



Universidad Nacional
SAN LUIS GONZAGA



Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional

Esta licencia permite a otras distribuir, combinar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial y, a pesar que son nuevas obras deben siempre rendir crédito y ser no comerciales, no están obligadas a licenciar sus obras derivadas bajo los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>



AT 2025-FFBB-095

CONSTANCIA

El que suscribe, deja constancia que se ha realizado el análisis con el software de verificación de similitud al documento cuyo título de **Informe final de tesis** es:

Actividad antimicrobiana in vitro de los extractos etanólicos de hojas y raíces del *Plantago major* (llantén) que crecen en zonas rurales de Ica, 2025

Presentado por:

HUAYCOCHEA LLANCARI PAOLA CRISTINA

Bachiller del nivel **PREGRADO** de la Facultad de **FARMACIA Y BIOQUÍMICA**. El resultado obtenido es 0% por el cual se otorga el calificativo de:

APROBADO, según Reglamento de Evaluación de la Originalidad.

Con Código de Matricula: 20172271

Se adjunta al presente el reporte de evaluación con el software de verificación de originalidad.

Ica, 14 de octubre de 2025

Dr. PEÑA GALINDO JULIO JOSE
DIRECTOR DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



UNIVERSIDAD NACIONAL “SAN LUIS GONZAGA”

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

Facultad de Farmacia y Bioquímica



Actividad antimicrobiana in vitro de los extractos etanólicos
de hojas y raíces del *Plantago major* (llantén) que crecen en zonas
rurales de Ica, 2025

Línea de Investigación

Salud Pública y Conservación del Medio Ambiente

INFORME FINAL DE TESIS

AUTOR

BACH. HUAYCOCHEA LLANCARI, PAOLA CRISTINA

Ica, Perú

2025

DEDICATORIA

A Dios, por brindarme la fuerza, claridad y salud necesarias para recorrer este trayecto académico.

De igual manera, a mi madre, Carmen Llancari, por su constante respaldo, por sus palabras de ánimo cuando más las necesité y por confiar en mí, incluso en los momentos en que yo misma dudaba.

A mi tía, Magdalena Molina, por haberme apoyado en todo lo que pudo durante este proceso académico.

Y a mí misma, por mantenerme firme, por dar lo mejor de mí cada día y por haber alcanzado esta meta con esfuerzo y perseverancia.

AGRADECIMIENTO

A mis asesores: la Dra. Jessica Yolanda Huarcaya Rojas y el Biólogo Luis Cartagena Siguas, por su valioso acompañamiento durante la realización de este trabajo. Su orientación, paciencia y aportes técnicos fueron esenciales para la culminación exitosa de esta investigación.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica, a todos los docentes y al personal administrativo, quienes, a lo largo de mi formación universitaria, no solo compartieron conocimientos, sino también experiencias que marcaron mi crecimiento académico y personal. Gracias a su entrega, hoy me siento preparada para asumir los desafíos que la profesión exige.

Cada página de esta tesis representa el esfuerzo compartido con todos ellos, a quienes dedico con profundo respeto y aprecio este logro. Este trabajo no habría sido posible sin el aporte de cada uno de los mencionados, a quienes extiendo mi más sincero agradecimiento.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| ÍNDICE | iv |
| ÍNDICE DE TABLAS | vi |
| ÍNDICE DE FIGURAS | vii |
| RESUMEN | viii |
| ABSTRACT..... | ix |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 10 |
| 1.1. Marco teórico..... | 11 |
| 1.1.1. Resistencia antimicrobiana | 11 |
| 1.1.2. Enfermedades infecciosas | 12 |
| 1.1.3. Fitofármaco..... | 13 |
| 1.1.4. Productos alternativos..... | 13 |
| 1.1.5. Métodos para determinar la actividad antimicrobiana | 13 |
| 1.1.6. <i>Plantago major</i> | 14 |
| 1.2. Problema general: | 16 |
| 1.3. Problemas específicos:..... | 17 |
| 1.4. Planteamiento del problema | 17 |
| 1.4.1. Antecedentes de la investigación | 18 |
| 1.5. Justificación e importancia de la investigación | 21 |
| 1.6. Objetivos | 22 |
| 1.7. Hipótesis..... | 23 |
| 1.8. Descripción del Contenido Capitular..... | 24 |
| II. ESTRATEGIA METODOLÓGICA..... | 25 |
| 2.1. Enfoque, tipo, nivel y diseño de la investigación | 25 |
| 2.1.1. Enfoque de investigación..... | 25 |
| 2.1.2. Tipo de investigación | 25 |
| 2.1.3. Nivel de la investigación..... | 25 |
| 2.1.3. Diseño de investigación | 25 |

| | | |
|--------|--|----|
| 2.2. | Población y muestra | 25 |
| 2.3. | Variables de la investigación | 26 |
| 2.4. | Técnicas e instrumentos de recolección de la información | 28 |
| 2.4.1. | Procedimientos experimentales | 28 |
| 2.5. | Instrumentos de recolección de la información..... | 42 |
| 2.6. | Herramientas para el análisis estadístico..... | 42 |
| 2.7. | Aspectos éticos | 42 |
| III. | RESULTADOS..... | 44 |
| IV. | DISCUSIÓN | 62 |
| V. | CONCLUSIONES..... | 64 |
| VI. | RECOMENDACIONES | 65 |
| VII. | REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS | 66 |
| VIII. | ANEXOS..... | 72 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Resultados de la identificación fitoquímica de los extractos etanólicos de hojas y raíces de <i>Plantago major</i> (llantén). | 44 |
| Tabla 2: Resultados del análisis organoléptico de los extractos etanólicos de hojas y raíces de <i>Plantago major</i> (llantén). | 45 |
| Tabla 3: Promedio \pm desviación estándar de los halos de inhibición (mm) del extracto etanólico de hojas de <i>Plantago major</i> frente a microorganismos patógeno, control positivo y negativo. ... | 45 |
| Tabla 4: Promedio \pm desviación estándar de los halos de inhibición (mm) del extracto etanólico de raíces de <i>Plantago major</i> frente a microorganismos patógeno, control positivo y negativo. . | 46 |
| Tabla 5: Porcentaje de Inhibición Relativa (PIR) de los extractos etanólicos de hojas y raíces de <i>Plantago major</i> frente a microorganismos patógenos. | 49 |
| Tabla 6: ANOVA del efecto de las concentraciones del extracto etanólico de hojas y raíces de <i>Plantago major</i> y control positivo de los halos de inhibición frente a las cepas evaluadas con un nivel de confiabilidad de 95% ($\alpha=0.05$). | 50 |
| Tabla 7: Prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para los tratamientos de extracto etanólico de hojas y raíces (40 % y 20 %) de <i>Plantago major</i> vs control positivo frente a los microorganismos evaluados | 51 |
| Tabla 8: CMI del extracto etanólico de las hojas y raíces de <i>Plantago major</i> frente a cepas patógenas. | 52 |
| Tabla 9: Comparación de las medias de los halos de inhibición de los extractos etanólicos e hojas y raíces de <i>Plantago major</i> frente a cada cepa evaluada. | 54 |
| Tabla 10: ANOVA de los halos de inhibición de los extractos de hojas y raíces de <i>Plantago major</i> frente a las cepas evaluadas con un nivel de confiabilidad de 95 % ($\alpha=0.05$) | 54 |
| Tabla 11: Prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) de comparaciones múltiples para la identificación del tratamiento con mayor halo de inhibición en hojas o raíces de <i>Plantago major</i> frente a cada microorganismo evaluado. | 55 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Organigrama de la obtención de los extractos etanólicos de <i>Plantago major</i> | 33 |
| Figura 2: Organigrama de la reactivación de los microorganismos..... | 38 |
| Figura 3: Actividad antimicrobiana (promedio de halos de inhibición) de los extractos etanólicos de hojas y raíces de <i>Plantago major</i> en comparación con el control positivo frente a <i>Candida albicans</i> | 47 |
| Figura 4: Actividad antimicrobiana (promedio de halos de inhibición) de los extractos etanólicos de hojas y raíces de <i>Plantago major</i> en comparación con el control positivo frente a <i>Staphylococcus aureus</i> | 47 |
| Figura 5: Actividad antimicrobiana (promedio de halos de inhibición) de los extractos etanólicos de hojas y raíces de <i>Plantago major</i> en comparación con el control positivo frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 48 |
| Figura 6: Actividad antimicrobiana (promedio de halos de inhibición) de los extractos etanólicos de hojas y raíces de <i>Plantago major</i> en comparación con el control positivo frente a <i>Escherichia coli</i> | 48 |
| Figura 7: Actividad antimicrobiana (promedio de halos de inhibición) de los extractos etanólicos de hojas y raíces de <i>Plantago major</i> en comparación con el control positivo frente a <i>Klepsiella pneumoniae</i> | 49 |
| Figura 8: Comparación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de hojas y raíces de <i>Plantago major</i> frente a cinco cepas microbianas..... | 53 |
| Figura 9: Comparación de halos de inhibición frente a <i>Candida albicans</i> entre extractos etanólicos de hojas y raíces de <i>Plantago major</i> | 57 |
| Figura 10: Comparación de halos de inhibición frente a <i>Staphylococcus aureus</i> entre extractos etanólicos de hojas y raíces de <i>Plantago major</i> | 58 |
| Figura 11: Comparación de halos de inhibición frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> entre extractos etanólicos de hojas y raíces de <i>Plantago major</i> | 59 |
| Figura 12: Comparación de halos de inhibición frente a <i>Escherichia coli</i> entre extractos etanólicos de hojas y raíces de <i>Plantago major</i> | 60 |
| Figura 13: Comparación de halos de inhibición frente a <i>Klepsiella pneumoniae</i> entre extractos etanólicos de hojas y raíces de <i>Plantago major</i> | 60 |

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue identificar la concentración de los extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major* que presento mayor actividad antimicrobiana *in vitro* frente a las cepas patógenas evaluadas, en comparación con un antimicrobiano de referencia y un control negativo. Se empleó un diseño experimental, de tipo aplicado y nivel descriptivo, usando como control positivo cloranfenicol o clotrimazol al 1 % según corresponda y como control negativo alcohol al 96°. Se evaluaron cinco microorganismos: *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Los extractos se probaron a concentraciones de 80 %, 40 % y 20 % mediante difusión en agar y la CMI por dilución en caldo. Todos los tratamientos mostraron actividad antimicrobiana significativa, aunque inferior al control positivo. En la mayoría de los casos, el extracto de raíces al 20 % presentó mayores halos de inhibición, con un PIR de 68,7 % frente a *P. aeruginosa* y 66,1 % frente a *K. pneumoniae*, excepto en *E. coli*, donde el extracto de hojas al 40 % alcanzó un PIR de 71,9 %. La CMI fue de 50 mg/mL para la mayoría de cepas, excepto *E. coli* (25 mg/mL en raíces). La Identificación fitoquímica identificó metabolitos secundarios como taninos, flavonoides, alcaloides, saponinas, entre otros, asociados a la actividad antimicrobiana. Se concluyó que *P. major* presentó un potencial antimicrobiano relevante, influenciado por la parte vegetal, la concentración y el microorganismo, destacando las raíces como más efectivas frente a la mayoría de cepas a concentraciones de 20 % y 40 %.

Palabras clave: *Plantago major*, actividad antimicrobiana, concentración mínima inhibitoria (CMI), Porcentaje de Inhibición Relativa (PIR).

ABSTRACT

The objective of this study was to identify the concentration of ethanolic leaf and root extracts of *Plantago major* that exhibited the highest in vitro antimicrobial activity against the evaluated pathogenic strains, in comparison with a reference antimicrobial and a negative control. An applied experimental design of descriptive level was employed, using chloramphenicol or clotrimazole at 1% as positive controls, and 96% alcohol as negative control. Five microorganisms were tested: *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae*. Extracts were evaluated at concentrations of 80%, 40%, and 20% using the agar diffusion method, and the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by broth dilution. All treatments showed significant antimicrobial activity, although lower than the positive control. In most cases, the root extract at 20% exhibited the largest inhibition zones, with a relative inhibition percentage (PIR) of 68,7% against *P. aeruginosa* and 66.1% against *K. pneumoniae*, except for *E. coli*, where the leaf extract at 40% reached a PIR of 71,9%. The MIC was 50 mg/mL for most strains, except for *E. coli* (25 mg/mL for roots). The phytochemical identification revealed secondary metabolites such as tannins, flavonoids, alkaloids, saponins, among others, associated with antimicrobial activity. It was concluded that *P. major* presented a relevant antimicrobial potential, influenced by the plant part, the concentration, and the microorganism, highlighting the roots as more effective against most strains at concentrations of 20% and 40%.

Keywords: *Plantago major*, antimicrobial activity, minimum inhibitory concentration (MIC), relative inhibition percentage (RIP).

I. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, las enfermedades infecciosas causadas por bacterias y hongos resistentes a múltiples fármacos se han consolidado como uno de los principales desafíos para la salud pública en todo el mundo. La resistencia antimicrobiana compromete la eficacia de los tratamientos médicos convencionales, incrementa la morbilidad y mortalidad, y genera una carga económica considerable para los sistemas sanitarios, especialmente en países en desarrollo (1).

Este escenario se vuelve más complejo al considerar la creciente prevalencia de microorganismos patógenos multirresistentes como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*, causantes comunes de infecciones nosocomiales, urinarias, respiratorias y sistémicas (2, 3). Estas cepas presentan alta capacidad de adaptación frente a múltiples clases de antimicrobianos, lo que limita las opciones terapéuticas disponibles y promueve el uso excesivo de antibióticos de amplio espectro, contribuyendo a un círculo vicioso de resistencia y fracaso terapéutico (4).

En respuesta, la comunidad científica ha volcado su atención hacia nuevas fuentes de compuestos antimicrobianos, en particular los derivados de plantas medicinales. Estos organismos poseen una diversidad química notable que ha sido aprovechada tradicionalmente en diversas culturas para tratar infecciones y otras enfermedades (5). En la actualidad, los metabolitos secundarios vegetales como alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos y terpenoides, los cuales han demostrado poseer propiedades antibacterianas y antifúngicas, al alterar la permeabilidad de membranas, inhibir la síntesis de proteínas o interferir en la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) microbiano (6).

El interés en las plantas como fuente de nuevos fármacos ha sido reforzado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), que promueve activamente el desarrollo de medicamentos derivados de recursos naturales, en especial en contextos donde el acceso a tratamientos convencionales es limitado (8). En este contexto, el *Plantago major*, conocido comúnmente como llantén, representa una de las especies vegetales con mayor tradición en la medicina natural de muchas culturas. Diversos estudios científicos han documentado sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, cicatrizantes y, especialmente, antimicrobianas (8, 9).

Esta planta contiene una amplia variedad de compuestos bioactivos, como la aucubina, ácido salicílico, ácido ascórbico, mucílagos y flavonoides, los cuales han sido relacionados con la inhibición del crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como de

hongos oportunistas (10). No obstante, la mayoría de las investigaciones han focalizado su atención en las hojas, dejando a las raíces como una parte aún poco explorada desde el punto de vista fitoquímico y farmacológico, a pesar de que estas también contienen metabolitos de interés terapéutico (11).

En el Perú, el llantén crece de forma silvestre en diversas regiones, donde es comúnmente utilizado en la medicina tradicional para tratar afecciones respiratorias, digestivas y dérmicas. La escasa evidencia científica sobre la efectividad antimicrobiana de sus extractos, especialmente en cepas de referencia estandarizadas, justifica la necesidad de llevar a cabo investigaciones rigurosas que respalden su potencial como agente terapéutico natural.

Por ello, el presente trabajo de investigación busco evaluar y comparar el efecto antimicrobiano de las hojas y raíces del *Plantago major* frente a cepas patógenas mediante los análisis estadísticos ANOVA (Análisis de Varianza) y la prueba de Tukey HSD (Honestly Significant Difference). Además, se busca generar evidencia científica sobre el potencial antimicrobiano del *Plantago major*, así como establecer una base sólida para futuros estudios en el desarrollo de fitofármacos o productos alternativos para combatir infecciones resistentes a tratamientos convencionales.

1.1. Marco teórico

1.1.1. Resistencia antimicrobiana

Es la capacidad de los microorganismos para resistir los efectos de los antimicrobianos que antes eran eficaces. Surge cuando estos sufren cambios que les permiten sobrevivir y multiplicarse, dificultando el tratamiento de infecciones y aumentando el riesgo de propagación, complicaciones y mortalidad. (12).

✓ Antimicrobiano

Son compuestos naturales, semisintéticos o sintéticos que eliminan o inhiben el crecimiento de microorganismos como bacterias, virus, hongos y parásitos. Se emplean para tratar infecciones en humanos, animales y en ámbitos como la agricultura y la industria alimentaria (1).

✚ Cloranfenicol

Es un antibiótico de amplio espectro. Se utiliza en infecciones graves causadas por bacterias Gram positivas y Gram negativas (13,2).

Clotrimazol

Es un antimicótico imidazólico de amplio espectro que inhibe la síntesis de ergosterol en la membrana de los hongos, provocando su muerte. Es eficaz contra *Candida albicans* y otros hongos patógenos (14,15).

✓ **Microorganismos**

Son seres vivos microscópicos, en su mayoría unicelulares, que comprenden a las bacterias, virus, hongos, protozoos y algunas algas. Son esenciales en diversos procesos biológicos y ecológicos, aunque algunos pueden ser patógenos y provocar enfermedades en humanos, animales y plantas (16).

✓ ***Pseudomonas aeruginosa***

Es una bacteria gramnegativa oportunista que puede prosperar en ambientes hospitalarios y causar infecciones respiratorias, urinarias y sistémicas, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos (17).

✓ ***Staphylococcus aureus***

Es una bacteria grampositivo, implicado en infecciones de piel, tejidos blandos y del sistema circulatorio (18).

✓ ***Klebsiella pneumoniae***

Es una bacteria gramnegativa encapsulada que forma parte de la microbiota intestinal humana, pero que también puede causar neumonías, infecciones urinarias y septicemias (19).

✓ ***Escherichia coli***

Es una bacteria gramnegativo que reside normalmente en el intestino, aunque algunas cepas pueden provocar infecciones gastrointestinales y urinarias (20).

✓ ***Candida albicans***

Es un hongo levaduriforme que vive como comensal en el cuerpo humano, pero en ciertas condiciones puede causar candidiasis mucocutánea o sistémica (21).

1.1.2. Enfermedades infecciosas

Son trastornos causados por microorganismos. Estas infecciones pueden transmitirse de manera directa o indirecta de una persona a otra, o a través de vectores o el medio ambiente. La gravedad varía desde afecciones leves hasta

enfermedades mortales, dependiendo del agente patógeno y de la respuesta del huésped (22).

1.1.3. Fitofármaco

Los fitofármacos son medicamentos elaborados a partir de principios activos extraídos de plantas medicinales. A diferencia de los remedios tradicionales, se obtienen mediante procesos estandarizados que garantizan su eficacia, seguridad y dosis precisa. Se emplean en la prevención y tratamiento de enfermedades, gracias a compuestos naturales como alcaloides, flavonoides y terpenoides. (23).

1.1.4. Productos alternativos

Según la OMS, son preparados no pertenecientes a la medicina convencional, pero utilizados con fines terapéuticos. Incluyen extractos vegetales, aceites esenciales, suplementos herbales, homeopatía, fitoterápicos y otros remedios tradicionales empleados en la medicina tradicional, complementaria o integrativa (24).

1.1.5. Métodos para determinar la actividad antimicrobiana

Los métodos para determinar la actividad antimicrobiana comprenden principalmente técnicas de difusión y dilución, empleadas para evaluar la capacidad inhibitoria de extractos o compuestos frente a microorganismos patógenos in vitro (25).

✓ Difusión en agar (técnica de pozo en agar)

Es una técnica cualitativa para evaluar la actividad antimicrobiana de extractos líquidos. Consiste en inocular un agar con la suspensión microbiana estandarizada, realizar pozos de 6 a 8 mm y depositar un volumen definido del extracto (10–25 µL). Tras la incubación a 37 °C por 24–48 h, se mide el halo de inhibición, cuyo tamaño refleja la eficacia del compuesto frente al microorganismo ensayado (26).

✚ Porcentaje de Inhibición Relativa (PIR)

Es un parámetro que permite establecer una comparación de la eficacia inhibitoria de extractos o compuestos en relación con un control positivo. Su cálculo se realiza a partir de los diámetros de los halos de inhibición, indicando el porcentaje de actividad que presenta la muestra frente a un antimicrobiano de referencia (25).

✓ **Dilución en caldo o agar**

Es una técnica cuantitativa para evaluar la actividad antimicrobiana, que consiste en preparar concentraciones seriadas decrecientes del agente en estudio (caldo o agar), inocularlas con una suspensión microbiana estandarizada e incubar (27).

✚ **Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

Se define como la menor concentración capaz de inhibir el crecimiento visible del microorganismo (27).

1.1.6. *Plantago major*

Conocida como llantén, es una planta perenne de la familia Plantaginaceae, ampliamente distribuida en regiones templadas y valorada por sus reconocidas propiedades medicinales tradicionales (8).

✓ **Parte utilizada:**

✚ **Hojas** → Empleadas frescas o secas, ricas en flavonoides, mucílagos, iridoides y taninos; se usan para afecciones respiratorias, digestivas, inflamatorias y como cicatrizante.

✚ **Raíces** → Menos utilizadas que las hojas, pero también reportadas en estudios por su actividad antimicrobiana y antiinflamatoria.

✚ **Semillas** → Destacadas por su contenido de mucílagos y efecto laxante (8, 28).

✓ **Composición química**

Contiene mucílagos, iridoides (aucubina, catalpol), flavonoides (apigenina, luteolina), ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido ferúlico), taninos y minerales (29).

✓ **Propiedades medicinales**

El *Plantago major* posee propiedades medicinales ampliamente reconocidas, entre las que destacan su efecto antiinflamatorio, antimicrobiano, cicatrizante, expectorante, antioxidante y analgésico. Estas acciones se deben a la presencia de metabolitos secundarios como flavonoides, iridoides, taninos, aucubina y ácidos fenólicos (8,11)

✓ **Acciones farmacológicas**

Actividad antimicrobiana, emoliente, antitusiva, cicatrizante y moduladora del sistema inmune (29).

Se investigó la actividad antimicrobiana de extractos obtenidos a partir de hojas secas de *Plantago major* (50 mg/mL), mediante los métodos de ultrasonido y maceración. Los resultados mostraron una mayor eficacia frente

a bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, una acción reducida contra Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* y un efecto limitado frente a hongos como *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus niger*. Dicho efecto se relacionó con la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides (30). Asimismo, el extracto de hojas de *Plantago major* evidenció una notable capacidad para atenuar la inflamación y el daño de la mucosa en ratas con colitis ulcerosa inducida por ácido acético, siendo este efecto más marcado a dosis altas. Por el contrario, el extracto derivado de las semillas de *P. major* mostró una acción protectora más limitada frente a esta condición (31).

✓ **Modo de empleo**

Uso tradicional en forma de infusiones, extractos, cataplasmas, tinturas y jarabes (29).

✓ **Contraindicaciones**

No recomendado en embarazo, lactancia, personas alérgicas a la familia Plantaginaceae o en casos de trastornos gastrointestinales severos (29).

✓ **Toxicidad**

En dosis altas puede causar reacciones alérgicas cutáneas o gastrointestinales leves; no se reporta toxicidad grave en humanos a dosis terapéuticas (29).

✚ **Dosis terapéuticas comunes**

- **Oral (infusión o planta en polvo):** Se recomienda consumir de 3 a 5 g de la hierba seca, 1-3 veces al día. También es frecuente preparar una infusión con 150 mL (una taza), 3-4 veces al día (32, 33).
- **Aplicación externa (compresas):** Infundir 2 cucharaditas de planta en 150 mL de agua fría, luego hervir, filtrar y aplicar como compresa sobre heridas o zonas afectadas, hasta 3-4 veces al día (33).
- **Estudios farmacológicos (dosis en animales para efectos antiinflamatorios y hepatoprotectores):** Dosis efectivas observadas en ratas fueron de 10, 20 y 25 mg/kg por vía sistémica, donde la dosis de 20–25 mg/kg mostró efectos comparables al control estándar. La dosis media efectiva (ED_{50}) fue de 7,507 mg/kg (32, 34).

✓ **Identificación fitoquímica**

Es un análisis cualitativo que permite reconocer la presencia de metabolitos secundarios en extractos vegetales mediante reacciones químicas específicas, tales como cambios de color, precipitación o formación de espuma, con el fin de detectar compuestos bioactivos responsables de posibles efectos terapéuticos. (35).

- ✚ **Flavonoides:** Compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas.
 - **Prueba de *Shinoda*:** coloración rojiza o anaranjada al reaccionar con Mg + HCl (36).
- ✚ **Compuestos fenólicos:** Moléculas con uno o más anillos fenólicos; tienen capacidad antioxidante y protectora.
 - **Reacción con cloruro férrico (FeCl₃):** color azul, verde o negro (36).
- ✚ **Taninos:** Polifenoles de alto peso molecular con efecto astringente y antimicrobiano.
 - **FeCl₃:** color azul-negro o verde.
 - **Prueba de gelatina:** formación de precipitado (37).
- ✚ **Saponinas:** Glucósidos tensoactivos con efectos inmunomoduladores y expectorantes.
 - **Prueba de espuma:** agitar en agua forma espuma persistente (>1 cm) (36).
- ✚ **Azúcares reductores:** Carbohidratos capaces de reducir reactivos (Fehling/Benedict).
 - **Prueba de *Fehling o Benedict*:** precipitado rojo ladrillo (37).
- ✚ **Aminoácidos:** Precursores de proteínas y posibles metabolitos secundarios.
 - **Prueba de *Ninhydrina*:** coloración violeta al reaccionar con aminoácidos libres (36).
- ✚ **Alcaloides:** Compuestos nitrogenados bioactivos con efectos farmacológicos notables.
 - **Pruebas de *Mayer*:** (precipitado blanco/amarillento).
 - **Pruebas de *Dragendorff*:** (precipitado naranja/rojizo).
 - **Pruebas de *Wagner*:** (precipitado marrón rojizo) (38).
- ✚ **Triterpenos / Esteroides:** Derivados del isopreno con propiedades antiinflamatorias y hormonales.
 - **Reacción de *Liebermann–Burchard*:** coloración azul-verdosa o violeta (37).
- ✚ **Quinonas:** Compuestos aromáticos oxigenados con acción antimicrobiana.
 - **Prueba de *Bornträger*:** tras extracción alcalina, coloración roja o rosado (36).

1.2. Problema general:

¿Cuál de las concentraciones de los extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major* presentará la mayor actividad antimicrobiana in vitro frente a las cepas

patógenas evaluadas en comparación con el antimicrobiano de referencia y el control negativo?

1.3. Problemas específicos:

✓ **Problema específico 1**

¿Cuáles serán los metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos de las hojas y raíces del *Plantago major* (llantén) que crecen en zonas rurales de Ica, 2025?

✓ **Problema específico 2**

¿Cuál de las concentraciones de los extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major* presentará el mayor Porcentaje inhibitorio relativo (PIR) in vitro frente a las cepas patógenas evaluadas en comparación con el antimicrobiano de referencia y el control negativo?

✓ **Problema específico 3**

¿Qué diferencias existen en las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de los extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major* recolectados en zonas rurales de Ica en 2025, frente a las cepas patógenas evaluadas?

✓ **Problema específico 4**

¿Cuál de las concentraciones de los extractos etanólicos de hojas o raíces del *Plantago major* (llantén) mostrará mayor efecto antimicrobiano frente a las cepas patógenas evaluadas?

1.4. Planteamiento del problema

La creciente aparición de infecciones provocadas por microorganismos resistentes a múltiples antimicrobianos constituye una seria amenaza para la salud pública mundial. Esta resistencia reduce drásticamente la efectividad de los tratamientos actuales, lo que incrementa los índices de complicaciones clínicas y los costos sanitarios, especialmente en países con recursos limitados (1).

Entre los agentes más preocupantes se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*, patógenos que han desarrollado mecanismos de resistencia frente a varios grupos de antibióticos, complicando su control y tratamiento (2,3,4).

En este contexto, la búsqueda de compuestos antimicrobianos alternativos se ha orientado hacia el uso de plantas medicinales, debido a su riqueza en metabolitos con potencial terapéutico, como flavonoides, taninos, alcaloides y saponinas, que actúan a través de distintos mecanismos sobre las células microbianas (5,6).

El *Plantago major* (llantén) es una planta empleada tradicionalmente con fines curativos, y estudios recientes han demostrado que sus hojas poseen propiedades antimicrobianas atribuibles a diversos compuestos bioactivos como la aucubina y el ácido salicílico (8,9,10). No obstante, existe escasa información sobre la actividad antimicrobiana de sus raíces, a pesar de que también contienen metabolitos secundarios con posibles beneficios farmacológicos (11).

En el Perú, el llantén es una planta comúnmente utilizada en la medicina popular. Sin embargo, su eficacia frente a cepas microbianas de referencia no ha sido suficientemente validada científicamente. Esta falta de evidencia justifica la necesidad de investigar y comparar la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de hojas y raíces del *Plantago major*, con el objetivo de aportar datos relevantes para el desarrollo de tratamientos naturales frente a la creciente resistencia a los antimicrobianos convencionales.

1.4.1. Antecedentes de la investigación

➤ Antecedentes internacionales

Rahamouz-Haghihi y Sharafi (39), en el año 2025, en Irán realizaron un estudio cuyo propósito fue evaluar los extractos de raíz de *Plantago major* obtenidos con distintos disolventes y analizados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), con el fin de determinar su composición química y su actividad biológica. El extracto de diclorometano mostró la mayor actividad antibacteriana frente a *Salmonella paratyphi*, con un halo de inhibición de $18,0 \pm 1,4$ mm, una concentración mínima inhibitoria de 1,5 mg/mL y una concentración mínima bactericida de 2 mg/mL. En los ensayos de citotoxicidad, el extracto de diclorometano presentó el menor valor de CI_{50} frente a células HCT116 (184,84 μ g/mL), mientras que el extracto de butanol mostró menor toxicidad sobre células HEK293 ($CI_{50} = 748,19$ μ g/mL). El análisis químico reveló la presencia de compuestos como ácido n-hexadecanoico, ácido linolénico, ácido palmítico, éster metílico y ácido esteárico. Estos resultados sugieren que los extractos de *P. major*, especialmente el de diclorometano, constituyen una fuente prometedora de metabolitos con potenciales aplicaciones antibacterianas y anticancerígenas.

Ramírez (40), publicó en el año 2022, en Argentina, un estudio con el objetivo de determinar el perfil fitoquímico del extracto de *Plantago tomentosa* Lam y su actividad antimicrobiana frente a *Peptoestreptococcus spp* y *Actinomyces*

spp. Se llevó a cabo un estudio observacional con diseño experimental, transversal y de enfoque cuantitativo. Se identificó que la parte aérea y la raíz contenían taninos, azúcares, aminoácidos, esteroides, alcaloides, fenoles y saponinas. La actividad antimicrobiana se evaluó mediante el método de difusión en agar de Kirby-Bauer y pruebas de sensibilidad semicuantitativa, utilizando como control negativo la solución fisiológica estéril y como controles positivos Plac Out® y propilenglicol. Se analizaron dos concentraciones del extracto (25 % y 100 %). Los resultados mostraron que la concentración al 100 % generó halos de inhibición frente a cepas de *Peptoestreptococcus spp.*, mientras que frente a *Actinomyces spp.* no se evidenció actividad inhibitoria en ninguna de las concentraciones evaluadas, ni en el control negativo ni en el propilenglicol. En contraste, Plac Out® produjo halos inhibitorios en todos los ensayos. En conclusión, *P. tomentosa* Lam. presentó actividad antimicrobiana contra *Peptoestreptococcus spp.*, pero no contra *Actinomyces spp.*

Akkuş et al. (41), en el año 2021; en Turquía, realizó un estudio cuyo objetivo fue determinar la actividad antimicrobiana y la concentración mínima efectiva (MIC) de extractos de hojas de *Plantago major* utilizando diferentes solventes: hexano, metanol, etanol y agua. El estudio fue de tipo experimental in vitro, en el cual se empleó extracción con Soxhlet para obtener extractos en diversos solventes. Se evaluó la actividad antibacteriana y antifúngica frente a microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* y *C. tropicalis*, utilizando el método de dilución en caldo para determinar MIC en función del solvente, microbio y tiempo. Donde los resultados mostraron los extractos de hexano y agua tienen actividad frente a *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* y *C. tropicalis* con una MIC de 4 mg/mL, mientras que contra *Escherichia coli* y *Pseudomonas vulgaris*, presentó un MIC de 8 mg/mL. Los extractos de metanol y etanol demostraron mayor actividad: el extracto etanólico inhibió *S. aureus*, *E. faecalis* y *P. aeruginosa* a 2 mg/mL, y demostró actividad frente a *B. subtilis*, *E. coli* y *P. vulgaris* a 4 mg/mL. Concluyendo que todos los extractos de *Plantago major* muestran actividad antimicrobiana significativa, especialmente los obtenidos con etanol y metanol, siendo más eficaces frente a bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*.

Pensantes et al. (42), en el año 2020, en Brasil, realizó un estudio cuyo objetivo fue determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de

Plantago major sobre *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*. Mediante pruebas de susceptibilidad bacteriana, la técnica de difusión en agar y la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por macrodilución en caldo. Se empleó como control positivo una solución de clorhexidina al 0,12 % más cloruro de cetilpiridinio al 0,05 %, y como control negativo etanol al 70°. Se analizaron cuatro concentraciones del extracto (25 %, 50 %, 75 % y 100 %) disueltas en etanol al 70 %. Los resultados indicaron que las concentraciones del 75 % y 100 % generaron halos de inhibición frente a ambas cepas evaluadas, con un promedio de 14,9 mm. En contraste, el etanol al 70° no evidenció actividad antimicrobiana. La CMI se determinó en 50 % para ambas especies. En conclusión, el extracto etanólico de *Plantago major* demostró un efecto antibacteriano in vitro frente a *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*, mostrando sensibilidad a las concentraciones del 75 % y 100 % y una CMI del 50 %.

➤ **Antecedentes nacionales**

Gálvez et al. (43), en el año 2021, en Huancayo – Perú, realizó un estudio con el objetivo de determinar el efecto antimicótico de *Plantago major* comparado con nistatina frente a *Candida albicans*. Realizando un estudio transversal, prospectiva con diseño experimental. Mediante el método de difusión en pozo, usando como control negativo al etanol y como control positivo la nistatina, se empleó las concentraciones del 50% y 100%. Los resultados mostraron halos de inhibición de $12,62 \pm 0,54$ mm para el extracto de llantén al 50%, y de $14,59 \pm 0,31$ mm para el extracto de llantén al 100%. En cuanto a los controles, el negativo presentó un halo de inhibición de $6,12 \pm 0,21$ mm, mientras que el positivo mostró un halo promedio de $24,20 \pm 0,37$ mm. Estos datos permitieron concluir que el *Plantago major* tiene un efecto antimicótico inferior al de la nistatina frente a *Candida albicans*.

Tello (44), en el año 2020, en Tacna - Perú, realizó un estudio con el objetivo de evaluar el efecto antibacteriano del extracto etanólico y acuoso del *Plantago major* (llantén) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Realizando un estudio experimental in vitro. Mediante el método de difusión con discos; empleándose la clorhexidina al 0,12 % como control positivo y agua destilada como control negativo, evaluándose 4 concentraciones (100%, 75 %, 50 % y 25 %). Los resultados evidenciaron que el extracto etanólico contenía terpenos, diterpenos, saponinas terpenoidales y aceite esencial, mientras que en el extracto acuoso únicamente se identificaron terpenos. En relación con la actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* ATCC

25175, el extracto acuoso no mostró un efecto significativo. En el caso del extracto etanólico, se observaron halos de inhibición de 11,91 mm a la concentración del 100 % y de 8,05 mm al 75 %. Asimismo, al evaluar volúmenes de 25 µL, los halos obtenidos fueron de 12,29 mm (100 %), 10,68 mm (75 %), 10,41 mm (50 %) y 9,37 mm (25 %). En conjunto, estos resultados permitieron concluir que tanto el extracto acuoso como el etanólico de *Plantago major* no evidencian una actividad antibacteriana significativa frente a *S. mutans* ATCC 25175.

Aguilar (45), en el año 2020, en Trujillo- Perú, realizó un estudio cuyo objetivo fue comprobar el efecto antibacteriano de extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* (ajo) y *Plantago major* (llantén) frente a cultivo de *Escherichia coli*. Realizando un estudio de tipo experimental, de enfoque cuantitativo. Mediante el método de difusión de discos de Kirby Bauer, como control negativo el suero fisiológico 0,9% y control positivo al norfloxacino 10 µg, usando 20 µl del extracto de *Allium sativum* a concentraciones de 50% y 75%, obteniendo la muestra 1 y 2, también se usó 20 µl del extracto de *Plantago major* a concentraciones de 50% y 75% obteniendo la muestra 3 y 4. Los resultados obtenidos mostraron valores de inhibición de $06,00 \pm 0,00$; $31,2 \pm 0,6$; $16,5 \pm 0,7$; $21,6 \pm 0,6$; $13,7 \pm 0,4$; y $17,7 \pm 0,4$ mm, respectivamente. Según el análisis estadístico ANOVA, se encontraron diferencias significativas entre estos valores ($p < 0,05$). Esto permitió concluir que los extractos hidroalcohólicos de *Allium sativum* y *Plantago major* ejercen un efecto inhibitor sobre cultivos de *Escherichia coli*, aunque su eficacia no supera a la de la Norfloxacina.

1.5. Justificación e importancia de la investigación

Desde el punto de vista teórico, el uso de plantas medicinales como alternativa frente a infecciones microbianas ha despertado un creciente interés dentro de la comunidad científica, debido a la aparición de cepas resistentes a antibióticos convencionales. *Plantago major*, conocida comúnmente como llantén, es una especie ampliamente utilizada en la medicina tradicional por sus propiedades cicatrizantes, antiinflamatorias y antimicrobianas. Estudios recientes han reportado que esta planta contiene compuestos bioactivos como flavonoides, taninos y ácidos fenólicos, que podrían estar involucrados en su acción antimicrobiana (42). No obstante, aún existen pocos estudios que comparen la eficacia antimicrobiana de sus hojas en relación con sus raíces. Este vacío teórico justifica la necesidad de explorar el comportamiento diferencial de ambas partes frente a microorganismos patógenos de relevancia clínica.

Desde un enfoque metodológico, la investigación se desarrolla mediante un diseño experimental *in vitro*, utilizando los métodos de difusión en agar y dilución para así poder determinar la actividad antimicrobiana de los extractos y el MIC. Estas técnicas han demostrado ser eficaces para medir la susceptibilidad microbiana, al permitir cuantificar con precisión los halos de inhibición. El uso de cepas estandarizadas (ATCC) de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Candida albicans* garantiza la confiabilidad de los resultados, permitiendo su comparación con investigaciones similares realizadas a nivel internacional.

En el plano práctico, la presente investigación podría aportar información útil para el desarrollo de productos naturales con potencial uso terapéutico, como pomadas, geles o soluciones antimicrobianas de base fitoterapéutica. En un contexto donde los antimicrobianos sintéticos enfrentan una disminución de su efectividad debido a la resistencia bacteriana, identificar alternativas de origen vegetal puede representar una vía complementaria en la prevención o tratamiento de infecciones leves, particularmente en zonas con acceso limitado a medicamentos de alto costo (46).

Desde el punto de vista regional y social, este estudio adquiere relevancia adicional al desarrollarse con muestras de llantén recolectadas en zonas rurales de Ica, una región donde el uso de plantas medicinales forma parte del conocimiento ancestral transmitido por generaciones. Validar científicamente las propiedades antimicrobianas del *Plantago major* cultivado en esta zona no solo respalda el saber tradicional, sino que también promueve el aprovechamiento racional de los recursos vegetales locales con fines terapéuticos. Además, esta investigación puede estimular futuras estrategias de investigación y conservación de la flora medicinal autóctona.

1.6. Objetivos

➤ **Objetivo general**

Identificar la concentración de los extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major* que presentara la mayor actividad antimicrobiana *in vitro* frente a las cepas patógenas evaluadas, en comparación con un antimicrobiano de referencia y un control negativo.

➤ **Objetivos específicos**

• **Objetivo específico 1**

Identificar los metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos de las hojas y raíces del *Plantago major* (llantén) que crecen en zonas rurales de Ica, 2025.

- **Objetivo específico 2**

Identificar la concentración del extracto etanólico de hojas y raíces de *Plantago major* que presentará el mayor Porcentaje de Inhibición Relativa (PIR) in vitro frente a las cepas patógenas evaluadas en comparación con el antimicrobiano de referencia y el control negativo.

- **Objetivo específico 3**

Hallar las diferencias existentes de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de los extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major* recolectados en zonas rurales de Ica en 2025, frente a cepas patógenas evaluadas.

- **Objetivo específico 4**

Identificar la concentración de los extractos etanólicos de hojas o raíces del *Plantago major* (llantén) que mostrará mayor efecto antimicrobiano frente a las cepas patógenas evaluadas.

1.7. Hipótesis

- **Hipótesis general**

Los extractos etanólicos de las hojas y raíces del *Plantago major* (llantén) presentan efecto antimicrobiano in vitro frente a cepas patógenas evaluadas.

- **Hipótesis específicas**

- **Hipótesis específica 1**

Al menos una de las concentraciones con extracto etanólico de hojas y raíces de *Plantago major* presentará mayor Porcentaje Inhibitorio Relativo (PIR) in vitro frente a cepas patógenas evaluadas en comparación con el antimicrobiano de referencia y el control negativo.

- **Hipótesis específica 2**

Al menos una de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de los extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major* recolectados en zonas rurales de Ica en 2025, se diferencia de las demás frente a las cepas patógenas evaluadas.

- **Hipótesis específica 3**

Al menos una de las concentraciones de los extractos etanólicos de hojas o raíces del *Plantago major* (llantén) mostrará mayor efecto antimicrobiano frente a las cepas patógenas evaluadas.

1.8. Descripción del Contenido Capitular

- ✓ **Capítulo I:** Este capítulo desarrolla los elementos introductorios fundamentales del estudio. En él se presentan el planteamiento del problema, la revisión de antecedentes, la justificación e importancia del tema, los objetivos generales y específicos, así como el marco teórico que sustenta conceptualmente la investigación.
- ✓ **Capítulo II:** En esta sección se describe detalladamente el enfoque metodológico aplicado. Se expone la población y muestra del estudio, las variables involucradas, las técnicas e instrumentos utilizados para la recolección de datos, el procedimiento seguido y los métodos empleados para el análisis estadístico de los resultados.
- ✓ **Capítulo III:** Comprende la presentación de los resultados obtenidos en la investigación. Los datos son organizados en tablas y gráficos, permitiendo responder de manera directa a cada uno de los objetivos específicos planteados.
- ✓ **Capítulo IV:** Aquí se lleva a cabo el análisis crítico de los resultados. Se comparan los hallazgos del estudio con los reportados por otros investigadores, destacando similitudes, diferencias e interpretaciones relevantes en el contexto del problema investigado.
- ✓ **Capítulo V:** Contiene las conclusiones de la investigación, formuladas a partir de los resultados alcanzados y en coherencia con los objetivos propuestos desde el inicio del trabajo.
- ✓ **Capítulo VI:** Se plantean recomendaciones orientadas a mejorar aspectos relacionados con el estudio, como en la orientación hacia futuras investigaciones que profundicen los hallazgos obtenidos o aborden nuevas interrogantes.
- ✓ **Capítulo VII:** Reúne todas las referencias bibliográficas consultadas a lo largo de la investigación, elaboradas según el estilo Vancouver, garantizando la rigurosidad académica y la trazabilidad de las fuentes utilizadas.
- ✓ **Capítulo VIII:** Finalmente, este capítulo incluye los anexos que complementan la investigación. Se presentan documentos, evidencias, fichas técnicas u otros materiales relevantes que respaldan el proceso metodológico y los resultados obtenidos.

II. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

2.1. Enfoque, tipo, nivel y diseño de la investigación

2.1.1. Enfoque de investigación

Cuantitativo, debido a que se utilizaron métodos y técnicas para la medición de las unidades de análisis (47), midiéndose los halos de inhibición de cada una de las concentraciones.

2.1.2. Tipo de investigación

Aplicada, porque se buscó aportar una solución a la problemática de la resistencia microbiana mediante el uso del extracto etanólico de hojas y raíces de *Plantago major* frente a cepas patógenas, integrando conocimientos de diversas ciencias (48).

2.1.3. Nivel de la investigación

Descriptiva, porque permitió detallar las características y propiedades del objeto de estudio dentro de un contexto geográfico y temporal específico, limitando el análisis únicamente a la población evaluada (48, 49).

2.1.3. Diseño de investigación

Experimental, porque se manipularon activamente las concentraciones de los extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major* (llantén) para observar su efecto sobre el crecimiento de distintas cepas microbianas (50).

2.2. Población y muestra

➤ Población

La población de estudio estuvo constituida por todos los individuos adultos de *Plantago major* (llantén) que crecieron de forma silvestre en zonas rurales de la provincia de Chincha, específicamente en caminos rurales y en riberas de canales de regadío, durante el año 2025, los cuales se recolectaron a finales de otoño e inicios de invierno.

➤ Muestra

La muestra final estuvo conformada por aproximadamente 385 individuos adultos de *Plantago major*, determinada mediante la fórmula de Cochran para poblaciones infinitas, con un nivel de confianza del 95 % y un margen de error del 5 %. En ausencia de datos precisos sobre la proporción de cada hábitat, la muestra se distribuyó proporcionalmente: 134 plantas en caminos rurales y 133 en riberas de canales.

✓ Criterios de inclusión:

- Hojas y raíces frescas.

- Hojas y raíces sanas.
- Hojas y raíces sin contaminantes u hongos.
- ✓ **Criterios de exclusión:**
 - Hojas y raíces dañadas.
 - Hojas y raíces contaminadas.
 - Hojas y raíces secas.
- **Unidad de análisis**
 - Cepas de *Candida albicans* ATCC 10231.
 - Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.
 - Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.
 - Cepas de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.
 - Cepas de *Escherichia coli* ATCC 13216.
 - ✓ **Criterio de inclusión**
 - Crecimiento uniforme del microorganismo en la placa de cultivo.
 - ✓ **Criterio de exclusión**
 - Presencia de contaminación cruzada (colonias distintas a las del microorganismo evaluado).
 - Crecimiento irregular o incompleto del microorganismo.

2.3. Variables de la investigación

- **Variable independiente**
 - Extractos etanólicos de las hojas y raíces del *Plantago major*.
 - ✓ **Dimensiones**
 - Identificación botánica de la especie vegetal.
 - Identificación fitoquímica de los extractos.
 - Características organolépticas de los extractos etanólicos de las hojas y raíces del *Plantago major*.
 - Concentraciones del extracto etanólico de hojas de *Plantago major*.
 - Concentraciones del extracto etanólico de raíces de *Plantago major*.
- **Variable dependiente**
 - Actividad antimicrobiana.
 - ✓ **Dimensiones**
 - Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana por el método de difusión en agar por pozos.
 - Determinación del Porcentaje de Inhibición Relativa (PIR).

- Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) determinada mediante el método de dilución en caldo.

➤ **Operacionalización de las variables**

| Variables de estudio | Definición conceptual | Dimensiones | Indicadores | Escala de medición | |
|---|--|---|--|---|-------------------------------|
| Variable independiente Los extractos etanólicos de las hojas y raíces del <i>Plantago major</i> . | Sustancia obtenida de la materia prima (<i>Plantago major</i>) que contiene una pequeña porción. concentrada de sus metabolitos. | Identificación botánica | Género y especie | Variable cualitativa nominal | |
| | | Identificación fitoquímica | Reacciones de coloración y/o precipitación | | |
| | | Características organolépticas | Color, olor y sabor | | |
| | | Concentraciones del extracto etanólico de las hojas del <i>Plantago major</i> . | Concentraciones del extracto etanólico de las raíces del <i>Plantago major</i> | Extracto etanólico de las hojas del <i>Plantago major</i> al 20%. | Variable cuantitativa nominal |
| | | | | Extracto etanólico de las hojas del <i>Plantago major</i> al 40 %. | |
| | | | | Extracto etanólico de las hojas del <i>Plantago major</i> al 80%. | |
| | | | | Extracto etanólico de las raíces del <i>Plantago major</i> al 20 %. | |
| | | | | Extracto etanólico de las raíces del <i>Plantago major</i> al 40%. | |
| | | | | Extracto etanólico de las raíces del <i>Plantago major</i> al 80%. | |
| Variable dependiente Actividad antimicrobiana frente a cepas patógenas. | Facultad que presenta una sustancia para impedir el crecimiento microbiano. | Método de Difusión en agar. | Sensibilidad (mm). | Variable cuantitativa de razón. | |
| | | Determinación del PIR. | Por porcentaje (%). | | |
| | | CMI. | mg /mL | | |

2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de la información

2.4.1. Procedimientos experimentales

➤ Materiales

✓ Materiales de laboratorio

- Probeta de 100 mL.
- Vasos de precipitación.
- Embudos de vidrio.
- Baguetas.
- Tubos de ensayos.
- Gradillas.
- Lunas de reloj.
- Placas Petri.
- Pipetas de 1 mL y 2 mL.
- Micropipetas de 100 μ L y 1000 μ L.
- Viales.
- Placa escavada de porcelana.
- Propipetas.
- Pipeta Pasteur.
- Torundas.
- Asa de siembra.
- Ron de quemar.
- Mechero de Bunsen.

✓ Material biológico

- Extracto de las hojas y raíces de *Plantago major*
- Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.
- Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.
- Cepas de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.
- Cepas de *Escherichia coli* ATCC 13216.
- Cepas de *Candida albicans* ATCC 10231.

✓ Medios de cultivo

- Caldo nutritivo (CN).
- Agar Muller Hinton (HM).
- Agar Dextrosa Sabouraud (SDA).
- Caldo Dextrosa Saboraud (SDB).
- Agar MacCon Key (MAC o MCK).
- Agar Salmonella-Shigella (SS).

- Agar Manitol Salado (MSA).
 - Agar Cetrimide (ACT).
 - Caldo Infusión Cerebro-Corazón (caldo BIH).
 - Agar Infusión Cerebro-Corazón (Agar BIH).
- ✓ **Solventes y reactivos**
- Alcohol 96°.
 - Cloranfenicol.
 - Agua destilada.
 - Ácido clorhídrico (HCl).
 - Limaduras de magnesio.
 - Gelatina al 1 %.
 - Cloruro férrico al 0,5 %.
 - Reactivo de Fehling A y B.
 - Ninhidrina.
 - Reactivo Dragendorff.
 - Reactivo de Mayer.
 - Reactivo de Wagner.
 - Reactivo de Hager.
 - Diclorometano.
 - Anhídrido acético.
 - Ácido sulfúrico.
 - Hipoclorito de sodio.
- ✓ **Equipos de laboratorio**
- Balanza analítica.
 - Refrigeradora.
 - Campana bacteriológica de flujo laminar.
 - Autoclave.
 - Incubadora.
 - Estufa.
 - Equipo rotavapor.
 - Molino.
- ✓ **Otros**
- Papel de filtro.
 - Papel de aluminio.
 - Hisopos estériles.
 - Papel kraft.
 - Cinta masking tape.

- Frascos de vidrio.
- Algodón.
- Plumón indeleble.
- Mascarilla.
- Toca.
- Guantes.

2.4.1.1. Técnica: Obtención del extracto etanólico de las hojas y raíces del *Plantago major*

❖ Identificación taxonómica

La identificación taxonómica de la planta medicinal se realizó en el departamento de Ica, a cargo del biólogo certificado Dr. David Máximo Miranda Huamán (CPB 3681) (ver Anexo 1). La muestra vegetal, estuvo compuesta por hojas, tallo y raíz en buen estado, fue entregada para su evaluación.

❖ Recolección de las muestras

A finales de otoño e inicios de invierno, por la mañana, se recolectaron las hojas y raíces adultas de *Plantago major*, siguiendo los criterios de inclusión y exclusión previamente establecidos. Se pesaron aproximadamente 1900 g de hojas y 2250 g de raíces, las cuales fueron colocadas sobre papel kraft y envueltas para su traslado.

❖ Limpieza de las muestras

La limpieza de las hojas de *Plantago major* se realizó con un trapo y agua potable para eliminar el polvo, seguida de un enjuague con agua destilada para remover los minerales presentes. Las raíces se limpiaron con un cepillo y agua potable, y luego se enjuagaron con agua destilada para asegurar su pureza.

❖ Secado de las muestras

Una vez limpias, las muestras de hojas y raíces de *Plantago major* fueron presecadas sobre papel Kraft, colocándolas sin superposición en un lugar seco, sin exposición solar y cubierto con una tela fina para evitar el polvo. Las hojas se secaron a temperatura ambiente durante 4 días y luego en estufa a 45 °C por 3 horas, con intervalos de una hora (ver figura 5). Las raíces se secaron a temperatura ambiente durante 15 días y posteriormente en estufa a 45 °C por 5 horas, también con intervalos de una hora.

❖ **Molienda de la muestra**

Las hojas y raíces secas de *Plantago major* fueron trituradas en partes pequeñas mediante molienda manual con un molino.

❖ **Preparación de los extractos etanólicos**

Una vez molidas, las muestras de hojas y raíces de *Plantago major* fueron pesadas para su posterior maceración.

- Se maceraron 200 g de hojas con 1,1 L de alcohol etílico al 96 % en un frasco de vidrio de 3 L. Inicialmente se añadieron 850 mL de alcohol para la humectación durante 30 minutos, y luego se incorporaron los 250 mL restantes. El frasco se protegió con papel aluminio y se almacenó en un lugar sombreado entre 15 y 20 días, con agitación constante
- Igualmente, se maceraron 200 g de raíces con 1 L de alcohol etílico al 96 % en un frasco de 5 L, utilizando el mismo procedimiento. Adicionalmente, se realizó una segunda maceración con 95 g de raíces en 500 mL de alcohol, siguiendo los mismos pasos. Ambos frascos se conservaron en reposo durante 20 a 25 días, protegidos de la luz directa y con agitación frecuente (ver anexo11).

Todos los frascos fueron debidamente rotulados con la información correspondiente (fecha, parte vegetal, cantidad, solvente, entre otros).

2.4.1.2. Técnica: Secado de los extractos etanólicos de las hojas y raíces de *Plantago major*.

❖ **Secado de los extractos**

Finalizado el periodo de maceración (entre 15 y 25 días), se filtraron los extractos utilizando papel de filtro Whatman en recipientes limpios y desinfectados. Se reservaron 50 mL de cada extracto para la identificación fitoquímica.

Luego, los extractos fueron concentrados por evaporación a presión reducida en un rotavapor, con el fin de eliminar el alcohol etílico. Antes de transferirlos a vasos de precipitados, estos fueron pesados para calcular el rendimiento del extracto seco. Finalmente, los extractos se sometieron a baño María a baja temperatura para eliminar completamente el solvente residual (ver anexo11).

❖ **Rendimiento de los extractos**

El rendimiento se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Peso del extracto seco}}{\text{Peso de la muestra inicial}} \times 100$$

Donde:

- **Peso del extracto seco:** corresponde al peso del extracto luego de la evaporación total del solvente.
- **Peso de la muestra inicial:** cantidad de planta utilizada para la maceración.

✓ **Rendimiento del extracto de hojas**

- **Peso del vaso con extracto:** 81,0642 g
- **Peso del vaso vacío:** 67,4198 g
- **Peso del extracto seco:** 13,6444 g
- **Peso de la muestra inicial:** 200 g

$$\text{Rendimiento} = \frac{13,644 \text{ g}}{200 \text{ g}} \times 100 = 6,82\%$$

✓ **Rendimiento del extracto de raíces (2 maceraciones)**

Primera maceración

- **Peso del vaso con extracto:** 94,6235 g
- **Peso del vaso vacío:** 87,6860 g
- **Peso del extracto seco:** 6,9375 g
- **Peso de la muestra inicial:** 200 g

$$\text{Rendimiento} = \frac{6,9375 \text{ g}}{200 \text{ g}} \times 100 = 3,47 \%$$

Segunda maceración

- **Peso del vaso con extracto:** 149,2363 g
- **Peso del vaso vacío:** 145,9263 g
- **Peso del extracto seco:** 3,31 g
- **Peso de la muestra inicial:** 95 g

$$\text{Rendimiento} = \frac{3,31 \text{ g}}{95 \text{ g}} \times 100 = 3,48 \%$$

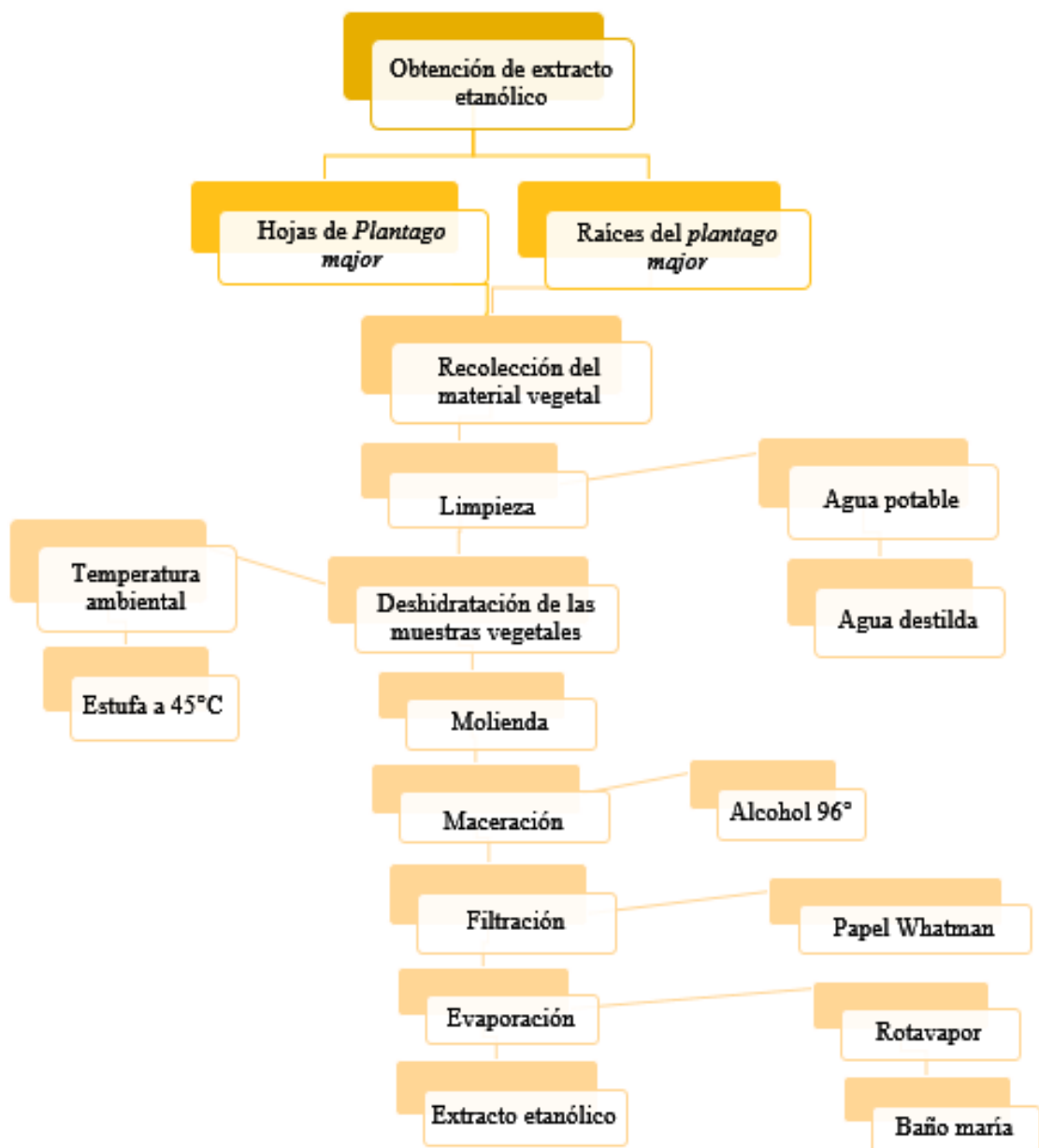


Figura 1: Organigrama de la obtención de los extractos etanólicos de *Plantago major*.

2.4.1.3. Técnica: Identificación fitoquímica de los extractos etanólicos

Se realizó la identificación fitoquímica para la identificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major*, se realizaron pruebas cualitativas específicas

basadas en reacciones de coloración o precipitación, llevadas a cabo en placa excavada o tubos de ensayo, según el tipo de compuesto a evaluar (ver anexo 12).

Los procedimientos aplicados fueron los siguientes:

- ✓ **Flavonoides:** Se colocó una gota del extracto en una placa excavada, se añadieron limaduras de magnesio y una gota de ácido clorhídrico concentrado, dejando reposar cinco minutos. La aparición de una coloración roja o rosada indicó una reacción positiva.
- ✓ **Taninos:** Se colocó una gota del extracto etanólico en una placa excavada, seguida de dos gotas de gelatina al 1 %. La formación de turbidez o precipitado confirmó una reacción positiva.
- ✓ **Compuestos fenólicos:** Se mezcló una gota del extracto etanólico con 1 a 2 gotas de cloruro férrico al 0,5 %. La aparición de una coloración intensa azul, verde o negra indicó una reacción positiva.
- ✓ **Saponinas:** Se mezclaron 1 mL de extracto etanólico y 2 mL de agua destilada, agitándose durante un minuto. La formación de espuma persistente mayor a 2 mm indicó resultado positivo.
- ✓ **Azúcares reductores:** En un tubo de ensayo se mezcló 1 mL del extracto etanólico con 1 mL del reactivo de Fehling (A + B). La mezcla se calentó en baño maría durante 10 minutos. La aparición de un precipitado rojo ladrillo indicó resultado positivo.
- ✓ **Aminoácidos:** Se mezclaron 1 mL de extracto etanólico y 1 mL de ninhidrina en un tubo de ensayo, llevándose a baño maría por 20 minutos. La aparición de una coloración púrpura indicó una reacción positiva.
- ✓ **Alcaloides:** Se colocó una gota del extracto etanólico en varias cavidades de una placa excavada + HCl (Ácido clorhídrico) al 1%:
 - ✚ + 1 gota del reactivo Dragendorff, siendo positivo por presentar precipitado naranja.
 - ✚ + 1 gota del reactivo Wagner, siendo positivo por precipitado marrón castaño.
 - ✚ + 1 gota del reactivo Mayer, siendo positivo por precipitado blanco.
- ✓ **Triterpenos, esteroides y quinonas:** Se colocó 10 mL del extracto etanólico en un vaso de precipitación y se evaporó completamente en

baño maría. El residuo se disolvió en diclorometano y se distribuyó en dos tubos de ensayo (51).

- Al primero se le añadió anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado; la aparición de un color azul verdoso o verde oscuro indicó la presencia de triterpenos y esteroides.
- Al segundo se le agregó hidróxido de sodio al 5 %, observándose una coloración rosa junto a una fase verde y un precipitado denso, confirmando la presencia de quinonas (ver tabla 1).

2.4.1.4. Técnica: determinación de las características organolépticas

Para la evaluación de las características organolépticas de los extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major*, se consideraron los siguientes parámetros:

- ✓ **Color:** Se colocaron 10 mL de cada extracto en vasos precipitados limpios, se dejaron reposar 30 minutos y se evaluó el color a simple vista bajo luz natural (ver anexo 13).
- ✓ **Olor:** Una vez evaluado el color, se valoró el olor acercando el vaso precipitado a la nariz y facilitando la percepción del aroma con la palma de la mano.
- ✓ **Aspecto (textura):** Culminada la evaluación del olor, se aplicó una gota de cada extracto en los dedos índice y pulgar, frotándolos suavemente para evaluar su textura.
- ✓ **Sabor:** Finalmente, se tomó una gota de cada uno de los extractos etanólicos y se llevó a la boca con fines exclusivamente sensoriales, evaluando el sabor de forma descriptiva (ver tabla 2).

2.4.1.5. Técnica: Reactivación de los microorganismos ATCC

✓ **Preparación de los medios de cultivo:**

Se prepararon los medios de cultivo necesarios para el sembrado de las cepas ATCC.

- ❖ **HM:** Se empleó para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, pesando 38 g/L y calentando la mezcla hasta disolver completamente. El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 minutos, se enfrió a 45–50 °C y se vertieron 20 mL en 35 placas Petri estériles, que se conservaron entre 2 y 8 °C.

❖ **SDA:** Para el cultivo y aislamiento de *Candida albicans* se preparó en proporción reducida (16,25 g en 250 mL), calentando la mezcla hasta lograr su completa disolución. Luego fue esterilizado en autoclave a 121°C por 15 minutos, se enfrió a 45–50 °C y se vertieron 20 mL en 30 placas Petri estériles, que se conservaron entre 2 y 8 °C (27, 53).

✓ **Preparación de los medios para la reactivación de las cepas.**

❖ **Caldo BHI:** Se preparó el medio disolviendo 9,25 g en 250 mL de agua destilada, calentando la mezcla hasta lograr su completa disolución. Posteriormente, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Una vez esterilizado, se distribuyeron 5 mL en cinco tubos de ensayo con tapa estériles, los cuales fueron almacenados a una temperatura de 2 a 8 °C hasta su uso.

❖ **Agar BHI:** Se disolvieron 13 g del medio en 250 mL de agua destilada y la mezcla se calentó hasta alcanzar una ebullición suave. Posteriormente, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Una vez esterilizado, se distribuyeron 5 mL en cinco tubos de ensayo con tapa estériles, los cuales se almacenaron en refrigeración a una temperatura de 2 a 8 °C hasta su utilización.

❖ **SDB:** Se disolvieron 13,25 g en 250 mL de agua destilada, se calentó hasta ebullición suave, se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos, se vertieron 5 mL en 3 tubos de ensayo con tapa estériles y se almacenó para su uso en refrigeración de 2 a 8 °C.

❖ **CN:** Se preparó con 13 g/L, se calentó hasta disolución, se esterilizó en autoclave a 121°C y almacenó en frascos estériles.

❖ **MAC:** Para el aislamiento de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, se disolvieron 13 g en 250 mL, se calentó, esterilizó en autoclave a 121°C, se vertieron 20 mL en 4 placas Petri y se refrigeraron de 2 a 8°C.

❖ **ACT:** Para el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*, se prepararon 11,25 g en 250 mL de agua destilada, se calentó, esterilizó en autoclave a 121°C, se vertieron 20 mL en 4 placas Petri y se refrigeraron de 2 a 8°C.

❖ **MSA:** Para el aislamiento selectivo de *Staphylococcus aureus*, se disolvieron 27,75 g en 250 mL de agua destilada, se calentó

hasta ebullición suave, se esterilizó en autoclave a 121°C, se vertió en 2 placas Petri y se refrigeró entre 2 y 8 °C.

✓ **Reactivación de las cepas:**

Las cepas as cepas bacterianas se atemperaron a temperatura ambiente por 3–4 horas, luego se inocularon en 4 mL de caldo BHI y se incubaron a 37 °C por 18–24 horas. Al evidenciarse turbidez, se sembraron en medios selectivos y diferenciados:

- MSA → *Staphylococcus aureus*.
- MAC → *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.
- ACT → *Pseudomonas aeruginosa*.

Tras de 24 h de incubación a 37 °C, se seleccionó una colonia de cada especie y se sembró en agar BIH, incubándose nuevamente por 24 h a 37 °C. Luego, se realizó una última siembra en 4 mL de CN, incubado por 24 h a 37 °C, y se ajustó la turbidez de cada cultivo a una concentración equivalente a 0,5 en la escala de McFarland.

Para *Candida albicans*, un hongo, la cepa fue atemperada durante 3 a 4 horas tras ser retirada del refrigerador. Luego, se sembró en 4 mL de SDB e incubó a 37 °C por 24h, observándose turbidez como indicio de crecimiento. Posteriormente, se sembró en SDA con cloranfenicol para evitar crecimiento bacteriano e incubó por 24 h a 37 °C. Se seleccionó una colonia representativa, se resembró en SDA y se incubó nuevamente por 24 h. Finalmente, se realizó una siembra en 4 mL de SDB e incubó por 24 h a 37 °C, ajustando la turbidez a 0,5 en la escala de McFarland. Todo el procedimiento se llevó a cabo en campana de flujo laminar, utilizando un mechero de Bunsen para mantener la asepsia y evitar la contaminación cruzada (26, 52) (ver anexo 14).

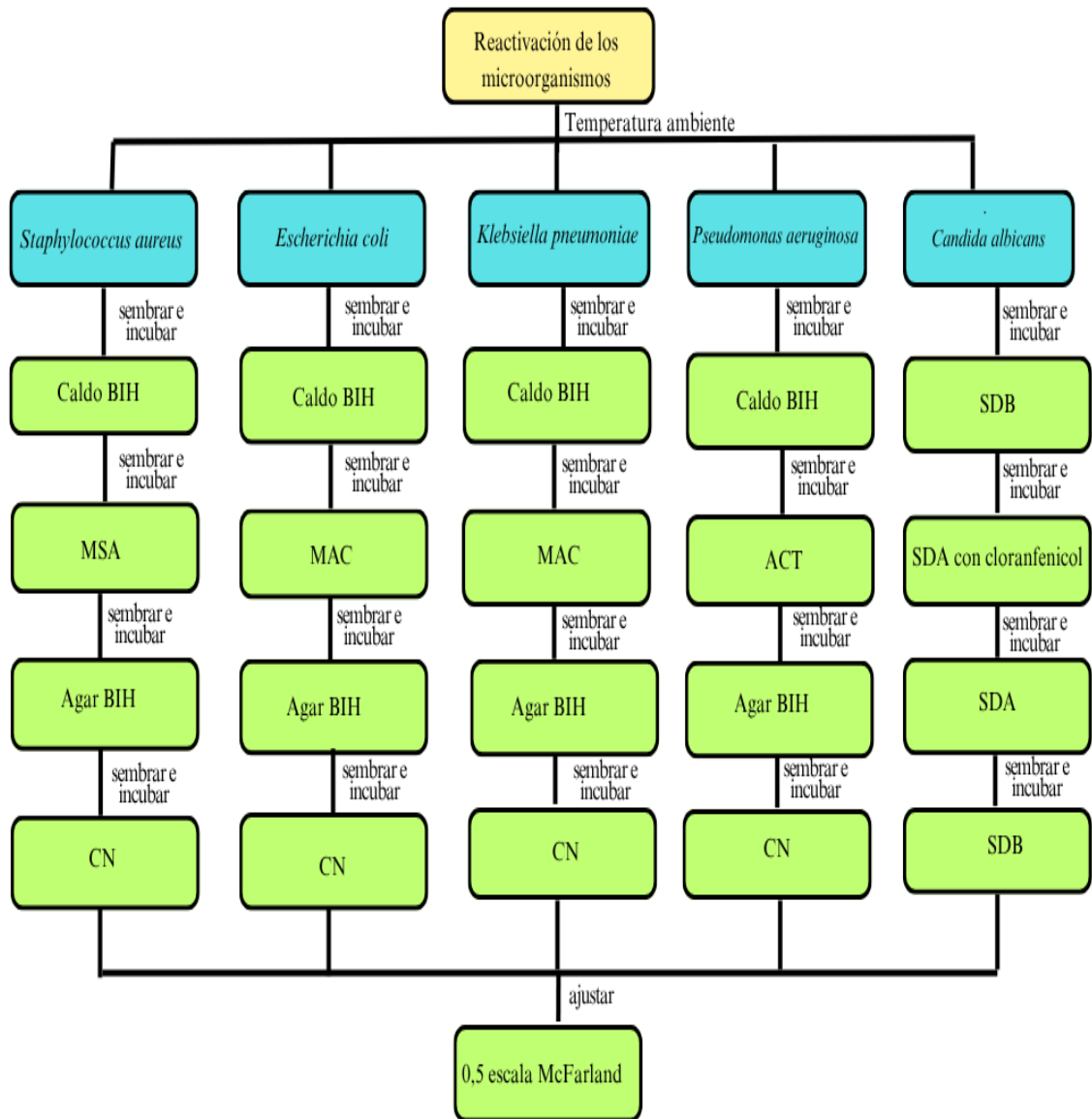


Figura 2: Organigrama de la reactivación de los microorganismos.

2.4.1.6. Técnica: Preparación de las diferentes concentraciones (20%, 40 % y 80 %) de cada uno de los extractos etanolicos.

Una vez obtenido el rendimiento de los extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major*, se procedió a preparar tres concentraciones (80 %, 40 % y 20 %) utilizando alcohol al 96° como disolvente, con el fin de emplearlas en el enfrentamiento contra los microorganismos.

+ Extracto etanólico de hojas:

- ❖ **Concentración al 80 % (H1):** Se disolvieron 13,6 g del extracto seco en 17 mL de alcohol al 96°.
- ❖ **Concentración al 40 % (H2):** A partir de la solución H1, se tomaron 5 mL y se diluyeron con 5 mL de alcohol al 96°.
- ❖ **Concentración al 20 % (H3):** A partir de la solución H2, se tomaron 4 mL y se mezclaron con 4 mL de alcohol al 96°.

+ Extracto etanólico de raíces:

Para este caso, se trabajó con dos extractos individuales que posteriormente fueron unificados:

- **Primer extracto:** Se disolvieron 6,9 g en 8,6 mL de alcohol al 96°.
- **Segundo extracto:** Se disolvieron 3,3 g en 4,1 mL de alcohol al 96°.

Ambos fueron combinados para formar una solución madre:

- ❖ **Concentración al 80 % (R1):** Mezcla total de ambos extractos disueltos.
- ❖ **Concentración al 40 % (R2):** A partir de R1, se tomaron 5 mL y se diluyeron con 5 mL de alcohol al 96°.
- ❖ **Concentración al 20 % (R3):** A partir de R2, se tomaron 4 mL y se mezclaron con 4 mL de alcohol al 96°.

2.4.1.7. Técnica: Dilución del cloranfenicol (control positivo).

Como control positivo se preparó una solución de cloranfenicol, disolviendo entre 150 y 250 µg en 5 mL de agua destilada.

2.4.1.8. Técnica: Evaluación de la actividad antimicrobiana.

Los ensayos se realizaron dentro de una campana de flujo laminar bacteriológico, utilizando un mechero de Bunsen para mantener condiciones asépticas y evitar la contaminación cruzada.

+ Método de difusión en agar por pozos.

Se emplearon 30 placas Petri: 24 con 20 mL de MH para bacterias y 6 con agar SDA para *Candida albicans*, rotuladas según el

microorganismo y la parte vegetal evaluada (15 placas para hojas y 15 para raíces de *Plantago major*). Los ensayos se realizaron por triplicado.

Cada placa fue sembrada por estría cruzada con un hisopo estéril humedecido en la suspensión del microorganismo correspondiente. Luego, se marcaron 5 posiciones en la base de la placa en forma de cruz:

- En la parte superior, el símbolo (+) correspondiente al control positivo (cloranfenicol para bacterias o clotrimazol al 1 % en solución para *Candida albicans*).
- En el centro, el símbolo (-) correspondiente al control negativo (alcohol al 96°).
- A la derecha, el número 1, correspondiente al extracto al 80 %.
- Debajo del control negativo, el número 2, para el extracto al 40 %.
- A la izquierda, el número 3, indicando el extracto al 20 %.

Una vez rotuladas las placas, se realizaron perforaciones en el medio con la parte superior de un tubo de ensayo estéril de 8 mm de diámetro. Los fragmentos extraídos fueron retirados cuidadosamente con un asa bacteriológica estéril. Luego, los orificios se sellaron con 40 µL de HM fundido, o con SDA fundido en el caso de *Candida albicans*. Tras la solidificación, se llenaron con una pipeta Pasteur hasta el ras con los extractos según su concentración y parte vegetal correspondiente, además de los controles positivos y negativos. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Finalmente, se midieron los halos de inhibición con una regla (26, 52) (ver anexo 15 y 16) y se calcularon los valores del PIR (ver tabla 5).

$$\text{PIR (\%)} = \frac{\text{media del diámetro del halo de inhibición del extracto}}{\text{Medida del diámetro del halo de inhibición del control positivo}} \times 100$$

Método de dilución en caldo.

Se utilizaron 10 series de 10 tubos de ensayo (5 para los extractos de hojas y 5 para los de raíces), rotulados del 1 al 10 según el tipo de extracto (H: hojas, R: raíces) y el microorganismo correspondiente. Para las bacterias, se añadieron 0,5 mL de CN en los tubos del 2 al 10, y 0,5 mL del extracto al 80 % en los tubos 1 y 2. A partir del tubo

número 2, se realizaron diluciones seriadas: se homogeneizó el contenido (CN y extracto) aspirando y descargando cinco veces con una micropipeta, y luego se transfirieron 0,5 mL sucesivamente hasta el tubo número 9. Del tubo 9 también se extrajeron 0,5 mL, los cuales fueron descartados para mantener un volumen uniforme en todos los tubos. Posteriormente, se agregó 0,5 mL de la suspensión bacteriana reactivada a cada tubo.

En el caso de *Candida albicans*, se empleó SDB en lugar de CN, siguiendo el mismo procedimiento.

Todos los tubos fueron sellados con torundas estériles de algodón y se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Finalizada la incubación, se procedió a observar en los tubos la presencia de turbidez, lo que indicó que los microorganismos habían crecido, hallándose así la CMI (ver tabla 8) (ver anexo 17 y 18). Para determinar la Concentración Mínima Bactericida (CMB), se prepararon 4 placas Petri con 20 mL de HM y 2 con SDA, divididas en 10 sectores y rotuladas del 1 al 10, indicando el tipo de extracto y el microorganismo correspondiente. El contenido de los tubos se sembró en los sectores respectivos utilizando un asa bacteriológica previamente esterilizada, y las placas fueron incubadas nuevamente durante 24 horas a 37 °C. Finalmente, se evaluó la presencia o ausencia de crecimiento microbiano en cada sector para determinar la CMB de cada extracto. (26, 27, 52) (ver anexo 19).

2.4.1.9. Técnica: Inactivación y eliminación de los microorganismos.

✚ Inactivación de microorganismos.

Finalizados los ensayos microbiológicos, se procedió a la inactivación de los cultivos para evitar riesgos biológicos y cumplir con las normas de bioseguridad. Todo el material contaminado, como placas Petri, tubos de ensayo y torundas de algodón, fue sumergido completamente en hipoclorito de sodio al 5 % durante 30 minutos, asegurando la destrucción de los microorganismos.

✚ Eliminación de los microorganismos

Una vez inactivados, los residuos líquidos se descartaron en un contenedor destinado a desechos biológicos, mientras que el material sólido fue embolsado, rotulado como residuo biocontaminado y eliminado según el protocolo correspondiente.

2.4.1.10. Técnica: Esterilización de los materiales.

Los materiales reutilizables (tubos de vidrio, frascos y placas Petri) fueron desinfectados previamente con hipoclorito, lavados con agua y detergente, enjuagados con agua destilada y secados al ambiente. Luego, se envolvieron en papel kraft y se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, a una presión de 15 lb/pulg², quedando listos para su próximo uso en condiciones seguras.

2.5. Instrumentos de recolección de la información.

✚ **Hojas de datos:** Utilizados para anotar los datos obtenidos como los resultados de las identificaciones fitoquímicas (ver Anexo 3), organolépticos (ver anexo 4), cada réplica experimental, como los valores de los halos de inhibición (ver anexo 5 y 6), la presencia o ausencia de crecimiento microbiano en los ensayos de CMI (ver anexo 7 y 8).

2.6. Herramientas para el análisis estadístico.

✚ **Software estadístico (SPSS y Microsoft Excel):** Se emplearon los programas SPSS y Microsoft Excel para el procesamiento y análisis estadístico de los datos. Los valores de los halos de inhibición (en milímetros), obtenidos mediante el método de difusión en agar, fueron analizados con ANOVA de un solo factor y un nivel de confianza del 95 %. Este análisis permitió identificar diferencias significativas en la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major* en distintas concentraciones (20 %, 40 % y 80 %) frente a cada microorganismo y comparado con el control positivo. Cuando el ANOVA mostró diferencias significativas ($p < 0,05$), se aplicó la prueba de Tukey HSD para determinar entre qué grupos se encontraban dichas diferencias. Los resultados se presentaron en tablas y gráficos para facilitar su interpretación.

2.7. Aspectos éticos

El presente estudio se desarrolló respetando los principios éticos fundamentales establecidos para investigaciones científicas. No se trabajó con seres humanos ni animales, por lo tanto, no fue necesaria la aprobación de un comité de ética institucional. Todos los procedimientos microbiológicos se realizaron cumpliendo estrictamente las normas de bioseguridad y buenas prácticas de laboratorio, con el fin de minimizar cualquier riesgo de contaminación y exposición a los microorganismos utilizados. Asimismo, se garantizó el uso responsable y la inactivación adecuada de los cultivos bacterianos y fúngicos al finalizar los experimentos, mediante su esterilización en autoclave antes de su eliminación como residuos biológicos.

Los materiales vegetales recolectados (hojas y raíces de *Plantago major*) provienen de zonas rurales de Ica y fueron utilizados exclusivamente con fines científicos, respetando el principio de sostenibilidad y sin causar daños al ecosistema local.

III. RESULTADOS

Objetivo específico 1: Identificar los metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos de las hojas y raíces del *Plantago major* (llantén) que crecen en zonas rurales de Ica, 2025.

Tabla 1: Resultados de la identificación fitoquímica de los extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major* (llantén).

| Metabolitos secundarios | Hojas | Raíces |
|-------------------------|-------------|--------|
| Flavonoides | + | ++ |
| Compuestos fenólicos | +++ | ++ |
| Alcaloides | Dragendorff | +++ |
| | Wagner | +++ |
| | Mayer | ++ |
| Taninos | ++ | + |
| Saponinas | +++ | + |
| Triterpenos | +++ | +++ |
| Quinonas | ++ | +++ |
| Azúcares reductores | + | ++ |
| Aminoácidos | +++ | +++ |

Leyenda:

- ❖ + → Presente
- ❖ ++ → Regular
- ❖ +++ → Abundante

Según la tabla 1, ambos extractos (hojas y raíces) de *Plantago major* contienen flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides, taninos, saponinas, triterpenos, quinonas, azúcares reductores y aminoácidos en distintas proporciones. Las hojas destacan por su mayor contenido de saponinas, taninos y compuestos fenólicos, mientras que las raíces presentan niveles ligeramente superiores de flavonoides, quinonas y azúcares reductores; en cambio, el contenido de alcaloides es similar en ambas partes de la planta.

Tabla 2: Resultados del análisis organoléptico de los extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major* (llantén).

| Características organolépticas | Hojas | Raíces |
|--------------------------------|--------------|-------------------------|
| Color | Verde oscuro | Marrón un poco oscuro |
| Olor | Alcanforado | Avainillado/Acaramelado |
| Aspecto | Fluido | Fluido |
| Sabor | Amargo | Ácida / amargo |

Las diferencias observadas pueden atribuirse a la variabilidad en la composición fitoquímica entre hojas y raíces. El olor avainillado y dulce de las raíces se asocia a compuestos fenólicos o ciertos flavonoides, mientras que el aroma alcanforado en las hojas sugiere la presencia de terpenoides o aceites esenciales. El sabor amargo presente en ambos extractos se asocia con los glucósidos o taninos. Esta caracterización sensorial complementa la identificación fitoquímica realizada.

Objetivo específico 2: Identificar la concentración del extracto etanólico de hojas y raíces de *Plantago major* que presentará el mayor Porcentaje de Inhibición Relativa (PIR) in vitro frente a las cepas patógenas evaluadas en comparación con el antimicrobiano de referencia y el control negativo.

Tabla 3: Promedio \pm desviación estándar de los halos de inhibición (mm) del extracto etanólico de hojas de *Plantago major* frente a microorganismos patógeno, control positivo y negativo.

| Microorganismo | 80% (H) | 40% (H) | 20% (H) | Control positivo | Alcohol 96° |
|-------------------------------|----------------|----------------------------------|----------------------------------|------------------|---------------|
| <i>Candida albicans</i> | 14,0 \pm 1,0 | 18,0 \pm 1,0 | 21,3 \pm 1,5 | 40,0 \pm 1,0 | 8,0 \pm 0,0 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 14,0 \pm 1,0 | 17,7 \pm 0,6 | 18,7 \pm 1,5 | 42,0 \pm 1,0 | 8,0 \pm 0,0 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 13,3 \pm 1,5 | 17,0 \pm 1,0 | 14,0 \pm 1,0 | 31,7 \pm 0,6 | 8,0 \pm 0,0 |
| <i>Escherichia coli</i> | 14,7 \pm 0,6 | 23,0 \pm 1,0 | 13,0 \pm 1,0 | 32,0 \pm 1,0 | 8,0 \pm 0,0 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 13,0 \pm 1,0 | 15,0 \pm 1,0 | 16,3 \pm 0,6 | 25,7 \pm 0,6 | 8,0 \pm 0,0 |

Leyenda: (H) \rightarrow Hojas

Los resultados indicaron que el extracto etanólico de hojas de *Plantago major* presentó actividad antimicrobiana frente a todas las cepas evaluadas. En todos los casos, el control positivo (cloranfenicol o clotrimazol al 1%) mostró halos de inhibición superiores a los de los extractos, mientras que el control negativo (alcohol 96°) mantuvo un halo constante de 8,0 mm sin actividad

antimicrobiana. Las hojas registraron sus mayores halos frente a *Candida albicans* (21,3 mm), *Staphylococcus aureus* (18,7 mm) y *Klebsiella pneumoniae* (16,3 mm) con la concentración al 20%, lo que sugirió una mejor difusión a menor concentración. En *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, la inhibición más alta se obtuvo con la concentración al 40% (17,0 mm y 23,0 mm, respectivamente). La consistencia de estos valores se reflejó en las desviaciones estándar bajas, lo que respaldó la confiabilidad y reproducibilidad de la actividad antimicrobiana observada.

Tabla 4: Promedio \pm desviación estándar de los halos de inhibición (mm) del extracto etanólico de raíces de *Plantago major* frente a microorganismos patógeno, control positivo y negativo.

| Microorganismo | 80% (R) | 40% (R) | 20% (R) | Control positivo | Alcohol 96° |
|-------------------------------|----------------|----------------------------------|----------------------------------|------------------|---------------|
| <i>Candida albicans</i> | 16,0 \pm 2,6 | 21,7 \pm 1,5 | 16,7 \pm 1,2 | 41,3 \pm 1,2 | 8,0 \pm 0,0 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 14,7 \pm 0,6 | 22,3 \pm 0,6 | 21,0 \pm 1,0 | 42,7 \pm 0,6 | 8,0 \pm 0,0 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 13,7 \pm 1,5 | 18,7 \pm 1,2 | 21,3 \pm 1,5 | 31,0 \pm 1,0 | 8,0 \pm 0,0 |
| <i>Escherichia coli</i> | 13,7 \pm 1,2 | 14,3 \pm 0,6 | 18,7 \pm 0,6 | 30,7 \pm 0,6 | 8,0 \pm 0,0 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 12,7 \pm 0,6 | 13,3 \pm 0,6 | 17,0 \pm 1,0 | 25,7 \pm 1,2 | 8,0 \pm 0,0 |

Leyenda: R) \rightarrow Raíz

Los resultados indicaron que el extracto etanólico de raíces de *Plantago major* presentó actividad antimicrobiana frente a todas las cepas evaluadas. En todos los casos, el control positivo mostró halos de inhibición superiores a los de los extractos, mientras que el control negativo no presentó actividad antimicrobiana, manteniendo un halo constante de 8,0 mm. Los extractos de raíces registraron sus mayores halos contra *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* a la concentración del 40% (21,7 mm y 22,3 mm, respectivamente). En *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, la mayor inhibición se observó con la concentración del 20% (21,3 mm; 18,7 mm y 17,0 mm, respectivamente). Estos resultados respaldaron el potencial antibacteriano del extracto de raíces, siendo este ligeramente más efectivo que el extracto de hojas.

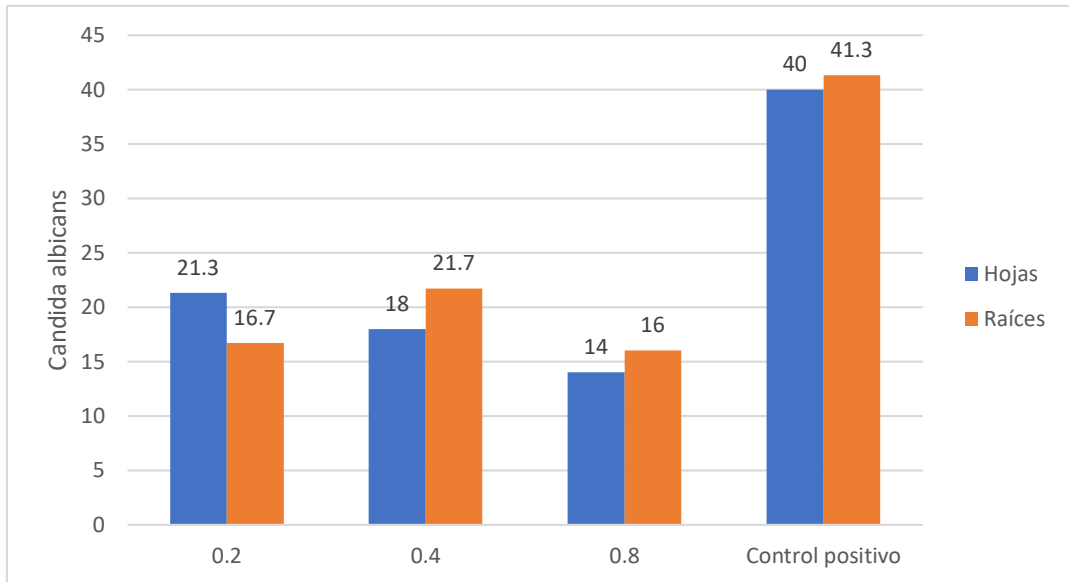


Figura 3: Actividad antimicrobiana (promedio de halos de inhibición) de los extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major* en comparación con el control positivo frente a *Candida albicans*.

El extracto etanólico de *Plantago major* mostró actividad antimicrobiana significativa frente a *Candida albicans*. Se observó que, a menor concentración del extracto, se obtuvo un mayor halo de inhibición; sin embargo, el control positivo (clotrimazol al 1%) presentó un halo de inhibición considerablemente superior en comparación con todos los tratamientos evaluados.

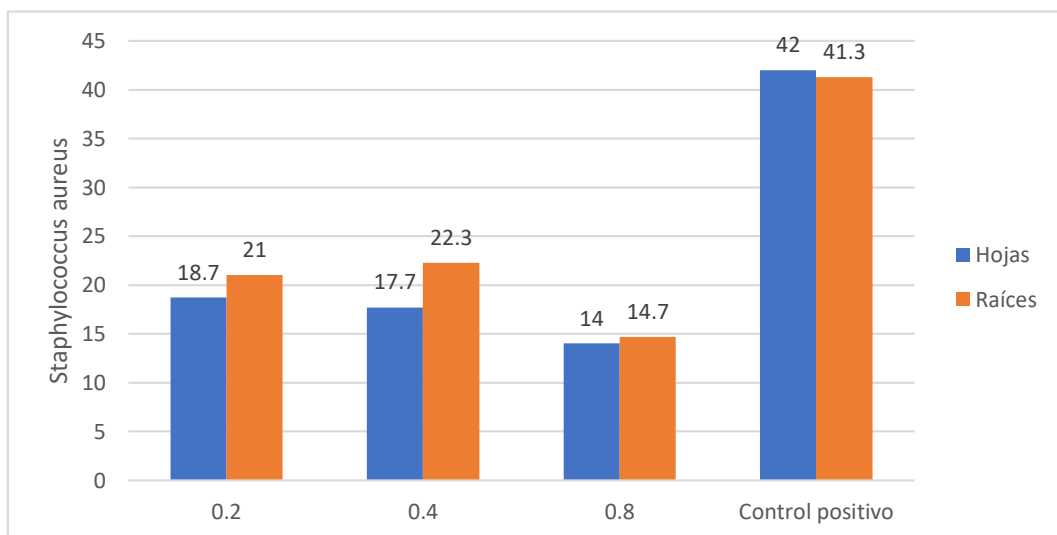


Figura 4: Actividad antimicrobiana (promedio de halos de inhibición) de los extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major* en comparación con el control positivo frente a *Staphylococcus aureus*.

El extracto etanólico de *Plantago major* evidenció una actividad antimicrobiana significativa contra *Staphylococcus aureus*. Se identificó que las concentraciones más bajas del extracto

generaron halos de inhibición de mayor tamaño; no obstante, el control positivo (cloranfenicol) registró un halo notablemente superior al obtenido por cualquiera de los tratamientos ensayados.

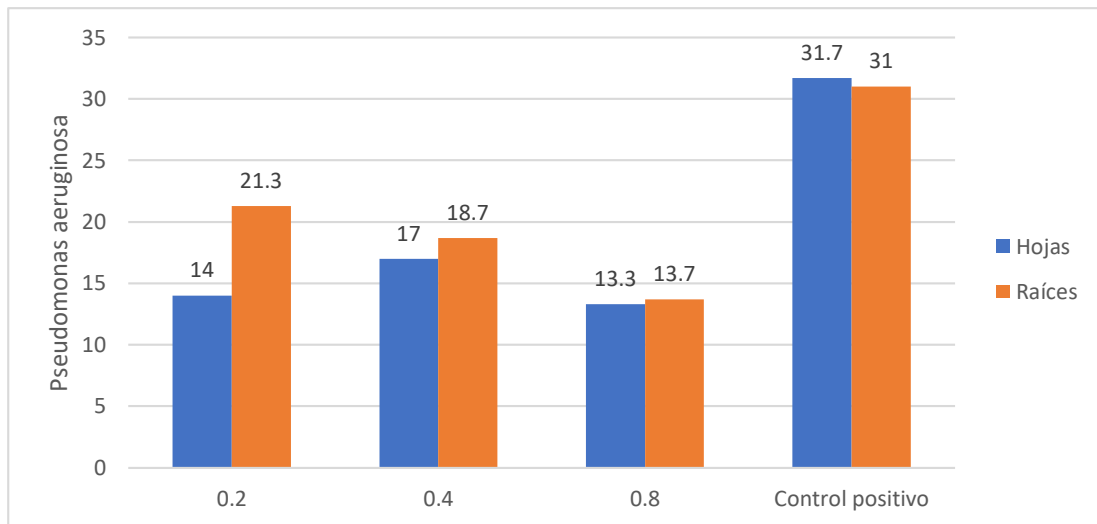


Figura 5: Actividad antimicrobiana (promedio de halos de inhibición) de los extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major* en comparación con el control positivo frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

El extracto etanólico de *Plantago major* evidenció una actividad antimicrobiana significativa frente a *Pseudomonas aeruginosa*. No obstante, el control positivo produjo halos de inhibición notablemente mayores en comparación con todos los tratamientos evaluados.

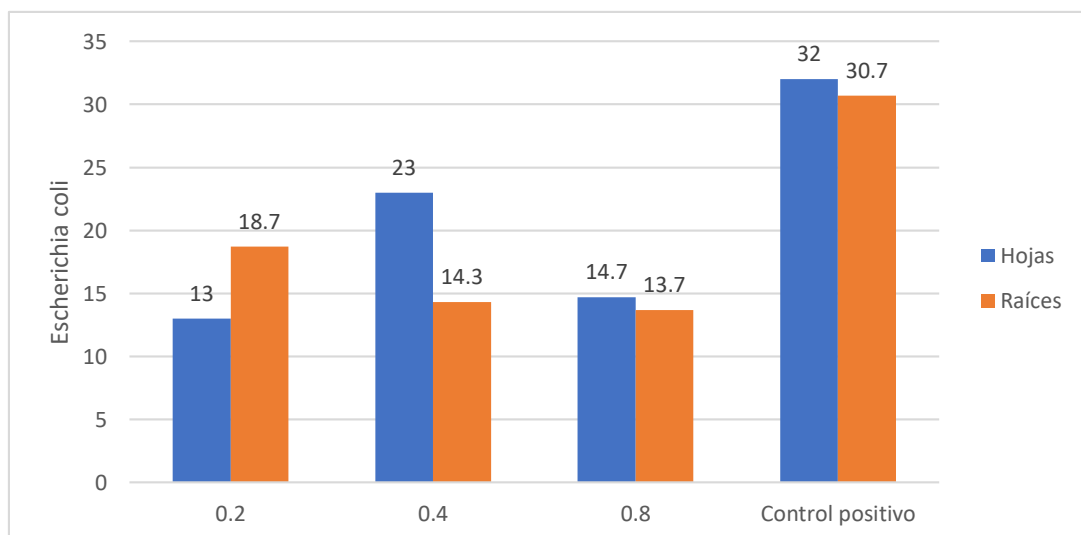


Figura 6: Actividad antimicrobiana (promedio de halos de inhibición) de los extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major* en comparación con el control positivo frente a *Escherichia coli*.

El extracto etanólico de *Plantago major* mostró una actividad antimicrobiana significativa frente a *Escherichia coli*. Sin embargo, el control positivo presentó halos de inhibición considerablemente mayores en comparación con todos los tratamientos evaluados.

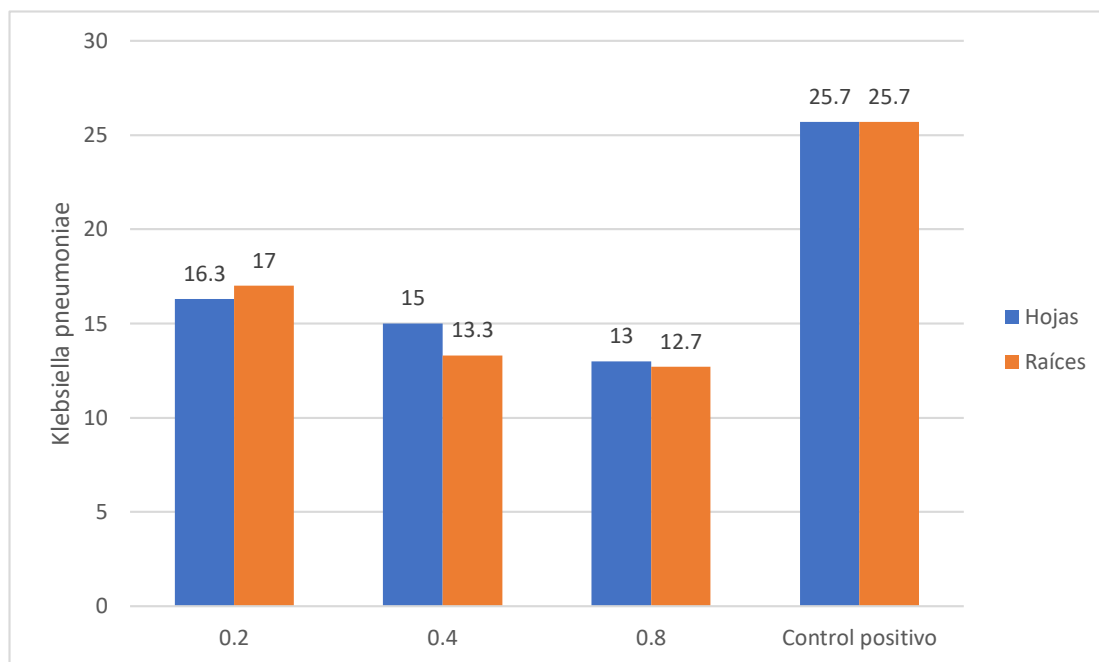


Figura 7: Actividad antimicrobiana (promedio de halos de inhibición) de los extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major* en comparación con el control positivo frente a *Klepsiella pneumoniae*.

El extracto etanólico de *Plantago major* evidenció una actividad antimicrobiana significativa frente a *Klepsiella pneumoniae*. No obstante, el control positivo produjo halos de inhibición notablemente mayores en comparación con todos los tratamientos evaluados.

Tabla 5: Porcentaje de Inhibición Relativa (PIR) de los extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major* frente a microorganismos patógenos.

| Microorganismo | PIR (H) | PIR (H) | PIR (H) | PIR (R) | PIR (R) | PIR (R) |
|-------------------------------|---------|--------------|--------------|---------|--------------|--------------|
| <i>Candida albicans</i> | 35,0% | 45,0% | 53,3% | 38,7% | 52,5% | 40,4% |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 33,3% | 42,1% | 44,6% | 34,4% | 52,3% | 49,2% |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 42,0% | 53,6% | 44,1% | 44,2% | 60,3% | 68,7% |
| <i>Escherichia coli</i> | 45,9% | 71,9% | 40,6% | 44,6% | 46,6% | 60,9% |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 50,6% | 58,4% | 63,4% | 49,4% | 51,8% | 66,1% |

Leyenda: R→ Raíz H→Hojas

Los valores calculados del porcentaje de inhibición relativa (PIR) indicaron que los extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major* presentaron una actividad antimicrobiana de nivel moderado, con una eficacia relativa que osciló entre 71,9 % y 44,6 %, dependiendo de la concentración, la parte de la planta utilizada y el microorganismo evaluado.

Las cepas más sensibles fueron *Escherichia coli*, con un PIR de 71,9 % para el extracto de hojas al 20 %; *Pseudomonas aeruginosa*, con 68,7 % para el extracto de raíces al 20 %; y *Klebsiella pneumoniae*, con 66,1 % para el extracto de raíces al 20 % y 63,4 % para el extracto de hojas al 20 %. Por otro lado, los valores más bajos se registraron frente a *Staphylococcus aureus* con el extracto de hojas al 20 % y *Candida albicans* con el extracto de raíces al 40 % (PIR: 52,5 %).

Estos resultados confirmaron que, aunque los extractos no igualaron completamente al antibiótico de referencia en términos absolutos, su efecto inhibitorio fue relevante desde el punto de vista microbiológico. Asimismo, en la mayoría de los casos se observó que la concentración del 20 % resultó más efectiva que la del 40 %, lo que podría deberse a que, a mayor concentración, el extracto no logró difundirse adecuadamente en la placa. Se realizó el análisis ANOVA para determinar si existieron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados que presentaron un mayor PIR vs el antibiótico de referencia.

Tabla 6: ANOVA del efecto de las concentraciones del extracto etanólico de hojas y raíces de *Plantago major* y control positivo de los halos de inhibición frente a las cepas evaluadas con un nivel de confiabilidad de 95% ($\alpha=0.05$).

| Microorganismo | Parte de la planta | SCE | SCD | SCT | CME | CMD | F | P-value |
|-------------------------------|--------------------|--------|-------|----------|--------|-------|-------|-------------|
| <i>Candida albicans</i> | Hoja | 843,56 | 8,667 | 852,222 | 421,78 | 1,44 | 292,0 | 1,05171E-06 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Hoja | 1137,6 | 7,333 | 1144,889 | 568,78 | 1,22 | 465,4 | 2,62793E-07 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Hoja | 536,2 | 4,667 | 540,8889 | 268,11 | 0,778 | 344,7 | 6,42238E-07 |
| <i>Escherichia coli</i> | Hoja | 542,0 | 6,0 | 548,0 | 271,0 | 1,0 | 271 | 1,31254E-06 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Hoja | 202,67 | 3,333 | 206,0 | 101,33 | 0,556 | 182,4 | 4,23677E-06 |
| <i>Candida albicans</i> | Raíz | 1020,2 | 10,0 | 1030,22 | 510,11 | 1,667 | 306,1 | 9,1455E-07 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Raíz | 884,67 | 3,333 | 888,0 | 442,33 | 0,556 | 796,2 | 5,28929E-08 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Raíz | 252,67 | 9,333 | 262,0 | 126,33 | 1,556 | 81,21 | 4,52071E-05 |
| <i>Escherichia coli</i> | Raíz | 429,56 | 2,0 | 431,5556 | 214,78 | 0,333 | 644,3 | 9,95359E-08 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Raíz | 240,67 | 5,333 | 246,0 | 120,33 | 0,889 | 135,4 | 1,01904E-05 |

Leyenda:

- ❖ **SCE** → Suma de cuadrados del efecto (o “grupo”).
- ❖ **SCD** → Suma de cuadrados del error (o “residual”).
- ❖ **SCT** → Suma de cuadrados total.
- ❖ **CME** → Cuadrado medio del efecto.
- ❖ **CMD** → Cuadrado medio del error.
- ❖ **F** → Estadístico F.
- ❖ **P-valor** → Probabilidad asociada a F.

✚ **Hipótesis nula (H₀):** Todas las medias de los grupos son iguales.

✚ **Hipótesis alternativa (H₁):** Al menos una de las medias de los halos de inhibición es significativamente diferente.

Se realizó un ANOVA de un factor con un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0,05$), comparando tres tratamientos (40%, 20% y control positivo) para cada cepa y parte de *Plantago major*. El objetivo fue evaluar si existían diferencias significativas entre los tratamientos con el antibiótico de referencia. En todos los casos, el ANOVA mostró un p-value < 0,05; lo que llevó al rechazo de la hipótesis nula y a la aceptación de la hipótesis alterna, indicando que al menos uno de los tratamientos difiere significativamente de los demás. Por lo tanto, se aplicó la prueba post hoc de Tukey para determinar específicamente entre qué grupos se presentaron dichas diferencias.

Tabla 7: Prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) para los tratamientos de extracto etanólico de hojas y raíces (40 % y 20 %) de *Plantago major* vs control positivo frente a los microorganismos evaluados.

| Microorganismo | grupo 1 | grupo 2 | Diferencia de medianas | p-value | Diferencia significativa |
|-------------------------------|------------|----------------|------------------------|-------------|--------------------------|
| <i>Candida albicans</i> | Hojas 40% | Antimicrobiano | 22 | 1,1663E-06 | SI |
| | Hojas 20% | Antimicrobiano | 18,6666667 | 3,2683E-06 | SI |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Hojas 40% | Antimicrobiano | 24,33333333 | 4,262E-07 | SI |
| | Hojas 20% | Antimicrobiano | 23,33333333 | 5,2175E-07 | SI |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Hojas 40% | Antimicrobiano | 14,6666667 | 2,12792E-06 | SI |
| | Hojas 20% | Antimicrobiano | 17,6666667 | 6,87071E-07 | SI |
| <i>Escherichia coli</i> | Hojas 40% | Antimicrobiano | 9 | 8,1844E-05 | SI |
| | Hojas 20% | Antimicrobiano | 19 | 9,3092E-07 | SI |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Hojas 40% | Antimicrobiano | 10,6666667 | 5,407E-06 | SI |
| | Hojas 20% | Antimicrobiano | 9,33333333 | 1,2006E-05 | SI |
| <i>Candida albicans</i> | Raíces 40% | Antimicrobiano | 19,6666667 | 3,6859E-06 | SI |
| | Raíces 20% | Antimicrobiano | 24,6666667 | 9,0055E-07 | SI |
| | Raíces 40% | Antimicrobiano | 20,3333333 | 1,7224E-07 | SI |

| Microorganismo | grupo 1 | grupo 2 | Diferencia de medianas | p-value | Diferencia significativa |
|-------------------------------|------------|----------------|------------------------|------------|--------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Raíces 20% | Antimicrobiano | 21,6666667 | 1,29E-07 | SI |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Raíces 40% | Antimicrobiano | 12,3333333 | 4,7585E-05 | SI |
| | Raíces 20% | Antimicrobiano | 9,6666667 | 0,00019172 | SI |
| <i>Escherichia coli</i> | Raíces 40% | Antimicrobiano | 16,3333333 | 1,4648E-07 | SI |
| | Raíces 20% | Antimicrobiano | 12 | 5,6414E-07 | SI |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Raíces 40% | Antimicrobiano | 12,3333333 | 9,2693E-06 | SI |
| | Raíces 20% | Antimicrobiano | 8,6666667 | 7,2484E-05 | SI |

Según la prueba de Tukey HSD, el antimicrobiano de referencia presentó diferencias significativas frente a todos los tratamientos. Lo que indica que el antimicrobiano es más efectivo que los extractos etanolitos (40 % y 20 %) de hojas y raíces de *Plantago major*.

Objetivo específico 3

Hallar las diferencias existentes de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de los extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major* recolectados en zonas rurales de Ica en 2025, frente a las cepas patógenas evaluadas.

Tabla 8: CMI del extracto etanólico de las hojas y raíces de *Plantago major* frente a cepas patógenas.

| Microorganismo | Parte de la planta | CMI (%) | Equivalente (mg/mL) |
|-------------------------------|--------------------|---------|---------------------|
| <i>Candida albicans</i> | Hojas | 5% | 50,0 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Hojas | 5% | 50,0 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Hojas | 5% | 50,0 |
| <i>Escherichia coli</i> | Hojas | 5% | 50,0 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Hojas | 5% | 50,0 |
| <i>Candida albicans</i> | Raíces | 5% | 50,0 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Raíces | 5% | 50,0 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Raíces | 5% | 50,0 |
| <i>Escherichia coli</i> | Raíces | 2,5% | 25,0 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Raíces | 5% | 50,0 |

En general, tanto los extractos etanólicos de hojas como de raíces de *Plantago major* ejercieron actividad antimicrobiana efectiva incluso a bajas concentraciones, inhibiendo el crecimiento de las cepas patógenas a concentraciones al 5% (50 mg/mL). Salvo *Escherichia coli*, cuya CMI fue del 2,5% en el extracto de raíces, lo que evidenció una mayor sensibilidad.

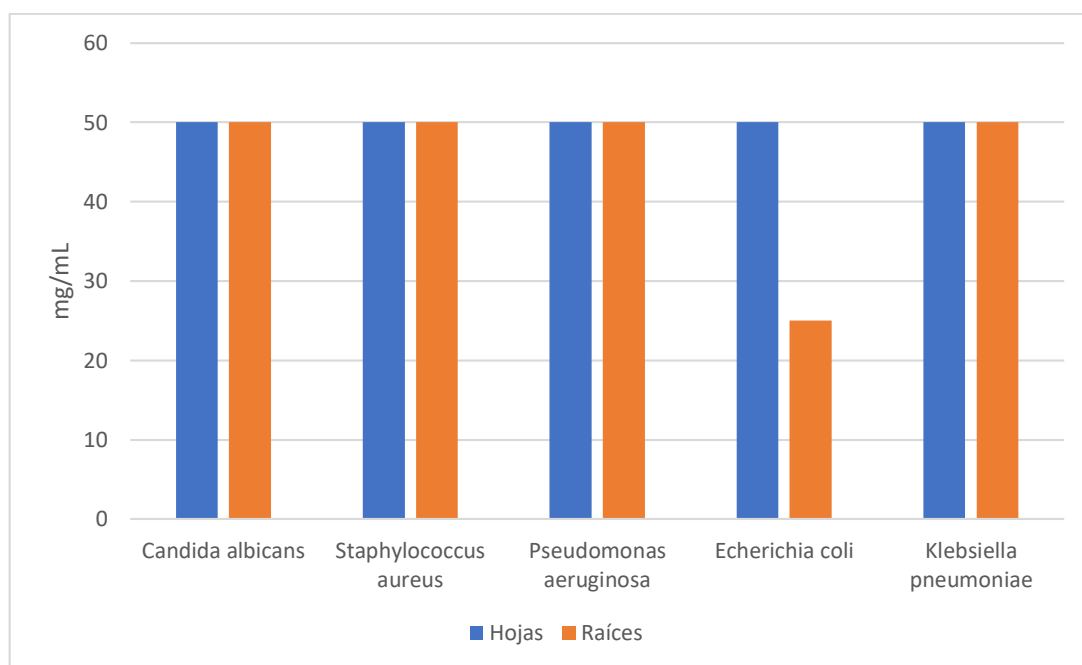


Figura 8: Comparación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de hojas y raíces de *Plantago major* frente a cinco cepas microbianas.

El extracto etanólico de raíces de *Plantago major* presentó una mayor eficacia frente a *Escherichia coli*, logrando inhibir su crecimiento a concentraciones del (2,5%). En contraste, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* mostraron susceptibilidad principalmente a concentraciones del 5%. La superioridad observada en el extracto de raíces podría estar relacionada con una mayor concentración o diversidad de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. En conjunto, los resultados respaldan el potencial de los extractos etanólicos de hojas y raíces de *P. major* como una alternativa natural para el control de microorganismos patógenos.

Objetivo específico 4: Identificar la concentración de los extractos etanólicos de hojas o raíces del *Plantago major* (llantén) que mostrará mayor efecto antimicrobiano frente a las cepas patógenas evaluadas.

Tabla 9: Comparación de las medias de los halos de inhibición de los extractos etanólicos e hojas y raíces de *Plantago major* frente a cada cepa evaluada.

| Microorganismo | 80% (H) | 40% (H) | 20% (H) | 80% (R) | 40% (R) | 20% (R) |
|-------------------------------|------------|-------------------|------------|------------|-------------------|-------------------|
| <i>Candida albicans</i> | 14,0 ± 1,0 | 18,0 ± 1,0 | 21,3 ± 1,5 | 16,0 ± 2,6 | 21,7 ± 1,5 | 16,7 ± 1,2 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 14,0 ± 1,0 | 17,7 ± 0,6 | 18,7 ± 1,5 | 14,7 ± 0,6 | 22,3 ± 0,6 | 21,0 ± 1,0 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 13,3 ± 1,5 | 17,0 ± 1,0 | 14,0 ± 1,0 | 13,7 ± 1,5 | 18,7 ± 1,2 | 21,3 ± 1,5 |
| <i>Escherichia coli</i> | 14,7 ± 0,6 | 23,0 ± 1,0 | 13,0 ± 1,0 | 13,7 ± 1,2 | 14,3 ± 0,6 | 18,7 ± 0,6 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 13,0 ± 1,0 | 15,0 ± 1,0 | 16,3 ± 0,6 | 12,7 ± 0,6 | 13,3 ± 0,6 | 17,0 ± 1,0 |

En la mayoría de las cepas evaluadas, el extracto que presentó mayor inhibición fue el de raíces, con una concentración del 20% frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, y del 40% frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. En cambio, el extracto de hojas solo mostró un mayor halo de inhibición frente a *Escherichia coli*. Esta diferencia podría deberse a la variación en la cantidad y tipo de metabolitos secundarios presentes en cada parte de la planta, lo que respalda su reconocida propiedad antimicrobiana.

Tabla 10: ANOVA de los halos de inhibición de los extractos de hojas y raíces de *Plantago major* frente a las cepas evaluadas con un nivel de confiabilidad de 95 % ($\alpha=0.05$)

| Microorganismo | Parte de la planta | SCE | SCD | SCT | CME | CMD | F | P-valor |
|-------------------------------|--------------------|--------|--------|--------|--------|------|------|------------|
| <i>Candida albicans</i> | Hoja y raíz | 132,28 | 24,667 | 156,94 | 26,456 | 2,06 | 12,9 | 0,00017792 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Hoja y raíz | 166,28 | 10,667 | 176,94 | 33,256 | 0,89 | 37,4 | 6,4986E-07 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Hoja y raíz | 157,3 | 20,667 | 178,0 | 31,467 | 1,72 | 18,3 | 3,0696E-05 |
| <i>Escherichia coli</i> | Hoja y raíz | 224,44 | 8,667 | 233,11 | 44,889 | 0,72 | 62,2 | 3,6886E-08 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Hoja y raíz | 50,44 | 8,0 | 58,44 | 10,089 | 0,67 | 15,1 | 7,9995E-05 |

Leyenda:

❖ SCE → Suma de cuadrados del efecto (o “grupo”).

- ❖ **SCD** → Suma de cuadrados del error (o “residual”).
- ❖ **SCT** → Suma de cuadrados total.
- ❖ **CME** → Cuadrado medio del efecto.
- ❖ **CMD** → Cuadrado medio del error.
- ❖ **F** → Estadístico F.
- ❖ **P-valor** → Probabilidad asociada a F.

✚ **Hipótesis nula (H₀):** Todas las medias de los grupos son iguales.

✚ **Hipótesis alternativa (H₁):** Al menos una de las medias de los halos de inhibición es significativamente diferente.

Se realizó un ANOVA de un factor con un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0,05$), comparando seis tratamientos (extractos al 80%, 40% y 20% de hojas y raíces) frente a cada microorganismo. El objetivo fue evaluar si existían diferencias significativas entre los tratamientos. En todos los casos, el ANOVA mostró un valor de $p < 0,05$; lo que llevó al rechazo de la hipótesis nula y a la aceptación de la hipótesis alternativa, indicando que al menos uno de los tratamientos difería significativamente de los demás. Por lo tanto, se aplicó la prueba post hoc de Tukey para determinar específicamente entre qué grupos se presentaron dichas diferencias.

Tabla 11: Prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) de comparaciones múltiples para la identificación del tratamiento con mayor halo de inhibición en hojas o raíces de *Plantago major* frente a cada microorganismo evaluado.

| Microorganismo | Grupo 1 | Grupo 2 | Diferencia de medianas | <i>p-value</i> | Diferencia significativa |
|-------------------------|-------------------|-------------------|------------------------|-------------------|--------------------------|
| <i>Candida albicans</i> | Hojas 80% | Hojas 40% | 4 | 0,04536245 | SI |
| | Hojas 80% | Hojas 20% | 7,33333333 | 0,00046053 | SI |
| | Hojas 80% | Raíces 80% | 2,66666667 | 0,27373491 | NO |
| | Hojas 80% | Raíces 40% | 7,66666667 | 0,00030485 | SI |
| | Hojas 80% | Raíces 20% | 2,66666667 | 0,27373491 | NO |
| | Hojas 40% | Hojas 20% | 3,33333333 | 0,11582932 | NO |
| | Hojas 40% | Raíces 80% | 1,33333333 | 0,85607929 | NO |
| | Hojas 40% | Raíces 40% | 3,66666667 | 0,07290167 | NO |
| | Hojas 40% | Raíces 20% | 1,33333333 | 0,85607929 | NO |
| | Hojas 20% | Raíces 80% | 4,66666667 | 0,01734755 | SI |
| | Hojas 20% | Raíces 40% | 0,33333333 | 0,99967368 | NO |
| | Hojas 20% | Raíces 20% | 4,66666667 | 0,01734755 | SI |
| | Raíces 80% | Raíces 40% | 5 | 0,01074519 | SI |
| | Raíces 80% | Raíces 20% | 0 | 1 | NO |

| Microorganismo | Grupo 1 | Grupo 2 | Diferencia de medianas | p-value | Diferencia significativa |
|-------------------------------|-------------------|-------------------|------------------------|-------------------|--------------------------|
| | Raíces 40% | Raíces 20% | 5 | 0.01074519 | SI |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Hojas 80% | Hojas 40% | 3,66666667 | 0,00475449 | SI |
| | Hojas 80% | Hojas 20% | 4,66666667 | 0,00062106 | SI |
| | Hojas 80% | Raíces 80% | 0,66666667 | 0,94777088 | NO |
| | Hojas 80% | Raíces 40% | 8,33333333 | 1,7866E-06 | SI |
| | Hojas 80% | Raíces 20% | 7 | 1,1546E-05 | SI |
| | Hojas 40% | Hojas 20% | 1 | 0,7803967 | NO |
| | Hojas 40% | Raíces 80% | 3 | 0,020173 | SI |
| | Hojas 40% | Raíces 40% | 4,66666667 | 0,00062106 | SI |
| | Hojas 40% | Raíces 20% | 3,33333333 | 0,00973638 | SI |
| | Hojas 20% | Raíces 80% | 4 | 0,00236216 | SI |
| | Hojas 20% | Raíces 40% | 3,66666667 | 0,00475449 | SI |
| | Hojas 20% | Raíces 20% | 2,33333333 | 0,08607431 | NO |
| | Raíces 80% | Raíces 40% | 7,66666667 | 4,3998E-06 | SI |
| | Raíces 80% | Raíces 20% | 6,33333333 | 3,2531E-05 | SI |
| Raíces 40% | Raíces 20% | 1,33333333 | 0,53800241 | NO | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Hojas 80% | Hojas 40% | 3,66666667 | 0,04498533 | SI |
| | Hojas 80% | Hojas 20% | 0,66666667 | 0,98708738 | NO |
| | Hojas 80% | Raíces 80% | 0,33333333 | 0,99949826 | NO |
| | Hojas 80% | Raíces 40% | 5,33333333 | 0,00335553 | SI |
| | Hojas 80% | Raíces 20% | 8 | 8,6264E-05 | SI |
| | Hojas 40% | Hojas 20% | 3 | 0,12496946 | NO |
| | Hojas 40% | Raíces 80% | 3,33333333 | 0,07551507 | NO |
| | Hojas 40% | Raíces 40% | 1,66666667 | 0,63906095 | NO |
| | Hojas 40% | Raíces 20% | 4,33333333 | 0,01574004 | SI |
| | Hojas 20% | Raíces 80% | 0,33333333 | 0,99949826 | NO |
| | Hojas 20% | Raíces 40% | 4,66666667 | 0,00933699 | SI |
| | Hojas 20% | Raíces 20% | 7,33333333 | 0,00020098 | SI |
| | Raíces 80% | Raíces 40% | 5 | 0,00557379 | SI |
| | Raíces 80% | Raíces 20% | 7,66666667 | 0,00013093 | SI |
| Raíces 40% | Raíces 20% | 2,66666667 | 0,2018525 | NO | |
| <i>Escherichia coli</i> | Hojas 80% | Hojas 40% | 8,33333333 | 5,7062E-07 | SI |
| | Hojas 80% | Hojas 20% | 1,66666667 | 0,22935608 | NO |
| | Hojas 80% | Raíces 80% | 1 | 0,70394901 | NO |
| | Hojas 80% | Raíces 40% | 0,33333333 | 0,99602175 | NO |
| | Hojas 80% | Raíces 20% | 4 | 0,00097302 | SI |
| | Hojas 40% | Hojas 20% | 10 | 7,38E-08 | SI |
| | Hojas 40% | Raíces 80% | 9,33333333 | 1,6092E-07 | SI |
| | Hojas 40% | Raíces 40% | 8,66666667 | 3,6899E-07 | SI |
| | Hojas 40% | Raíces 20% | 4,33333333 | 0,00047386 | SI |
| | Hojas 20% | Raíces 80% | 0,66666667 | 0,92186776 | NO |
| | Hojas 20% | Raíces 40% | 1,33333333 | 0,43507937 | NO |
| | Hojas 20% | Raíces 20% | 5,66666667 | 3,5081E-05 | SI |

| Microorganismo | Grupo 1 | Grupo 2 | Diferencia de medianas | p-value | Diferencia significativa |
|------------------------------|-------------------|-------------------|------------------------|-------------------|--------------------------|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Raíces 80% | Raíces 40% | 0,66666667 | 0,92186776 | NO |
| | Raíces 80% | Raíces 20% | 5 | 0,00012221 | SI |
| | Raíces 40% | Raíces 20% | 4,33333333 | 0,00047386 | SI |
| | Hojas 80% | Hojas 40% | 2 | 0,09055324 | NO |
| | Hojas 80% | Hojas 20% | 3,33333333 | 0,00323511 | SI |
| | Hojas 80% | Raíces 80% | 0,33333333 | 0,99521006 | NO |
| | Hojas 80% | Raíces 40% | 0,33333333 | 0,99521006 | NO |
| | Hojas 80% | Raíces 20% | 4 | 0,00068154 | SI |
| | Hojas 40% | Hojas 20% | 1,33333333 | 0,39548968 | NO |
| | Hojas 40% | Raíces 80% | 2,33333333 | 0,03945125 | SI |
| | Hojas 40% | Raíces 40% | 1,66666667 | 0,19847424 | NO |
| | Hojas 40% | Raíces 20% | 2 | 0,09055324 | NO |
| | Hojas 20% | Raíces 80% | 3,66666667 | 0,0014635 | SI |
| | Hojas 20% | Raíces 40% | 3 | 0,00733683 | SI |
| | Hojas 20% | Raíces 20% | 0,66666667 | 0,90926657 | NO |
| Raíces 80% | Raíces 40% | 0,66666667 | 0,90926657 | NO | |
| Raíces 80% | Raíces 20% | 4,33333333 | 0,00032714 | SI | |
| Raíces 40% | Raíces 20% | 3,66666667 | 0,0014635 | SI | |

La prueba de Tukey HSD permitió identificar entre qué tratamientos existieron diferencias significativas, complementando los resultados presentados en la Tabla 10. Este análisis permitió determinar, para cada microorganismo, la concentración y parte vegetal (hoja o raíz) que registró el mayor halo de inhibición y que fue estadísticamente superior frente a otros tratamientos.

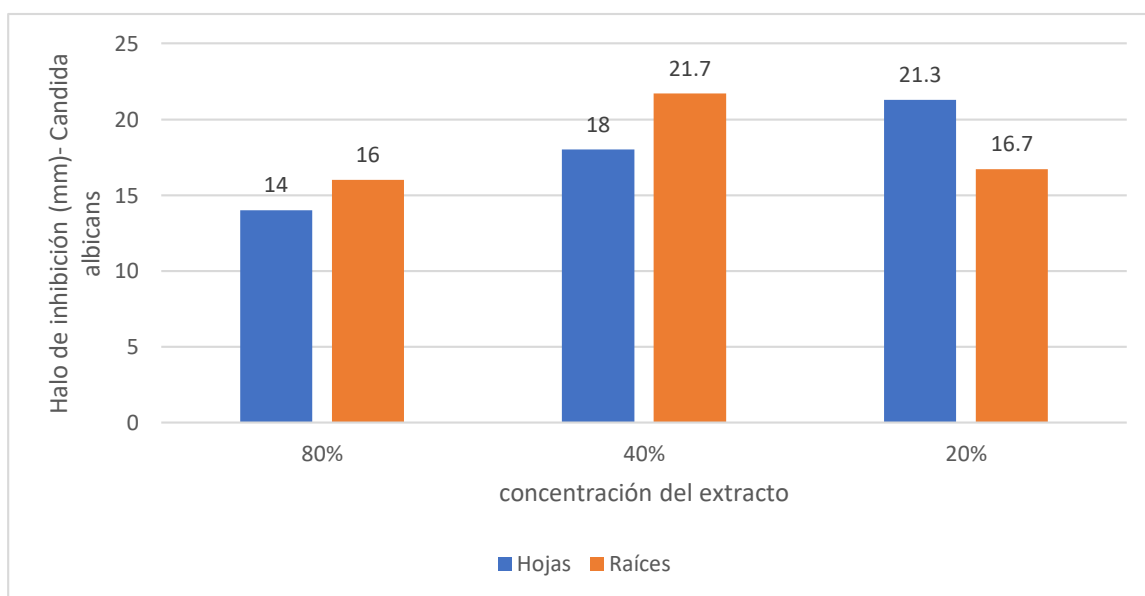


Figura 9: Comparación de halos de inhibición frente a *Candida albicans* entre extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major*.

Se observó que el mayor halo de inhibición lo presentó el extracto de raíces al 40 % (21,7 mm), el cual fue significativamente mayor que la mayoría de los tratamientos; sin embargo, no mostró diferencia significativa frente a las hojas al 20 % (21,3 mm) ni frente a las hojas al 40 % (18,0 mm). Por tanto, no se pudo afirmar estadísticamente que el extracto de raíces al 40 % fuera superior a los extractos de hojas al 20 % y 40 % frente al *Candida albicans*.

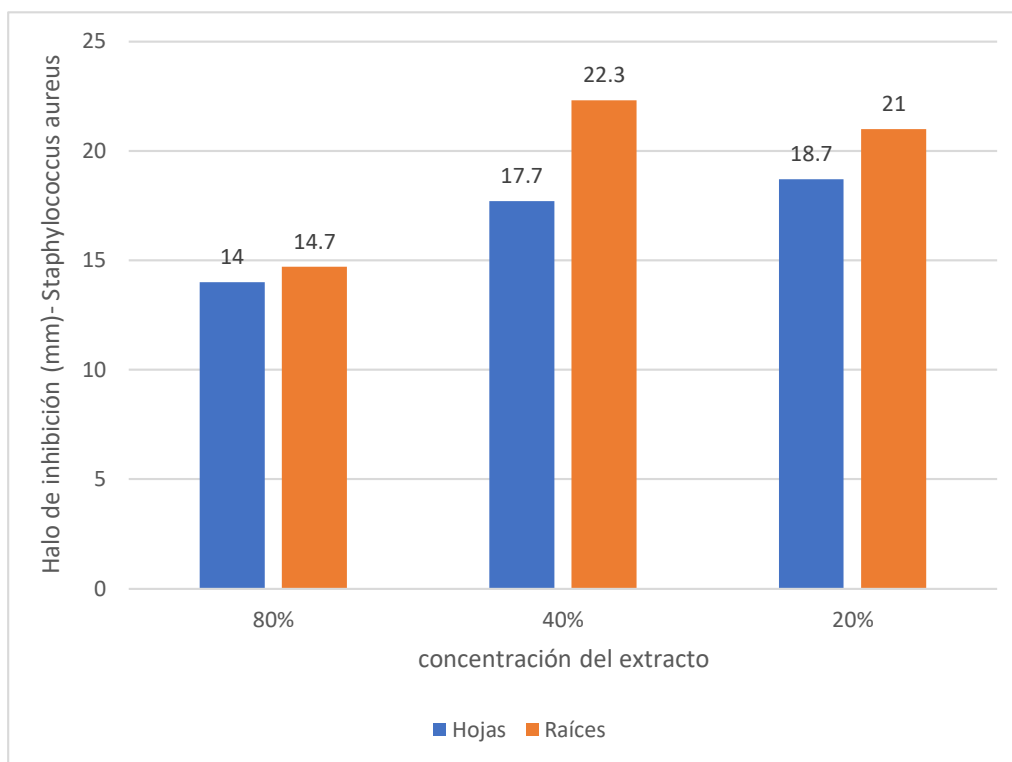


Figura 10: Comparación de halos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* entre extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major*.

Se observó que el mayor halo de inhibición lo presentó el extracto de raíces al 40 % (22,3 mm), el cual fue significativamente mayor que la mayoría de los tratamientos; sin embargo, no mostró diferencia significativa frente a las raíces al 20 % (21,0 mm). Por tanto, no se pudo afirmar estadísticamente que el extracto de raíces al 40 % fuera superior a al extracto de raíces al 20 % frente a *Staphylococcus aureus*.

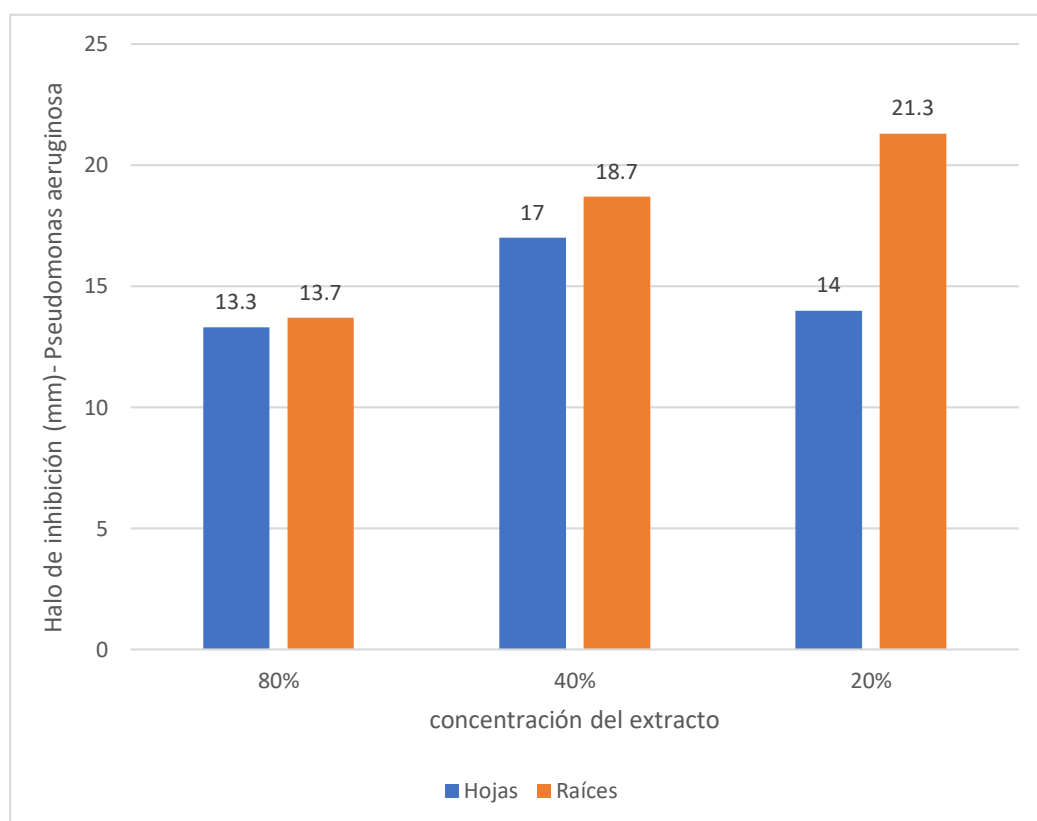


Figura 11: Comparación de halos de inhibición frente a *Pseudomonas aeruginosa* entre extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major*.

Se observó que el mayor halo de inhibición lo presentó el extracto de raíces al 20 % (21,3 mm), el cual fue significativamente mayor que la mayoría de los tratamientos; sin embargo, no mostró diferencia significativa frente a las raíces al 40 % (18,7 mm). Por tanto, no se pudo afirmar estadísticamente que el extracto de raíces al 20 % fuera superior a al extracto de raíces al 40 % frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

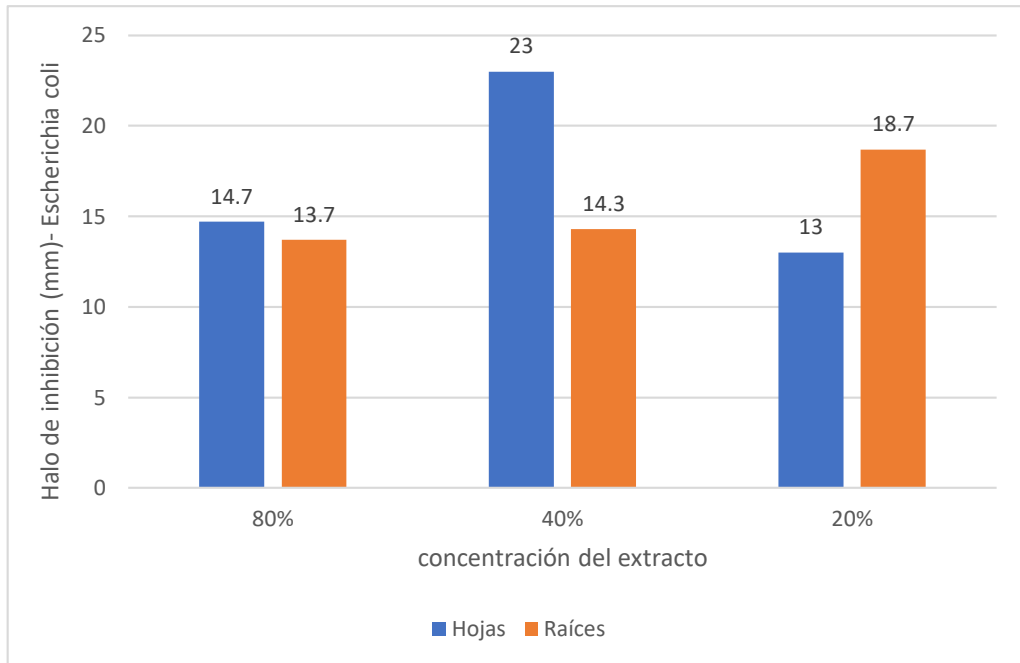


Figura 12: Comparación de halos de inhibición frente a *Escherichia coli* entre extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major*.

Se observó que el mayor halo de inhibición lo presentó el extracto etanólico de hojas al 40% (23,0 mm), el cual fue significativamente superior a los demás tratamientos evaluados frente a *Escherichia coli*. Estos resultados indicaron que, en las condiciones del ensayo, el extracto de hojas al 40% mostró la mayor eficacia antibacteriana contra *Escherichia coli*.

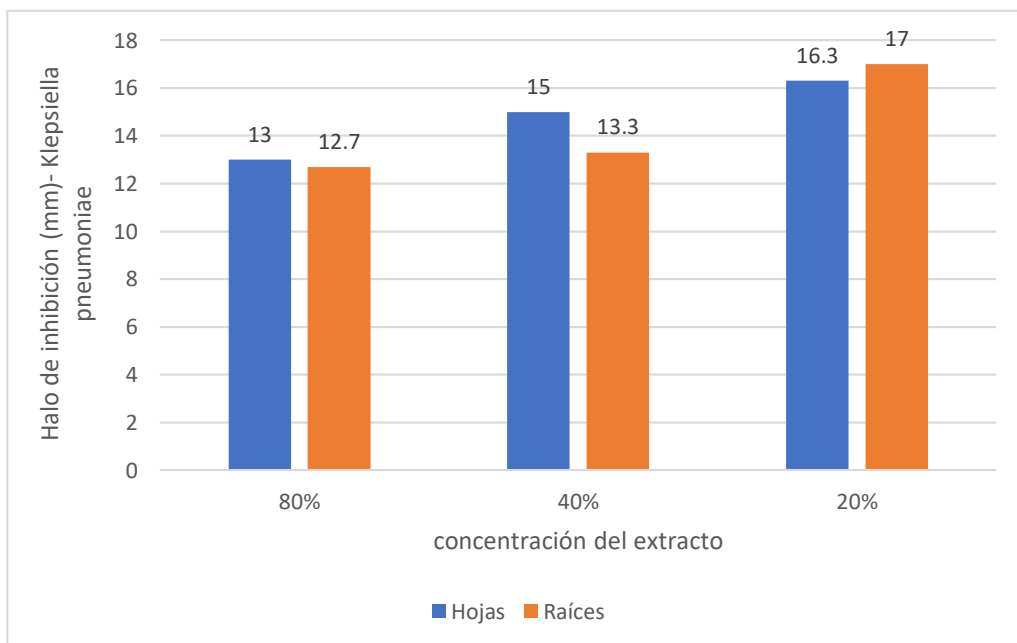


Figura 13: Comparación de halos de inhibición frente a *Klebsiella pneumoniae* entre extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major*.

Se observó que el mayor halo de inhibición lo presentó el extracto de raíces al 20 % (17 mm), el cual fue significativamente mayor que la mayoría de los tratamientos; sin embargo, no mostró diferencia significativa frente a las hojas al 20 % (16,3 mm) hojas al 40% (15 mm). Por tanto, no se pudo afirmar estadísticamente que el extracto de raíces al 20 % fuera superior a los extractos de hojas al 20 % y 40 % frente a *Klepsiella pneumoniae*.

IV. DISCUSIÓN

El presente estudio evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major* obtenidos de zonas rurales de Ica frente a cinco cepas patógenas de relevancia clínica, todas caracterizadas por su elevada resistencia antimicrobiana. Los resultados evidenciaron que ambos extractos presentaron actividad significativa contra todas las cepas evaluadas; sin embargo, la inhibición no superó la del antimicrobiano de referencia.

En la comparación interna, se observó que, en la mayoría de los casos, las concentraciones más bajas (20–40 %) generaron halos de inhibición mayores que la concentración más alta (80 %). Este comportamiento difirió de lo reportado por otros autores, quienes señalaron un aumento progresivo del halo a mayor concentración. La diferencia podría atribuirse a que, a concentraciones elevadas, el extracto presenta mayor viscosidad, dificultando su difusión en el medio de cultivo. **Ramírez (2022)**, quien empleó propilenglicol como vehículo para mejorar la difusión del extracto, obteniendo halos comparables a los de estudios sin vehículo. Asimismo, se registró que el extracto de raíces presentó mayor eficacia que el de hojas en la mayoría de las cepas evaluadas, lo que podría relacionarse con diferencias en la concentración y diversidad de metabolitos secundarios.

En *Candida albicans*, **Gálvez et al. (2021)**, reportaron halos de inhibición moderados (12,6–14,6 mm) con extractos al 50–100 %, inferiores a los observados con nistatina. En contraste, en este estudio, el extracto de raíces al 40 % alcanzó un halo de 21,7 mm, diferencia que podría atribuirse a variaciones metodológicas o a la cepa utilizada. En *Staphylococcus aureus*, los resultados coincidieron parcialmente con los de **Akkuş et al. (2021)**, quienes indicaron alta actividad de los extractos etanólicos y metanólicos de hojas, con un halo de 14,64 mm a una concentración de 2 mg/mL, mientras que en este estudio se obtuvo 22,3 mm con el extracto de raíces al 40 %. Frente a *Escherichia coli*, el extracto de hojas al 40 % produjo un halo de 23,0 mm, superior a los ~17,7 mm reportados por **Aguilar (2020)**, con extractos al 75 % de las hojas. Por su parte, **Rahamouz-Haghighi y Sharafi (2025)**, reportaron que el extracto de raíz a 100 mg/mL mostró un halo de 18 mm frente a *Salmonella paratyphi*, lo que coincidió con los resultados de este estudio, donde el extracto de raíz al 20 % presentó halos de 21,3 mm frente a *Pseudomonas aeruginosa*, 18,7 mm frente a *E. coli* y 17,0 mm frente a *Klebsiella pneumoniae*. Estos hallazgos confirmaron que la actividad antimicrobiana de los extractos dependió de la parte vegetal, la concentración, la cepa microbiana y posibles diferencias metodológicas entre estudios (pozo vs disco).

Respecto a la concentración mínima inhibitoria (CMI), la mayoría de las cepas presentó un valor de 50 mg/mL para ambos extractos, excepto *E. coli*, que mostró una CMI de 25 mg/mL con

extracto de raíces, lo que evidencia mayor sensibilidad. Este hallazgo concuerda parcialmente con **Akkuş et al. (2021)**, quienes obtuvieron CMI más bajas (4 mg/mL para *E. coli* y 2 mg/mL para *S. aureus* y *P. aeruginosa*), y difiere de lo reportado por **Pensantes et al. (2020)**, quienes hallaron CMI de 500 mg/mL para bacterias Gram negativas. Estas diferencias podrían atribuirse a variaciones metodológicas, a la edad de la planta o al periodo de recolección de la planta, ya que, según **Ramírez (2022)**, quien trabajó con *Plantago tomentosa* Lam., la estacionalidad influyó de forma notable en el rendimiento de los extractos: en invierno, la parte aérea presentó un 6,7 % y las raíces un 5,3 %, mientras que en primavera la parte aérea disminuyó a 1,8 % y las raíces alcanzaron un 5,6 %. Estos datos evidenciaron una mayor variabilidad en la parte aérea que en la raíz, lo que podría explicar, al menos en parte, las diferencias en la actividad antimicrobiana observadas entre estudios realizados en distintas épocas de recolección y con diferentes especies del mismo género. En el presente estudio, la recolección se efectuó durante la temporada de finales de otoño e inicios de invierno, lo que, de acuerdo con lo mencionado anteriormente, podría haber favorecido un mayor rendimiento y una mayor concentración de metabolitos activos, especialmente en una parte de la planta.

La identificación fitoquímica reveló metabolitos como taninos, flavonoides, saponinas, compuestos fenólicos, alcaloides y aminoácidos, coincidiendo con lo reportado por **Tello (2020)** y **Ramírez (2022)** en otra especie del género *Plantago* (*Plantago tomentosa* Lam). Estos compuestos, ampliamente documentados por su acción antimicrobiana, podrían explicar los resultados obtenidos. Sin embargo, la falta de un análisis cuantitativo impide establecer con precisión la relación entre la cantidad de metabolitos y la actividad antimicrobiana observada.

Entre las limitaciones del estudio se destaca la escasa difusión del extracto a altas concentraciones, la ausencia de un perfil fitoquímico cuantitativo y la limitada información científica sobre la actividad antimicrobiana de las raíces de *P. major*, lo que dificulta comparaciones directas. Esta última limitación podría estar asociada a la dificultad para recolectar suficiente biomasa radicular, dado el reducido tamaño de las raíces en esta especie.

En conjunto, los resultados respaldaron el potencial antimicrobiano de *P. major*, influenciado por la parte vegetal utilizada, tiempo de recolección, la concentración del extracto y el tipo de microorganismo, y sugieren que podría ser considerada como fuente de compuestos bioactivos con aplicaciones terapéuticas potenciales.

V. CONCLUSIONES

1. La identificación fitoquímica de los extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major* recolectados en zonas rurales de Ica evidenció la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides, taninos, saponinas, triterpenos, quinonas, azúcares reductores y aminoácidos, con una mayor intensidad de compuestos fenólicos, taninos y saponinas en las hojas, y una ligera mayor concentración de flavonoides, quinonas y azúcares reductores en las raíces, lo que le brinda su propiedad antimicrobiana.
2. La concentración de extracto que presentó la mayor actividad inhibitoria relativa (PIR) *in vitro* varió según el microorganismo y la parte vegetal evaluada. En la mayoría de los casos, el extracto del 20 % mostró un PIR superior a los extractos del 40 % y 80 %, con valores máximos de PIR: 71,9 % para *E. coli* (hojas al 20 %), 68,7 % para *P. aeruginosa* (raíces al 20 %) y 66,1 % para *K. pneumoniae* (raíces al 20 %); sin embargo, ninguno de estos tratamientos mostró diferencias significativas frente al antimicrobiano de referencia.
3. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue de 50 mg/mL para la mayoría de las cepas en ambos extractos, excepto para *E. coli*, que presentó una CMI de 25 mg/mL con extracto de raíces, evidenciando una mayor sensibilidad.
4. En el análisis comparativo de la actividad antimicrobiana, el extracto etanólico de raíces de *P. major* mostró mayor eficacia frente a *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* a una concentración del 20 %, y frente a *S. aureus* y *C. albicans* al 40 %. Por su parte, el extracto de hojas presentó su efecto más notable frente a *E. coli* al 40 %. Entre las concentraciones evaluadas, no se observaron diferencias significativas en la mayoría de los casos, excepto para el extracto de hojas al 40 % frente a *E. coli*, que mostró un incremento estadísticamente significativo en comparación con las demás concentraciones. Estos hallazgos sugieren que la eficacia antimicrobiana de los extractos de *P. major* depende de manera integrada de la parte de la planta utilizada, la concentración del extracto, el periodo de recolección y la especie microbiana evaluada.

VI. RECOMENDACIONES

1. Ampliar el estudio a cepas multirresistentes, replicar el ensayo frente a bacterias aisladas de pacientes con infecciones nosocomiales, a fin de evaluar el potencial del extracto frente a patógenos con perfiles de resistencia más exigentes.
2. Realizar un análisis fitoquímico de hojas y raíces de *Plantago major* en diferentes estadios fenológicos (juvenil, adulto y senescente), recolectadas en distintas estaciones del año, con el fin de determinar las concentraciones exactas de los metabolitos secundarios responsables de la actividad antimicrobiana y evaluar la influencia de la estacionalidad y del estadio de desarrollo de la planta en el rendimiento y la eficacia.
3. Evaluar el uso de vehículos o adyuvantes (por ejemplo, propilenglicol) que mejoren la difusión de los extractos en medios sólidos, especialmente en concentraciones elevadas.
4. Elaborar fitofármacos y productos naturales a partir de los extractos de *P. major*, considerando que, en la mayoría de los casos, el extracto de raíces mostró mayor eficacia antimicrobiana frente a las cepas evaluadas. No obstante, frente a *Candida albicans*, el extracto de hojas resultó más efectivo, por lo que ambas partes de la planta podrían evaluarse para desarrollos específicos. Se sugiere su incorporación en formulaciones tópicas o desinfectantes de origen vegetal, priorizando estudios de estabilidad, toxicidad y compatibilidad, con el fin de garantizar la seguridad y eficacia de los productos derivados.

VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance [Internet]. Geneva: WHO; 2014 [citado el 23 de julio de 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241564748>
2. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. P T [Internet]. 2015 [citado 23 de julio de 2025];40(4):277-83. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378521/>
3. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2007 [citado 23 de julio de 2025];20(1):133-63. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1797637/>
4. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. Lancet Infect Dis [Internet]. 2013 [citado 23 de julio de 2025];13(12):1057–98. Disponible en: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(13\)70318-9/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(13)70318-9/fulltext)
5. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. J Nat Prod [Internet]. 2007 [citado 23 de julio de 2025];70(3):461-77. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/np068054v>
6. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev [Internet]. 1999 [citado 23 de julio de 2025];12(4):564-82. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88925/>
7. World Health Organization. WHO traditional medicine strategy: 2014-2023 [Internet]. Ginebra: OMS; 2013 [citado 23 de julio 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241506090>
8. Samuelsen AB. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. J Ethnopharmacol [Internet]. 2000 [citado 23 de julio de 2025];71(1-2):1-21. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00212-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00212-9)
9. Morales R, Bravo L, Araya H. Estudio fitoquímico y actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Plantago major*. Rev Peru Biol [Internet]. 2017 [citado 23 de julio de 2025];24(1):43-8. Disponible en: <https://revistas.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/article/view/13388>
10. Zubair M, Nybom H, Lindholm C, Rumpunen K. Bioassay-guided isolation of antimicrobial compounds from *Plantago major*. Phytother Res [Internet]. 2011 [citado 23 de julio de 2025];25(9):1336-41. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/ptr.3430>
11. Chelladurai M, Chinnachamy C. Phytochemical and antimicrobial studies of *Plantago major* root extract. Int J Pharm Sci Res [Internet]. 2014 [citado 23 de julio de

- 2025];5(6):2413-18. Disponible en: <https://ijpsr.com/bft-article/phytochemical-and-antimicrobial-studies-of-plantago-major-root-extract/>
12. World Health Organization. Antimicrobial resistance [Internet]. Geneva: WHO; 2020 [citado 25 de julio de 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
13. Shanson DC. *Microbiology in Clinical Practice*. 3rd ed. Oxford: Butterworth-Heinemann; 1999.
14. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis [Internet] 2016 the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. [citado 25 de julio de 2025]. 62(4):e1–e50. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/cid/civ933>
15. Sweetman SC, editor. *Martindale: The Complete Drug Reference*. 38th ed. London: Pharmaceutical Press; 2014.
16. Madigan MT, Bender KS, Buckley DH, Sattley WM, Stahl DA. *Brock: Biología de los microorganismos*. 15ª ed. Madrid: Pearson Educación; 2019.
17. Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2017 [citado 25 de julio de 2025];7:39. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2017.00039/full>
18. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30th ed. CLSI Supplement M100. [Internet] Wayne: CLSI; 2020. [citado 25 de julio de 2025]. Disponible en: <https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf>
19. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 1998 [citado 25 de julio de 2025];11(4):589-603. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88898/>
20. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2004 [citado 25 de julio de 2025];2(2):123-40. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrmicro818>
21. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* [Internet]. 2013 [citado 25 de julio de 2025];4(2):119-28. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/viru.22913>
22. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiología*. 12.ª ed. Madrid: Pearson Educación; 2013.
23. Lorenzo D, Dellacassa E. *Productos naturales y fitofármacos*. Montevideo: Universidad de la República; 2014.

24. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023 [Internet]. Ginebra: OMS; 2013 [citado 25 de julio de 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241506096>
25. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review [Internet]. *J Pharm Anal.* 2016. [citado 25 de julio de 2025]. 6(2):71-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
26. Rios JL, Recio MC, Villar A. Método modificado de pozos de agar [Internet]. Investigación en plantas de importancia médica. OmniaScience; [citado 27 de julio de 2025]. Disponible en: <https://www.omniascience.com/books/index.php/monographs/catalog/download/97/410/816-1?inline=1>
27. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard – Tenth edition (M07-A10)*. [Internet] Wayne, PA: CLSI; 2015. [citado 27 de julio de 2025]. Disponible en: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07>
28. EMA. Assessment report on *Plantago lanceolata* L., folium [Internet]. European Medicines Agency; 2014 [citado 27 de julio de 2025]. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-plantago-lanceolata-l-folium_en.pdf
29. Martínez M, Storniolo CE. *Plantago major* (llantén): composición química, propiedades medicinales y usos terapéuticos tradicionales. *Rev Fitomed.* [Internet] 2020 [citado 27 de julio de 2025]. 20(2):45-52 Disponible en: <https://www.antimicrobianos.com.ar>
30. Zhakipbekov K, Turgumbayeva A, Issayeva R, Kipchakbayeva A, Kadyrbayeva G, Tleubayeva M, et al. Antimicrobial and other biomedical properties of extracts from *Plantago major* (Plantaginaceae). *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023;16(8):1092. doi:10.3390/ph16081092.
31. Farid A, Sheibani M, Shojaii A, Noori M, Motevalian M. Evaluation of anti-inflammatory effects of leaf and seed extracts of *Plantago major* on acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *J Ethnopharmacol.* 2022 Nov 15;298:115595. doi: 10.1016/j.jep.2022.115595. Epub 2022 Aug 4. PMID: 35934192.
32. Younes N, Shokouh SH, Masoumeh K, Zohre F. *Plantago major* in Traditional Persian Medicine and modern phytotherapy: a narrative review [Internet]. USA: PMC (PubMedCentral) 2012 [citado 27 de julio de 2025]. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5878035/>

33. GlobinMed Editorial Team. *Plantago major* – Monograph [Internet]. GlobinMed: 2021 [citado 27 de julio de 2025]. Disponible en: https://globinmed.com/medicinal_herbs/plantago-major-83285/
34. Türel I, Özbek H, Erten R, Öner AC, Cengiz N, Yilmaz O. Hepatoprotective and anti-inflammatory activities of *Plantago major* L. *Indian J Pharmacol* [Internet]. 2009 [citado 27 de julio de 2025]. 41(2):120-3 Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20442819/>
35. Domínguez XA. Métodos de investigación fitoquímica. 2.^a ed. México: Limusa; 1973.
36. Harborne JB. Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. [Internet] London: Chapman & Hall; 1998 [citado 27 de julio de 2025]. Disponible en: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-94-009-5570-7>
37. Evans WC. Trease and Evans' Pharmacognosy. 16th ed. Edinburgh, Scotland: Saunders Elsevier; [Internet] 2009 [citado 27 de julio de 2025]. Disponible en: <https://archive.org/details/TreaseAndEvansPharmacognosy16thEd>.
38. Sofowora A. Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa. Ibadan, Nigeria: Spectrum Books Ltd; [Internet] 1993 [citado 27 de julio de 2025]. Disponible en: <https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=1853514>
39. Rahamouz-Haghighi S, Sharafi A. Separation of crude methanol extract of *Plantago major* root: identification of phytochemicals and assessment of biological activities. [Internet] Nat Prod Res. 2025 May [citado 27 de julio de 2025]. 39(9): Disponible en: <https://doi.org/10.1080/14786419.2024.2326993>
40. Ramirez LI. Caracterización Fitoquímica y Antimicrobiana del Llantén en Corrientes-Argentina [Tesis doctoral]. Argentina: Universidad Nacional del Nordeste; 2022 [Internet]. repositorio.unne. [citado 15 de noviembre de 2024]. Disponible en: https://repositorio.unne.edu.ar/bitstream/handle/123456789/53058/RIUNNE_FODO_TD_Ramirez_LI.pdf?sequence=5
41. Akkuş M, Hiz-Çiçekliyurt M. Antimicrobial activity of *Plantago major* L. extracts prepared with different solvents. *Asian Journal of Immunology* [Internet]. 2021;5(1):1–9 [citado 15 de noviembre de 2024]. Disponible en: <https://journalaji.com/index.php/AJI/article/view/57>
42. Pensantes SJ, Calla RD, Requena MF, Alvino MA, Millones PA. Chemical Composition and Antibacterial Effect of *Plantago Major* Extract on Periodontal Pathogens. SciELO [Internet]. 2020 [citado 15 de noviembre de 2024]. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/pboci/a/Z3JdmH9bbtrN66LQmV4mrwM/?lang=en&format=pdf>

43. Gálvez YS y Zeña JE. Actividad antimicótica del extracto etanólico de *Plantago major* “llantén” comparado con nistatina frente a *Candida albicans* – Chiclayo, 2021. [Tesis de pregrado]. Perú – Chiclayo: Universidad Roosevelt; 2021 [Internet]. Repositorio uroosevelt. [citado 15 de noviembre de 2024]. Disponible en: <https://repositorio.uroosevelt.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14140/644/TESIS%20JOSE%20Y%20SOLEDAD.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
44. Tello AE. Efecto Antibacteriano del extracto acuoso y etanolito de *Plantago major* (llantén) sobre el *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), in vitro Tacna 2020 [Tesis de pregrado]. Perú- Tacna: Universidad Privada de Tacna; 2020 [Internet]. repositorio upt. [citado 15 de noviembre de 2024]. Disponible en: <https://repositorio.upt.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12969/1524/Tello-Salgado-Antony.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
45. Aguilar LE. Efecto antibacteriano in vitro de extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* (ajo) y *Plantago major* (llantén) frente a cultivos de *Escherichia coli* [Tesis de pregrado]. Perú – Trujillo: Universidad Católica de los Ángeles Chimbote; 2020 [Internet]. Repositorio uladech. [citado 15 de noviembre de 2024]. Disponible en: https://repositorio.uladech.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13032/23794/ANTIBACTERIANO_HIDROALCOHOLICO_PEREDA_AGUILAR_LUIS_ENRIQUE.pdf?sequence=1&isAllowed=y
46. World Health Organization. *Antimicrobial resistance: global report on surveillance* [Internet]. Geneva: WHO; 2014 [citado el 25 de julio de 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241564748>
47. Samaniego G. Enfoque, tipo, diseño y método de investigación [Aclarando conceptos] [internet]. BibGuru. [citado 3 de noviembre del 2024]. Disponible en: <https://miasesordetesis.com/enfoque-tipo-diseno-metodo-de-investigacion/>
48. Nicomedes E. Tipos de investigación. CORE [internet] [citado el 3 de noviembre del 2024]. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/250080756.pdf>
49. Gallardo E, Córdova M. Metodología de la Investigación. 1^{ra} ed. Huancayo: Universidad Continental: © Universidad Continental. [Internet] 2017 [citado 3 de noviembre de 2024]. 53p. Disponible en: https://repositorio.continental.edu.pe/bitstream/20.500.12394/4278/1/DO_UC_EG_MAI_UC0584_2018.pdf
50. Hernández-Sampieri R, Fernández Collado C, Baptista Lucio PM. Metodología de la investigación: las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta [Internet]. 6^a ed. Madrid: McGraw-Hill; 2014 [citado 3 de noviembre de 2024]. Disponible en: <https://bellasartes.upn.edu.co/wp-content/uploads/2024/11/METODOLOGIA-DE-LA-INVESTIGACION-Sampieri-Mendoza-2018.pdf>

51. Miranda M, Cuéllar A. Farmacognosia y productos naturales. La Habana 2012.
52. Organización Panamericana de la Salud. Manual para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana: Serie de monografías científicas y técnicas N.º 44. Washington, D.C.: OPS [Internet] 2005. [citado 27 de julio de 2025]. 213p. Disponible en: <https://www.paho.org/sites/default/files/2021-03/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>

VIII. ANEXOS

8.1. Anexo 01: Certificación botánica

CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

“AÑO DEL BICENTENARIO, DE LA CONSOLIDACIÓN DE NUESTRA
INDEPENDENCIA, Y DE LA CONMEMORACIÓN DE LAS HEROICAS
BATALLAS DE JUNÍN Y AYACUCHO”

El Biólogo. Que, suscribe ha determinado que, la muestra biológica presentada por la egresada en Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional “San Luis Gonzaga” **HUAYCOCHEA LLANCARI, PAOLA CRISTINA** con DNI N°72130637, para su clasificación taxonómica, pertenece al nombre científico de *Plantago major* L. “llantén”, según Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist, (1988).

REINO: PLANTAE

DIVISIÓN: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

ORDEN: LAMIALES

FAMILIA: PLANTAGINACEAE

GÉNERO: *Plantago*

ESPECIE: . *Plantago major* L.

N.V. “llantén”

Se emite la presente certificación a solicitud del interesado para fines de estudio.

Ica, 04 de noviembre 2024


Dr. Miranda Huamán David Máximo
 BIÓLOGO
CBP. 3681

8.2. Anexo 02: Matriz de consistencia

| PROBLEMA | OBJETIVO | HIPÓTESIS | VARIABLES E INDICADORES | METODOLOGÍA |
|--|---|---|---|---|
| PROBLEMA GENERAL | OBJETIVO GENERAL | HIPÓTESIS GENERAL | Variable Independiente Los extractos etanólico de las hojas y raíces del <i>Plantago major</i> (llantén). | TIPO, ENFOQUE, NIVEL Y DISEÑO DE LA INVESTIGACION Enfoque de la investigación: Cuantitativo Tipo de investigación: Aplica Nivel de la investigación: Descriptivo Diseño de la investigación: Experimental POBLACIÓN Constituida por todos los individuos adultos de <i>Plantago major</i> (llantén) que crecieron de forma silvestre en zonas |
| ¿Cuál de las concentraciones de los extractos etanólicos de hojas y raíces de <i>Plantago major</i> presentará la mayor actividad antimicrobiana in vitro frente a cepas patógenas evaluadas en comparación con el antibimicrobiano de referencia y el control negativo? | Identificar la concentración de los extractos etanólicos de hojas y raíces de <i>Plantago major</i> que presentará la mayor actividad antimicrobiana in vitro frente a las cepas patógenas evaluadas, en comparación con un antimicrobiano de referencia y un control negativo. | Los extractos etanólicos de las hojas y raíces del <i>Plantago major</i> (llantén) presentaran efecto antimicrobiano in vitro frente a cepas patógenas evaluadas. | | |
| PROBLEMAS ESPECIFICOS | OBJETIVOS ESPECIFICOS | HIPÓTESIS ESPECÍFICAS | | |
| ¿Cuáles serán los metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos de las hojas y raíces del <i>Plantago major</i> (llantén) que crecen en zonas rurales de Ica, 2025? | Identificar los metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos de las hojas y raíces del <i>Plantago major</i> (llantén) que crecen en zonas rurales de Ica, 2025. | ----- | | |
| ¿Cuál de las concentraciones de los extractos etanólicos de hojas y raíces de <i>Plantago major</i> presentará el mayor Porcentaje inhibitorio relativo (PIR) in vitro frente a las | Identificar la concentración del extracto etanólico de hojas y raíces de <i>Plantago major</i> que presentará el mayor Porcentaje de Inhibición Relativa (PIR) in vitro frente a | Al menos una de las concentraciones con extracto etanólico de hojas y raíces de <i>Plantago major</i> presentará un mayor Porcentaje Inhibitorio | | |

| | | | | |
|---|---|--|---|---|
| <p>cepas patógenas evaluadas en comparación con el antimicrobiano de referencia y el control negativo?</p> | <p>cepas patógenas en comparación con el antimicrobiano de referencia y el control negativo.</p> | <p>Relativo (PIR) in vitro frente a las cepas patógenas evaluadas en comparación con el antimicrobiano de referencia y el control negativo.</p> | <p>Variable Dependiente</p> <p>Actividad antimicrobiana in vitro frente cepas patógenas.</p> | <p>rurales de la provincia de Chincha.</p> <p>MUESTRA</p> <p>Conformada por aproximadamente 385 individuos adultos de <i>Plantago major</i>, determinada mediante la fórmula de Cochran para poblaciones infinitas, con un nivel de confianza del 95 % y un margen de error del 5</p> <p>TÉCNICA DE RECOLECCION DE DATOS</p> <ul style="list-style-type: none"> - Observación - Medición de halos con una regla milimetrada. <p>INSTRUMENTOS</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hoja de recolección de datos. |
| <p>¿Qué diferencias existen en las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de los extractos etanólicos de hojas y raíces de <i>Plantago major</i> recolectados en zonas rurales de Ica en 2025, frente a las cepas patógenas evauadas?</p> | <p>Hallar las diferencias existentes de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de los extractos etanólicos de hojas y raíces de <i>Plantago major</i> recolectados en zonas rurales de Ica en 2025, frente a las cepas patógenas evaluadas.</p> | <p>Al menos una de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de los extractos etanólicos de hojas y raíces de <i>Plantago major</i> recolectados en zonas rurales de Ica en 2025, se diferencia de las demás, frente a las cepas patógenas evaluadas.</p> | | |
| <p>¿Cuál de las concentraciones de los extractos etanólicos de hojas o raíces del <i>Plantago major</i> (llantén) mostrará mayor efecto antimicrobiano frente a las cepas patógenas evaluadas?</p> | <p>Identificar la concentración de los extractos etanólicos de hojas o raíces del <i>Plantago major</i> (llantén) que mostrará mayor efecto antimicrobiano frente a las cepas patógenas.</p> | <p>Al menos una de las concentraciones de los extractos etanólicos de hojas o raíces del <i>Plantago major</i> (llantén) mostrará mayor efecto antimicrobiano frente a las cepas patógenas evaluadas.</p> | | |

8.5. Anexo 03: Hoja de recaudación de datos de la identificación fitoquímica de las hojas y raíces del *Plantago major*.

| Metabolitos secundarios | | Hojas | Raíces |
|--------------------------------|-------------|--------------|---------------|
| Flavonoides | | | |
| Compuestos fenólicos | | | |
| Alcaloides | Dragendorff | | |
| | Wagner | | |
| | Mayer | | |
| Taninos | | | |
| Saponinas | | | |
| Triterpenos | | | |
| Quinonas | | | |
| Azúcares reductores | | | |
| Aminoácidos | | | |

8.6. Anexo 04: Hoja de recaudación de datos de las características organolépticas de las hojas y raíces del *Plantago major*.

| Características organolépticas | Hojas | Raíces |
|---------------------------------------|--------------|---------------|
| Color | | |
| Olor | | |
| Aspecto | | |
| Sabor | | |

8.7. Anexo 05: Hoja de recaudación de datos de los halos de inhibición por triplicado de las hojas del *Plantago major*, control positivo (+) y control negativo (-) frente a cada cepa evaluada.

| MICROORGANISMOS | CONCENTRACIONES - HOJAS | | | C (+) | C (-) |
|-------------------------------|-------------------------|-----|-----|-------|-------|
| | 80% | 40% | 20% | | |
| <i>Candida albicans</i> | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

8.8. Anexo 06: Hoja de recaudación de datos de los halos de inhibición por triplicado de las raíces del *Plantago major*, control positivo (+) y control negativo (-) frente a cada cepa enfrentada.

| MICROORGANISMOS | CONCENTRACIONES - RAÍCES | | | C (+) | C (-) |
|-------------------------------|--------------------------|-----|-----|-------|-------|
| | 80% | 40% | 20% | | |
| <i>Candida albicans</i> | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

8.9. Anexo 7: Hoja de recolección de datos de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de las hojas de *Plantago major* frente a las cepas evaluadas.

| MICROORGANISMOS | CONCENTRACIONES - Hojas | | | | | | | | | |
|-------------------------------|-------------------------|-----|-----|-----|----|------|-------|--------|---------|----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| | 80% | 40% | 20% | 10% | 5% | 2,5% | 1,25% | 0,625% | 0,3125% | CN / SDB |
| <i>Candida albicans</i> | | | | | | | | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | | | | | | | | | | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | | | | | | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | | | | | | | | | | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | | | | | | | | | |

8.10. Anexo 8: Hoja de recolección de datos de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de las hojas de *Plantago major* frente a las cepas evaluadas.

| MICROORGANISMOS | CONCENTRACIONES - Hojas | | | | | | | | | |
|-------------------------------|-------------------------|-----|-----|-----|----|------|-------|--------|---------|----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| | 80% | 40% | 20% | 10% | 5% | 2,5% | 1,25% | 0,625% | 0,3125% | CN / SDB |
| <i>Candida albicans</i> | | | | | | | | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | | | | | | | | | | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | | | | | | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | | | | | | | | | | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | | | | | | | | | |

8.11. Anexo 11: Esquema fotográfico de la obtención de los extractos etanólicos de hojas y raíces de *Plantago major*.



Recolección de *Plantago major* de zonas rurales des distrito de Alto Laran.



Limpeza de las hojas de *Plantago major*.



Limpeza de las raíces de *Plantago major*.



Secado a temperatura ambiente de las hojas de *Plantago major*.



Secado en estufa de las raíces a menos de 45°C.



Molienda manual.



Maceración de las hojas y raíces de *Plantago major* con su debida rotulación.



Filtrado de las hojas y raíces con papel de filto Whatman.

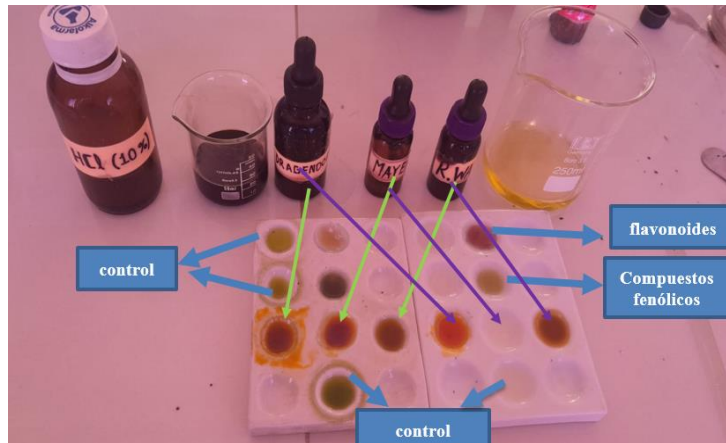


Evaporación del solvente de las hojas y raíces mediante baño maría.

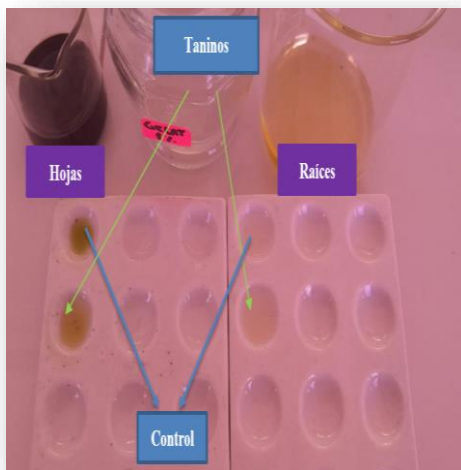


Evaporación del solvente mediante rotavapor.

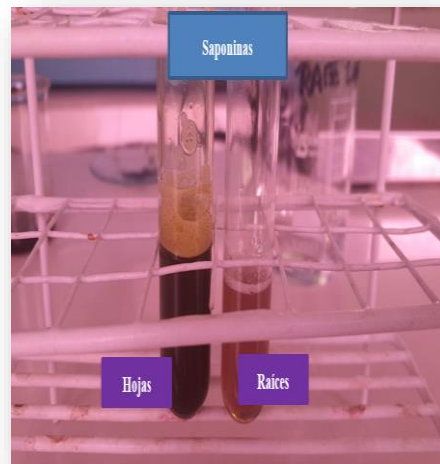
8.12. Anexo 12: Identificación fitoquímica de las hojas y raíces de *Plantago major*.



Identificación de flavonoides, compuestos fenólicos y alcaloides.



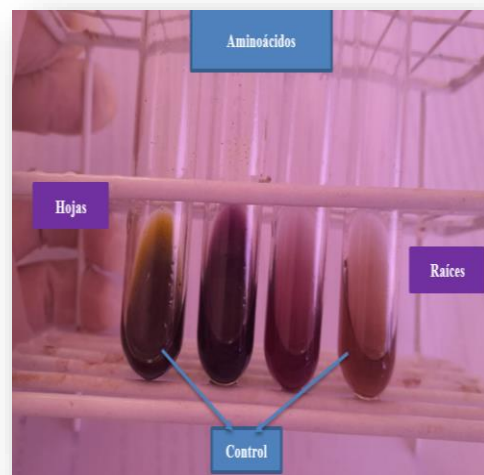
Identificación de taninos.



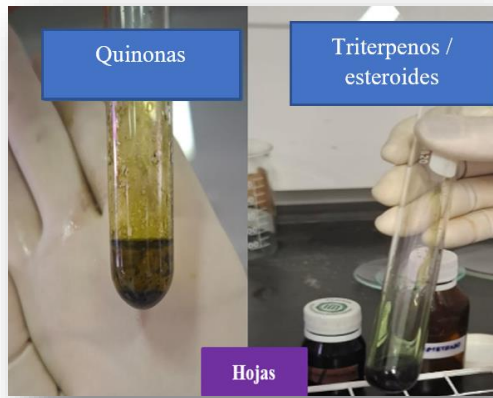
Identificación de saponinas



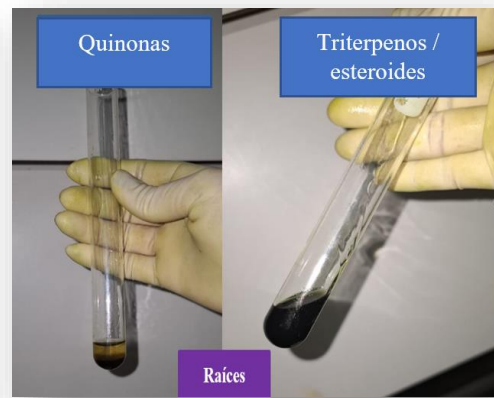
Identificación de azúcares reductores.



Identificación de aminoácidos.



Identificación de triterpenos y quinonas de las hojas.



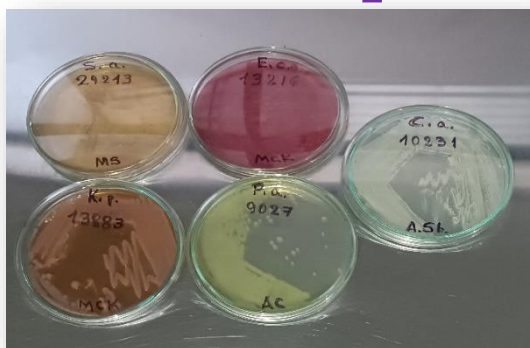
Identificación de triterpenos y quinonas de las raíces.

8.13. Anexo 13: Evolución organoléptica de las hojas y raíces de *Plantago major*.



Evaluación de olor y color de los extractos etanólicos.

8.14. Anexo 14: Reactivación de los microorganismos en sus medios de cultivo.

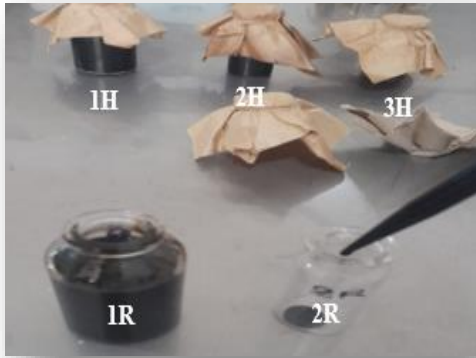


Sembrado de los microorganismos en su medio selectivo correspondiente.



Reactivación de los microorganismos en sus medios de

8.15. Anexo 15: Esquema fotográfico del método de difusión en agar.



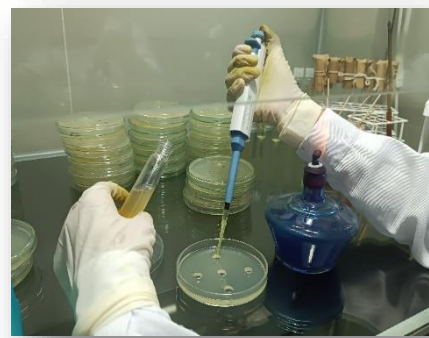
Preparación de las diferentes concentraciones de las hojas y raíces de *Plantago major*.



Sembrado de los microorganismos en placas Petri.



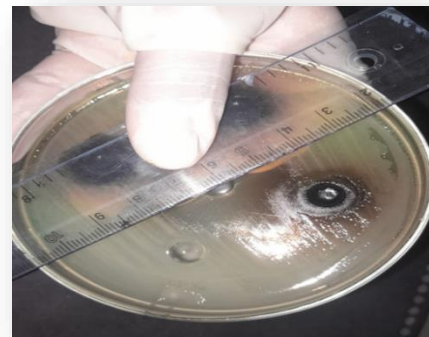
Rotulado de las placas Petri para la realización de los pozos.



Sellado de los pozos

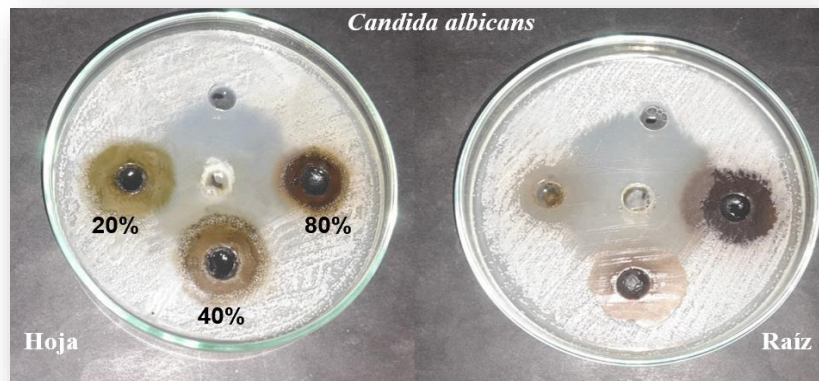


Llenado de los pozos con el extracto correspondiente.

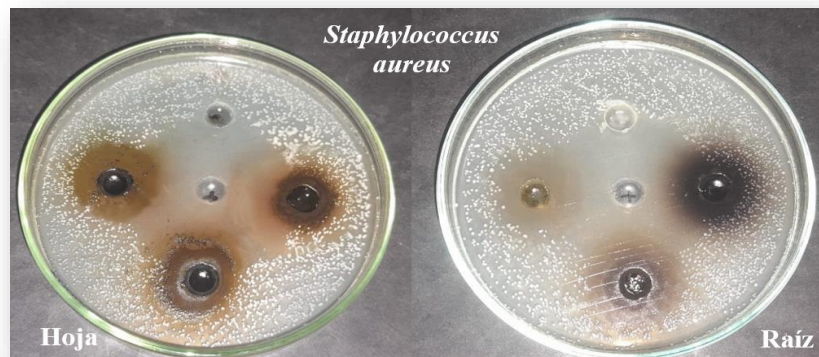


Medición de los halos de inhibición con la regla milimetrada.

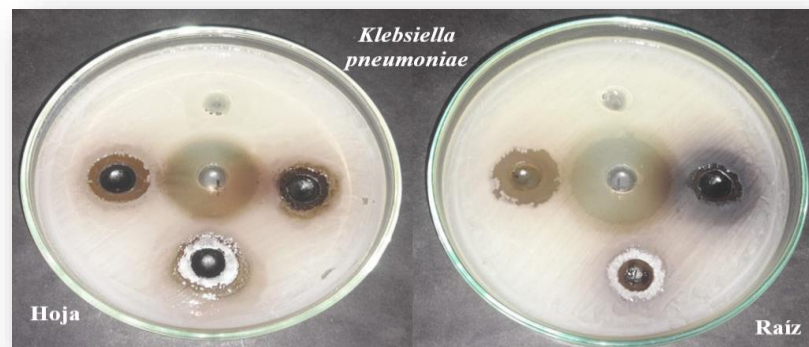
8.16. Anexo 16: Fotos de los halos de inhibición de los extractos etanólicos de las hojas y raíces de *Plantago major* a sus diferentes concentraciones, control positivo y negativo frente a las cepas evaluadas.



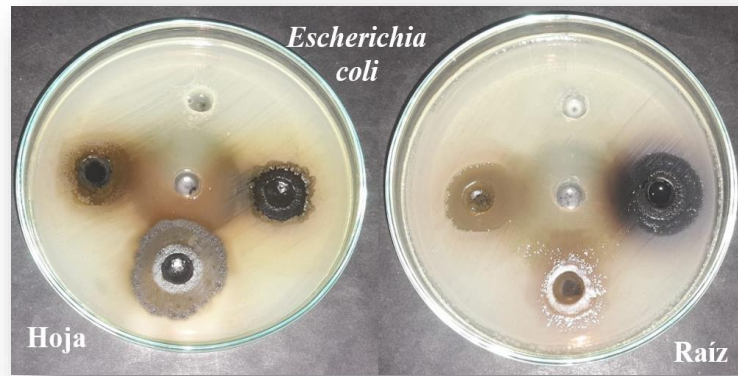
Halos inhibitorios de las hojas y raíces frente a *Candida albicans*.



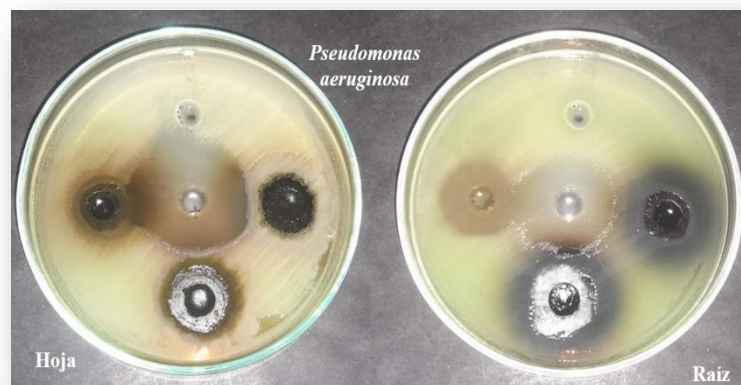
Halos inhibitorios de las hojas y raíces frente a *Staphylococcus aureus*.



Halos inhibitorios de las hojas y raíces frente a *Klebsiella pneumoniae*.



Halos inhibitorios de las hojas y raíces frente a *Escherichia coli*.



Halos inhibitorios de las hojas y raíces frente a *Pseudomonas aeruginosa*,

8.17. Anexo 17: Esquema fotográfico del método de dilución en caldo.



Colocación de 0,5 mL de caldo nutritivo en los tubos del número 2 al 10.



Dilución seriada del extracto etanólico al 80%.



Incorporación de 0,5 mL de la suspensión bacteriana a cada tubo.



Sellado de los tubos con torundas estériles.



Lectura de la Inhibición de las cepas (CMI).

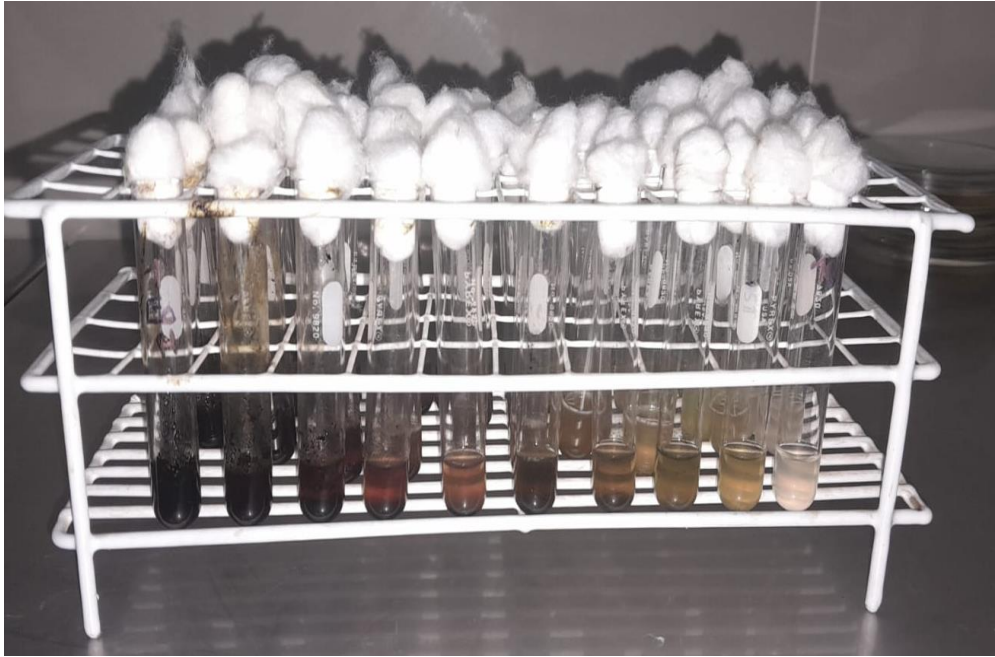


Incubación de los microorganismos a 37°C a 24h.

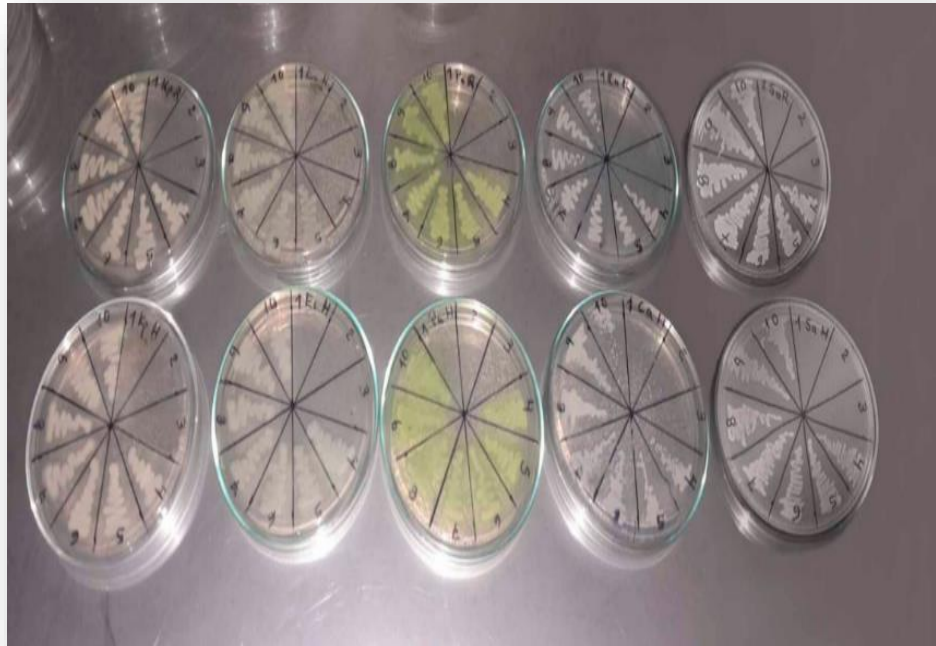


Siembra de los microorganismos en las placas Petri (CMB).

8.18. Anexo 18: Visualización la inhibición microbiana en tubos para hallar la CMI de cada extracto etanólico de hojas y raíces de *Plantago major* frente a las cepas evaluadas.



8.19. Anexo 19: Visualización del crecimiento microbiano en placas para hallar la CMB de cada extracto etanólico de hojas y raíces de *Plantago major* frente a las cepas evaluadas.



8.20. Anexo 20: Constancia de permiso de laboratorio



UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



CONSTANCIA

LA JEFA DE LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA.

HACE CONSTAR QUE LA ESTUDIANTE:

HUAYCOCHEA LLANCARI Paola Cristina

Código N.º 20172271

Se le autoriza el uso de las instalaciones del laboratorio para el desarrollo de su proyecto de tesis, el cual lleva como título: "Actividad antimicrobiana in vitro de los extractos etanólicos de hojas y raíces del *Plantago major* (llantén) que crecen en zonas rurales de Ica, 2025." para la obtención del Título Profesional. Asesorado por la Dra. Jessica Huarcaya Rojas los días viernes de 11 am a 1pm
Se expide la presente constancia para los fines pertinentes.

Ica, 4 de diciembre 2024