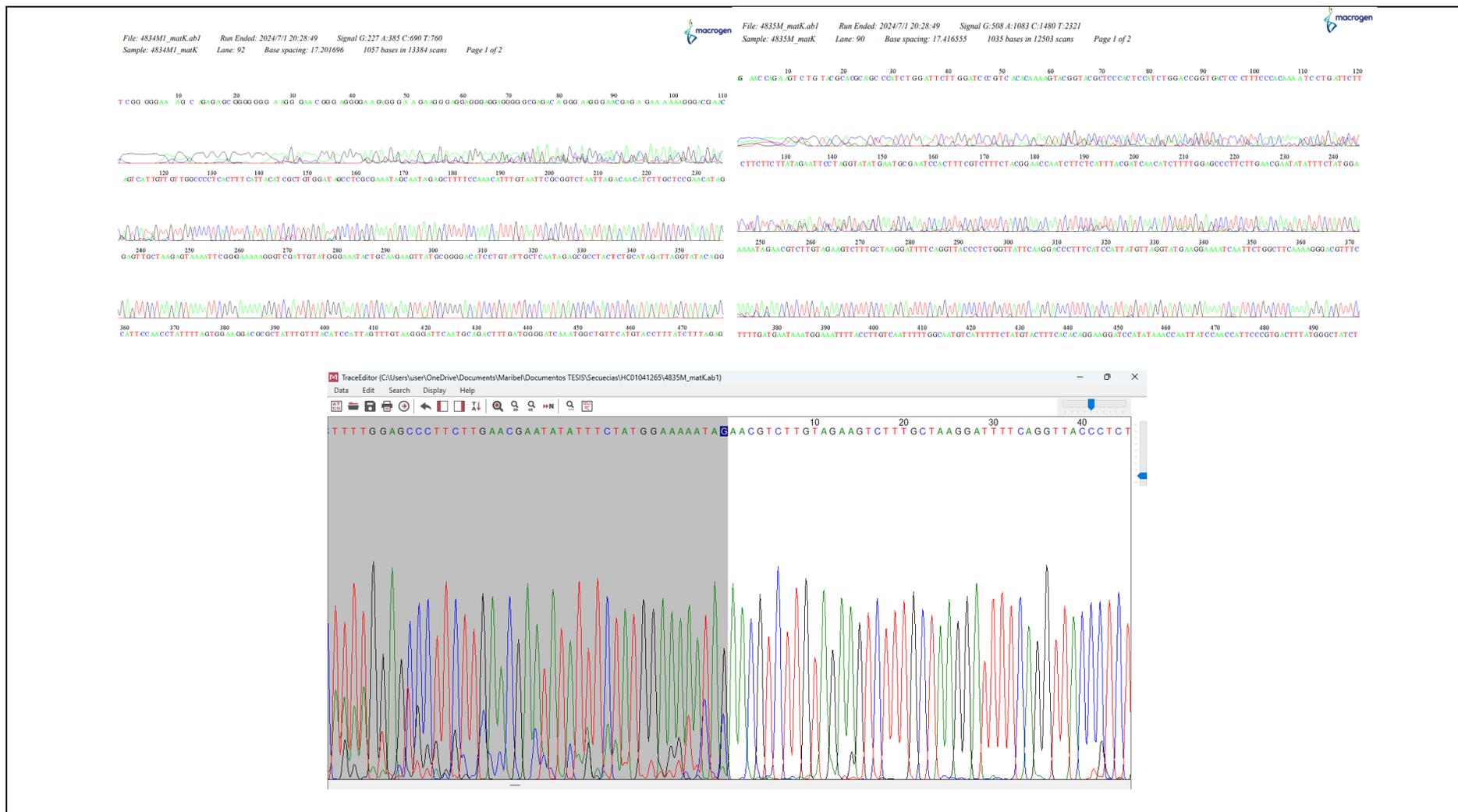
**Anexo 8** Resultados de los antibiogramas de *S. epidermidis* y de *S. aureus*.



**Nota:** La lectura para *S. epidermidis* y de *S. aureus* se realizó a las 16 horas de incubación.

**Elaborado por:** (Las autoras, 2024).

## Anexo 9 Secuencias enviadas por la empresa Macrogen



**Nota:** La imagen superior derecha corresponde a la muestra 4834, la imagen superior izquierda corresponde a la muestra 4835 y la imagen inferior indica los cortes que se realizaron a las secuencias obtenidas de la compañía Macrogen.

**Elaborado por:** (Las autoras, 2024).

## Anexo 10 Resultados de la plataforma BOLDSYSTEMS.

### Muestra 4834

M11: Alignment Explorer (Malva.fas)

Species/Abbrv: 1. 4785RC

C C C T C C T T T C A T T T C A T C G C T G T G A T G C C T C C D A A T A G C A T A G G C T T T C G A A C T T T G A T T C G G O T T A T T G C A C T C T T C T C C G

Site # 1 with w/o gaps Selected genetic code: Standard

### Muestra 4835

M11: Alignment Explorer (HM.fas)

Species/Abbrv: 1. H.M-Lmpia

A C G T C T T G T G A G T C T T T C T A G G A T T T C A G T T C C C T C T G G T A T T C A A G G C C C T T T C A T C A T T A T G T T A G G A T G A G G A A A A T C A A T T C T G G C T

Site # 571 with w/o gaps Selected genetic code: Standard

Query 1	CCCTCACTTTCATTACATCGCTGTGGATAGCCTCGCGAAATAGCAATAGAGCTTTTCCAA	60	Query 1	AACGTCCTTGTAAGTCTTTGCTAAGGATTTTCAGGTTACCTCTGGTTATTCAAGGACC	60
Sbjct 59	CCCTCACTTTCATTACATCGCTGTGGATTGCTCGCGAAATAGCAATAGAGCTTTTCCAG	118	Sbjct 2911	AACGTCCTTGTAAGTCTTTGCTAAGGATTTTCAGGTTACCTCTGGTTATTCAAGGACC	2852
Query 61	ACATTTGTAATTCGCGGTCTAATTAGACAACATCTTGCTCCGAACATAGGAGTTGCTAAG	120	Query 61	CTTTCATCCATTATGTTAGGTATGAAGGAAAATCAATTCGGCTTCAAAAGGGACGTTTC	120
Sbjct 119	ACATTTGTAATTCGCGGTCTAATTAGACAACATCTTGCTCCGAACATAGGAGTTGCTAAG	178	Sbjct 2851	CTTTCATCCATTATGTTAGGTATGAAGGAAAATCAATTCGGCTTCAAAAGGGACGTTTC	2792
Query 121	AGTAAAATTCGGGAAAAAGGGTCGATTGTATGGGAAACTGCAAGAAGTTATGCGGGGA	180	Query 121	TTTTGATGAATAAATGGAATTTTACCTTGTCAATTTTGGCAATGTCATTTTCTATGT	180
Sbjct 179	AGTAAAATTCGGGAAAAAGGGTCGATTGTATGGGAAACTGCAAGAAGTTATGCGGGGA	238	Sbjct 2791	TTTTGATGAATAAATGGAATTTTACCTTGTCAATTTTGGCAATGTCATTTTCTATGT	2732
Query 181	CATCCTGTATTGCTCAATAGAGCGCCTACTCTGCATAGATTAGGTATACAGGCATTCCAA	240	Query 181	ACTTTCACACAGGAAGGATCCATATAAACCAATTATCCAACCATCCCGTGACTTTATGG	240
Sbjct 239	CATCCTGTATTGCTCAATAGAGCGCCTACTCTGCATAGATTAGGTATACAGGCATTCCAA	298	Sbjct 2731	ACTTTCACACAGGAAGGATCCATATAAACCAATTATCCAACCATCCCGTGACTTTATGG	2672
Query 241	CCTATTTTAGTGAAGGACGCCTATTTGTTTACATCCATTAGTTTGTAAAGGATTCAAT	300	Query 241	GCTATCTTTCAAGTGTGCGACTAAATCATTCAATGGTACGTAGTCAATGTTAGCAAATT	300
Sbjct 299	CCTATTTTAGTGAAGGACGCCTATTTGTTTACATCCATTAGTTTGTAAAGGATTCAAT	358	Sbjct 2671	GCTATCTTTCAAGTGTGCGACTAAATCATTCAATGGTACGTAGTCAATGTTAGCAAATT	2612
Query 301	GCAGACTTTGATGGGGATCAAATGGCTGTTTCATGT	335	Query 301	CATTTCTAATCAATAATCCAATTAAGAAGTTCGATACCTTGTTCCAATTATTCTTTGA	360
Sbjct 359	GCAGACTTTGATGGGGATCAAATGGCTGTTTCATGT	393	Sbjct 2611	CATTTCTAATCAATAATCCAATTAAGAAGTTCGATACCTTGTTCCAATTATTCTTTGA	2552
			Query 361	TTGGATCATTAGCTAAAGCACACTTTTGTACCGTATTAGGGCATCCATTAGTAAACCGG	420
			Sbjct 2551	TTGGATCATTAGCTAAAGCACACTTTTGTACCGTATTAGGGCATCCATTAGTAAACCGG	2492

**Nota:** La imagen superior indica las secuencias limpias de las muestras, las mismas son insertadas en la plataforma BOLDSYSTEMS donde nos indican la similitud con las especies correspondientes *Malva sylvestris* y *Solanum nigrum* y nos indica su valor de E-value.

**Elaborado por:** (Las autoras, 2024).