



"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

Teapa, Tabasco a 15 de octubre del 2020
Oficio N°: ITSS-DIBQ-301/2020
Asunto: El que se indica.

C. Perla Edith Hernández de la Cruz.

Pasante de la carrera de Ingeniería Bioquímica.
P r e s e n t e.

Por este medio le informo que de acuerdo a la modalidad de Titulación que ha seleccionado: Titulación Integral por la opción 09 Tesis Profesional, y en virtud de que la comisión revisora integrada por: M. en C. Carolina Vázquez Hernández, M. en C. Miriam Sánchez de Dios, M.I.P.A. Juan Carlos Aguilar Arpaiz, determinan que se cumple satisfactoriamente con las observaciones que en proceso de revisión se hizo a su trabajo recepcional titulado: **"Obtención de extractos etanólicos de *Eryngium foetidum* y determinación de actividad antioxidante *In vitro*"**. Esta usted autorizado (a) para reproducirlo y concluir los requisitos formales que establece el Lineamiento de Titulación de esta Institución.

Sin otro asunto que tratar, me despido de Usted con un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
Innovación Tecnológica y Superación por Siempre

Q.C.B. Jesús Armando Romero González
Jefe de División de Ingeniería Bioquímica ITSS



c.c.p. Archivo.





INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE LA REGIÓN SIERRA

**OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Eryngium foetidum* Y DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE *in vitro***

PARA OBTENER EL GRADO DE:
INGENIERÍA BIOQUÍMICA

MODALIDAD:

TESIS PROFESIONAL

(OPCION 1)

PRESENTA:

PERLA EDITH HERNÁNDEZ VILLARREAL

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. XARISS MIRYAM SÁNCHEZ CHINO

ASESOR DE TESIS:

M. EN C. CAROLINA VAZQUEZ HERNANDEZ



TEAPA, TABASCO

OCTUBRE 2020

Agradecimientos

Al Instituto Tecnológico Superior de la Región Sierra:

Por ser el lugar donde he adquirido y desarrollado mi formación académica y en donde me vio convertirme en un profesionalista.

A los catedráticos del ITSS:

Por sus experiencias y conocimientos impartidos en clases, los cuales son la base de mi formación como profesionalista, haciendo de mí una persona capaz de afrontar cualquier situación a nivel profesional. Al **M. en C. José Alfredo Jiménez Juárez, MIPA. Juan Carlos Aguilar Arpaíz, Ing. Job Altamirano, M. en C. Leticia Almeida López, M. en C. Miriam Sánchez de Dios, Ing. Paloma Vanessa Aguilar Tavera, Lic. Ángel Torres Torres, Mtro. José de Jesús Lenin Valencia Cruz.** Gracias por brindarme todos sus conocimientos a lo largo de todos estos años de estudio. Así mismo agradezco al laboratorista el **Ing. Job Altamirano** y a la técnica administrativa **Roxy Ruth Gómez Reyes** por todo el apoyo que nos brindaron cuando lo necesitábamos, a todos ellos gracias porque han sido parte de mi formación como profesionalista.

Al jefe de carrera **QFB. Jesús Armando Romero González** por sus grandes consejos, por alentarnos a no desanimarnos y seguir adelante a pesar de que todo esté en nuestra contra, luchar y no desmayar.

A la M. en C. Carolina Vázquez Hernández:

Por su apoyo, agradezco por todos los conocimientos impartidos a lo largo de la carrera.

A ECOSUR Unidad Villahermosa:

Por abrirme las puertas de su institución para realizar este trabajo y a los que me apoyaron, a la **Dra. Zandy Evelyn Olivo Vidal, Mtra. Lorena Reyes Sánchez,** al **Ing. Miguel de la Rosa Carrillo** y al **Ing. Roberto Solís** por su apoyo técnico

en la realización de este trabajo, su tiempo y sus conocimientos a lo largo de la realización de este proyecto.

A la Dra. Xariss Sánchez Chino:

Por su apoyo incondicional, y por la oportunidad de realizar la residencia profesional y tesis profesional a cargo de su dirección, por las facilidades necesarias para que se pudiera llevar a cabo este proyecto, por su paciencia y motivación, y por brindarme sus valiosos conocimientos académicos compartidos y disponibilidad de tiempo. ¡Gracias!

A todos aquellos que me dieron alguna palabra de aliento y apoyo moral, muchas gracias, ya que ahora sé que todo ha valido la pena.

Dedicatoria

A **Dios** porque ha estado en los momentos más difíciles y por ayudarme a no desmayar a pesar de la adversidad.

A mis **Padres Sr. Jesús Manuel Hernández Castillo** y a **Sra. Eneida Villarreal Rodríguez** por estar apoyándome en cada paso que he dado, gracias por todo y por ser el pilar fundamental de todo lo que soy.

A mis hermanas **Lic. Ana Cristhel Hernández Villarreal** y a **Sta. Heidi Elena Hernández Villarreal** por ser parte importante en mi vida y por apoyarme en cada una de las metas que me he propuesto.

A mis **Abuelas Sra. Tomasa Rodríguez Villarreal** y a **Sra. Magali Castillo Cruz** que a pesar que la primera ya no se encuentra más en este mundo, ellas me han dado la fuerza para seguir adelante y brindarme su apoyo en todo lo que me propuse.

Tabla de contenido

Agradecimientos	II
Dedicatoria.....	IV
Índice de figuras.....	VII
Índice de cuadros.....	VIII
Abreviaturas.....	IX
1. Resumen.....	10
1.1 Introducción	11
2. Planteamiento y justificación.....	12
3. Objetivos	13
3.1 Objetivo general	13
3.2 Objetivos específicos.....	13
4. Marco Teórico	14
4.1 <i>Eryngium foetidum</i> (Perejil ranchero)	14
4.2 Plantas medicinales.....	15
4.3 Preparación y administración de plantas medicinales	15
4.4 Los principios activos presentes en las plantas medicinales	18
4.5 Compuestos fenólicos	18
4.6 Síntesis de compuestos fenólicos en plantas	19
4.7 Extracción con disolventes	20
4.8 Actividad antioxidante y radical libres.....	21
4.9 Estrés oxidativo	22
4.10 Las enfermedades crónicas no transmisibles.....	24
5. Procedimientos y Descripción detallada de las actividades	25

5.1 Ubicación de la muestra	25
5.2 Metodología.....	26
5.2.1 Diagrama Experimental.....	27
5.2.2 Diagrama de flujo del proceso.....	28
5.2.3 Secado y acondicionamiento de las muestras.....	28
5.2.4 Obtención de extractos	29
5.2.5 Cuantificación de compuestos fenólicos.....	29
5.2.6 Determinación de la actividad antioxidante	30
5.3 Análisis estadístico	31
5.4 Cronograma de actividades.....	32
6. Resultados	33
6.1 Acondicionamiento de la planta.....	33
6.2 Cuantificación de compuestos fenólicos.....	33
6.3 Actividad antioxidante método DPPH.....	37
7. Conclusión	40
9. Recomendaciones	41
10. Bibliografía	42
11. Anexos.....	46
11.1 Anexo 1. Preparación de reactivos.....	46
11.2 Anexo 2. Análisis estadístico.....	50
11.3 Anexo 3. Tabla de datos de compuestos fenólicos y actividad antioxidante.....	53

Índice de figuras

Figura 1. Estructura de <i>Eryngium foetidum</i>	14
Figura 2. Estructura química de algunos compuestos fenólicos.	18
Figura 3. Ruta de ácido Shikímico.	20
Figura 4. Daño oxidativo en el organismo debido al estrés oxidativo.....	23
Figura 5. Sitios de recolección de las muestras <i>E. foetidum</i>	25
Figura 6. Diagrama experimental.	27
Figura 7. Diagrama de flujo de proceso.	28
Figura 8. Reacción entre el ácido gálico y el reactivo de FC.	30
Figura 9. Reacción de decoloración del radical DPPH.....	31
Figura 10. Cronograma de actividades.	32
Figura 11. Curva tipo de ácido gálico para cuantificar compuestos fenólicos totales.....	34
Figura 12. Concentración de compuestos fenólicos totales.	35
Figura 13. Actividad antioxidante por el método DPPH (2,2-Difeni-1- picrilhidrazilo).	37
Figura 14. Preparación de los extractos a diferentes concentraciones.	46
Figura 15. Preparación del radical DPPH (2,2-Difeni-1-picrilhidrazilo).....	46
Figura 16. Reactivo DPPH.	47
Figura 17. Preparación de la solución de ácido gálico.	47
Figura 18. Preparación de las muestras para leer en el espectro.	48
Figura 19. Lectura en el espectrofotómetro UV-1800.	49

Índice de cuadros

Cuadro 1. Preparación y administración de las plantas medicinales de las plantas.....	16
Cuadro 2. Descripción de las características del lugar y de las condiciones de las muestras de <i>E. foetidum</i> , adquiridas para el experimento.....	26
Cuadro 3. Porcentaje de sólidos del <i>E. Foetidum</i>	33
Cuadro 4. Concentración de compuestos fenólicos totales (mg eq de ácido gálico/ g de planta) de <i>E. foetidum</i> extraídas con diferentes concentraciones de etanol.....	36
Cuadro 5. Preparación de la muestra a diferentes concentraciones.....	48
Cuadro 6. Análisis de varianza para repetición - suma de cuadrados tipo III...	50
Cuadro 7. Tabla de medias por mínimos cuadrados para repetición con intervalos de confianza del 95.0 %.....	51
Cuadro 8. Pruebas de múltiples rangos para repetición por disolvente %.....	52
Cuadro 9. Actividad antioxidante método DPPH.....	53
Cuadro 10. Actividad antioxidante Método DPPH.....	53

Abreviaturas

µg	Microgramo
µL	Microlitro
Cu	Cobre
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
ECNT	Enfermedades crónicas no transmisibles
ECOSUR	El Colegio de la Frontera Sur
EO	Estrés oxidativo
ERNS	Especies reactivas de nitrógeno
EROS	Especies reactivas de oxígeno
Fe	Hierro
IAT	Ignacio Allende, Tabasco
LANIES	Laboratorio Nacional de Innovación Ecotecnológica para la Sustentabilidad
LAT	Los Azufres, Tabasco
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LGC	La Gloria, Chiapas
LGT	Rancho “La Guadalupe”, Tabasco
M	Muestra
mL	Mililitro
MMC	Mercado municipal, Chiapas
Mn	Magnesio
nm	Nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
RL	Radicales libres
Se	Selenio

1. Resumen

El *Eryngium foetidum* (perejil de rancho) es una hierba que se utiliza principalmente como especia, además de tener usos medicinales para tratar algunas enfermedades y síntomas como fiebres, por lo tanto es una de las plantas de interés en la búsqueda de compuestos bioactivos de origen natural. Por ello nuestro objetivo fue cuantificar los compuestos fenólicos en extractos de esta planta e identificar si tenían potencial como agentes antioxidantes.

Para esto se obtuvieron extractos etanólicos y acuosos, posteriormente se determinó de actividad antioxidante *in vitro* del *E. foetidum*. Para la evaluación de la actividad antioxidante se utilizó el extracto etanólicos en concentraciones de 100 %, 80 %, 50 % y 0% (solo agua), en las diferentes partes de la planta (hoja, tallo y raíz). La mayor concentración de compuestos fenólicos se obtuvo en las hojas, específicamente en los extractos con etanol al 80 % seguidos por los extractos con etanol al 50%, por ello se seleccionaron estos dos extractos para la evaluación de la actividad antioxidante.

En las hojas se encontró mayor actividad antioxidante, aunque tallo y raíz se encontraron también, pero en menores concentraciones respecto a la hoja.

Por lo tanto, el *E. foetidum* es una planta que contiene actividad antioxidante que brinda beneficios para la salud de aquellos que la consuman.

1.1 Introducción

El perejil de rancho o ranchero (*Eryngium foetidum*) ha sido utilizado de manera empírica para tratar algunas enfermedades y síntomas como fiebres, escalofríos, vómitos, quemaduras, hipertensión, dolor de cabeza, oído, estómago, asma, artritis, mordeduras de serpientes, picaduras de escorpión, diarrea, malaria y epilepsia entre otras. Se considera un alimento saludable debido a su aporte de calcio, hierro, caroteno, riboflavina, proteínas y vitaminas A, B y C (Aly, 2010).

Su principal uso es como condimento alimentos en la cocina tradicional, uno de los mayores atributos de este tipo de hojas es el aroma, la cual es una característica sensorial generada por el contenido de compuestos volátiles (Fan & Sokorai, 2002).

El objetivo de esta investigación fue obtener extractos: acuoso, hidroalcohólicos y alcohólicos de hojas, tallos y raíces de *E. foetidum* cuantificar sus compuestos fenólicos y determinar su actividad antioxidante *in vitro* por medio del método de captación de radicales de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).

Este proyecto está insertado en la línea de investigación alimentos tradicionales y nutrigenómica cuyos objetivos principales son crear evidencia científica sobre los efectos del consumo de alimentos tradicionales de la frontera sur del país en la salud y su impacto en el desarrollo y prevención de enfermedades crónicas relacionadas con el metabolismo e identificar y analizar el efecto de sus compuestos bioactivos y determinar su potencial terapéutico.

2. Planteamiento y justificación

El uso plantas medicinales es conocido desde la antigüedad, sin embargo, han sido desplazadas por productos farmacéuticos, debido en parte que al contener mayor concentración de los principios activos su efecto es mayor, no obstante, la mayoría confiere efectos adversos, por lo que la población está buscando nuevamente remedios naturales que sean inocuos. Debido a la gran diversidad de plantas y sus metabolitos es necesario estudiar tanto las moléculas bioactivas, las preparaciones y la dosis más efectiva. Existe un creciente interés en la búsqueda de antioxidantes de origen natural, especialmente provenientes de plantas medicinales y/o alimenticias. En la mayoría de los casos, la actividad antioxidante de estas plantas se debe principalmente a la presencia de compuestos fenólicos.

La importancia de contar con compuestos antioxidantes, radica en que pueden ser útiles en el tratamiento y prevención de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) además de tener aplicaciones en la industria cosmética y alimenticia.

Las plantas constituyen una fuente natural de compuestos con actividad farmacológica. *E. foetidum* es una hierba que se utiliza comúnmente como condimento en los estados de Chiapas, Oaxaca, Tabasco y Veracruz, se puede encontrar creciendo en los huertos de traspatio por lo que es de fácil acceso a la población. Si bien se ha reportado su contenido de fitoquímicos con diferentes disolventes como hexano, acetona, cloroformo, estos resultan tóxicos y tienen un costo elevado. El uso de agua y etanol bebible para la obtención de extractos, hace que resulte más fácil a la población general beneficiarse de esta investigación. Por esta razón se dio a la tarea de estudiar la planta del *E. foetidum*, para identificar su contenido de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante como un preámbulo para identificar su potencial y aplicaciones terapéuticas.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Obtener extractos hoja, tallo y raíz de *E. foetidum* y determinar su actividad antioxidante *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

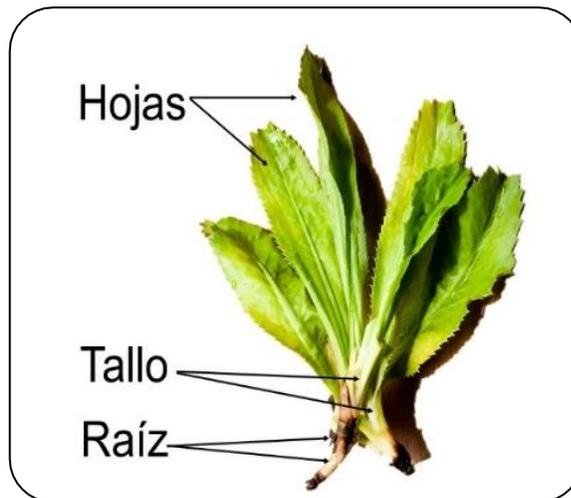
- Recolectar muestras de *E. foetidum* en diferentes lugares de la zona sierra de Teapa y comunidades cercanas del estado de Chiapas.
- Determinar la concentración de sólidos totales en hojas, tallo y raíz de *E. foetidum*.
- Obtener extractos de *E. foetidum* con agua, etanol y con mezclas agua-etanol a diferentes concentraciones.
- Cuantificar los compuestos fenólicos en los extractos obtenidos de las diferentes partes de *E. foetidum*.
- Determinar la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos de *E. foetidum*.

4. Marco Teórico

4.1 *Eryngium foetidum* (Perejil ranchero)

E. foetidum (Figura 1), es una hierba, que se utiliza en la cocina tradicional como especia y en algunos sitios tiene usos medicinales, se considera que es autóctona de las islas tropicales de América y el Caribe, desde el sur de México hasta Panamá a través de Brasil y desde Cuba hasta Trinidad (Adams, 1971). Se cultiva principalmente en África tropical, Asia meridional, las partes más cálidas del sur de Europa y las islas del Pacífico (Wong, et al., 1994).

Figura 1. Estructura de *Eryngium foetidum*.



Nota: Partes en las que está dividida. *E. Foetidum*, sus hojas de 3– 30 cm de largo y 1–5 cm de ancho, es una de las plantas más utilizadas en la comida tabasqueña.

La parte aérea de esta planta es una rica fuente de aceites esenciales en el que se han reportado los compuestos fenólicos 4-hidroxi-3,5-dimetil-acetofenona, 2-4-5-trimetil-benzaldehído y ácido 3-4-dimetil-benzoico, eryngial (E-2-dodecenal) este último es el principal constituyente de los compuestos volátiles de la planta (Paul et al., 2011), entre las propiedades farmacológicas que se le atribuyen a esta planta son la actividad antihelmíntica, antiinflamatoria, analgésica, anticonvulsiva, anticlastogénica, anticancerígena, antidiabética y antibacteriana (Lingaraju et al., 2016; Singh et al., 2014).

4.2 Plantas medicinales

La Organización Mundial de la Salud (OMS) (1978) la definió como planta medicinal a aquélla que en uno o más órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o son precursoras de fármacos sintéticos.

Según la OMS, (2019) los medicamentos herbarios abarcan las hierbas, material herbario, preparaciones herbarias y productos herbarios acabados, que contienen como principios activos partes de plantas u otros materiales vegetales, o combinaciones de esos elementos, y su uso está bien establecido y ampliamente reconocido como inocuo y eficaz. La práctica de la medicina herbaria se basa en el uso terapéutico de las plantas medicinales como sustitutas de las medicinas farmacéuticas o en combinación. De las plantas se usa sus extractos, las hojas, la raíz, las flores o la parte que se necesite para diversas formas de preparación, para mejorar el estado de salud (*White et al.*, 2004).

4.3 Preparación y administración de plantas medicinales

Las plantas medicinales se preparan y administran de diversas formas, la más frecuente es la infusión, así los principios activos se disuelven en agua mediante una cocción de 3 a 5 minutos (Zagrheca, 2013). En el Cuadro 1 se describe la forma de consumo de algunas plantas medicinales.

Cuadro 1. Preparación y administración de las plantas medicinales de las plantas.

Preparación	
Infusión	<p>Consiste en poner en contacto las partes de las plantas con agua hirviendo por unos minutos, dejando que se enfríe progresivamente.</p>  <p>(Adriana & Huidobro, 2013)¹</p>
Cataplasma y emplastos.	<p>Se preparan machacando la parte de la planta pretende usar, para preparar el emplasto se puede mezclar la parte de la planta logrando una pasta que se aplica sobre el área afectada.</p>  <p>(Pinterest, 2019)²</p>
Cocimiento.	<p>Se prepara hirviendo durante aproximadamente cinco minutos la planta y luego se filtra.</p>  <p>(Farmagnosia, 2019)³</p>
Gargarismo o enjuague	<p>Es la aplicación de un líquido a la cavidad bucal.</p>  <p>(Visnjican, 2015)⁴</p>
Jarabes	<p>Se preparan extrayendo con agua los componentes activos o medicinales de la planta y disolviendo luego en esta una gran cantidad de azúcar o miel como preservante.</p>  <p>(Biosardenya, 2017)⁵</p>
Jugos.	<p>Se obtienen al exprimir o licuar las plantas frescas o sus frutos.</p>  <p>(MedlinePlus, 2017)⁶</p>

¹Adriana, G. & Huidobro, Z., 2013. La utilidad de té e infusiones. [En línea]Available at: <http://www.reciclacion.cl/noticias/las-utilidades-del-te-e-infusiones>

²Pinterest.com. (2019). Cataplasma.

³ Farmagnosia: 2019. (14 de noviembre del 2019) <https://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/>

⁴Visnjican, D. (2015). 71338384.

⁵ Biosardenya, 2017. Dietetica Shop. <https://dieteticashop.com/product-category/plantas-medicinales>

⁶MedlinePlus. (06 de marzo de 2017). Musiquera. Obtenido de Musiquera: <https://noticias.musiquera.com/2017/03/06/los-jugos-de-verduras-y-el-aceite-de-coco-podrian-ser-perjudiciales-para-una-buena-dieta/>

Preparación

Lavados. Es la aplicación de infusiones, cocimientos o tinturas diluidas para tratar tópicamente afecciones externas localizadas, como heridas, llagas, úlceras, hemorroides, vaginitis y otras afecciones de la piel o de las mucosas.



(Naturista, 2019)⁷

Polvos Los polvos se obtienen pulverizando la planta seca, el material puede ser retriturado y tamizado varias veces, hasta alcanzar el tamaño deseado de las partículas.



Gala, 2015)⁸

Tintura. Se obtiene dejando en contacto la parte de la planta seca a utilizar, con una mezcla de alcohol al 40% en agua durante tres a cinco días, con agitación diaria y filtración.



(Ecoticias, 2019)⁹

Vapores Los vapores de ciertas plantas, emitidos por la acción del calor, son utilizados para el tratamiento de las afecciones del aparato respiratorio.



(Aliaga, 2016)¹⁰

Nota: Todas son las formas en las que es implementado las plantas medicinales las cuales brindan beneficios en la salud. Todas y cada una de las preparaciones pueden cambiar dependiendo en la manera que desea ser utilizada (Landín, 2016).

⁷Naturista, M. (15 de enero de 2019). Medicinas naturistas. Obtenido de medicinas naturistas: <https://medicinasnaturistas.com/guia-remedios-naturales/219/enema-terapia-intestinal-como-limpiar-el-colon-e-intestino>

⁸Gala, G., 2015. Moringa, el elixir de la eterna juventud. [En línea] <https://www.republica.com/salud-y-tu/2015/12/04/moringa-eterna-juventud/> [Último acceso: 14 noviembre 2019]

⁹Ecoticias. (2019). El Periódico Verde. Recuperado el 14 de noviembre de 2019, de <https://www.ecoticias.com/agricultura-ecologica/116891/necesitas-tintura-madre>

¹⁰Aliaga, M. (13 de mayo de 2016). On Salud. Recuperado el 14 de octubre de 2019, de <https://www.onsalus.com/trucos-para-curar-la-gripe-18203.html>

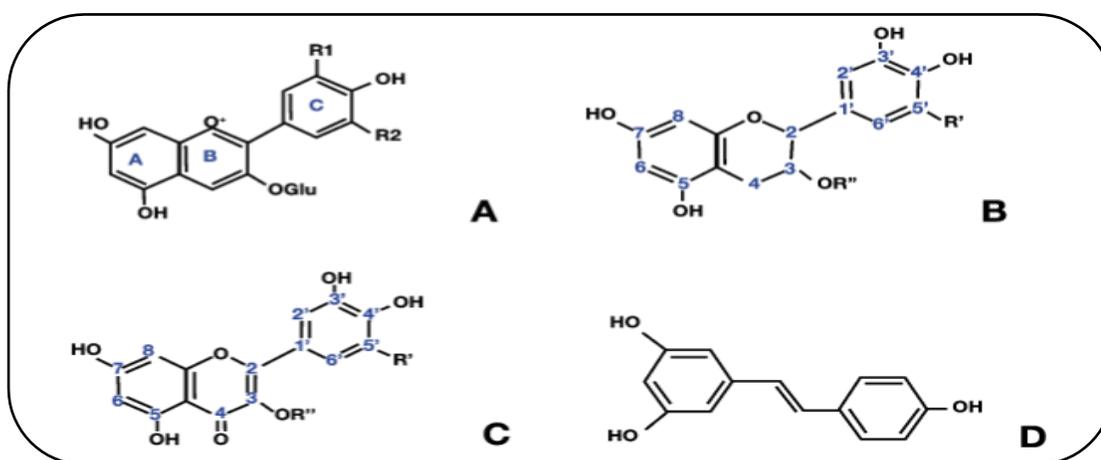
4.4 Los principios activos presentes en las plantas medicinales

Se define como principio activo a una sustancia pura, químicamente definida, ya sea extraída de fuentes naturales o sintetizada, que poseen acción biológica que puede ser aprovechada por sus efectos terapéuticos. Por lo que se considera el componente responsable de la actividad del medicamento, alcanza el lugar en el sitio para ejercer su acción (Landín, 2016).

4.5 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son un amplio grupo de sustancias químicas, con diferentes estructuras y propiedades químicas y actividad biológica, se han reportado más de 10 000 compuestos distintos. Algunos son solubles en solventes orgánicos, otros son glucósidos o ácidos carboxílicos y por lo tanto solubles en agua, y otros son polímeros muy grandes e insolubles (Taiz, 2006). Entre los que destacan: flavonoides, isoflavonoides, antraquinonas, antocianidinas, xantonas, ácidos fenólicos y fenoles simples, ácidos hidroxicinámicos, fenilpropenos, ligninas, etc. (Figura 2).

Figura 2. Estructura química de algunos compuestos fenólicos.



Nota: Compuestos fenólicos (A: Antocianinas; B: Catequinas; C: Epicatequinas; D: Resveratrol) (Marco-Mancebón, 2014).

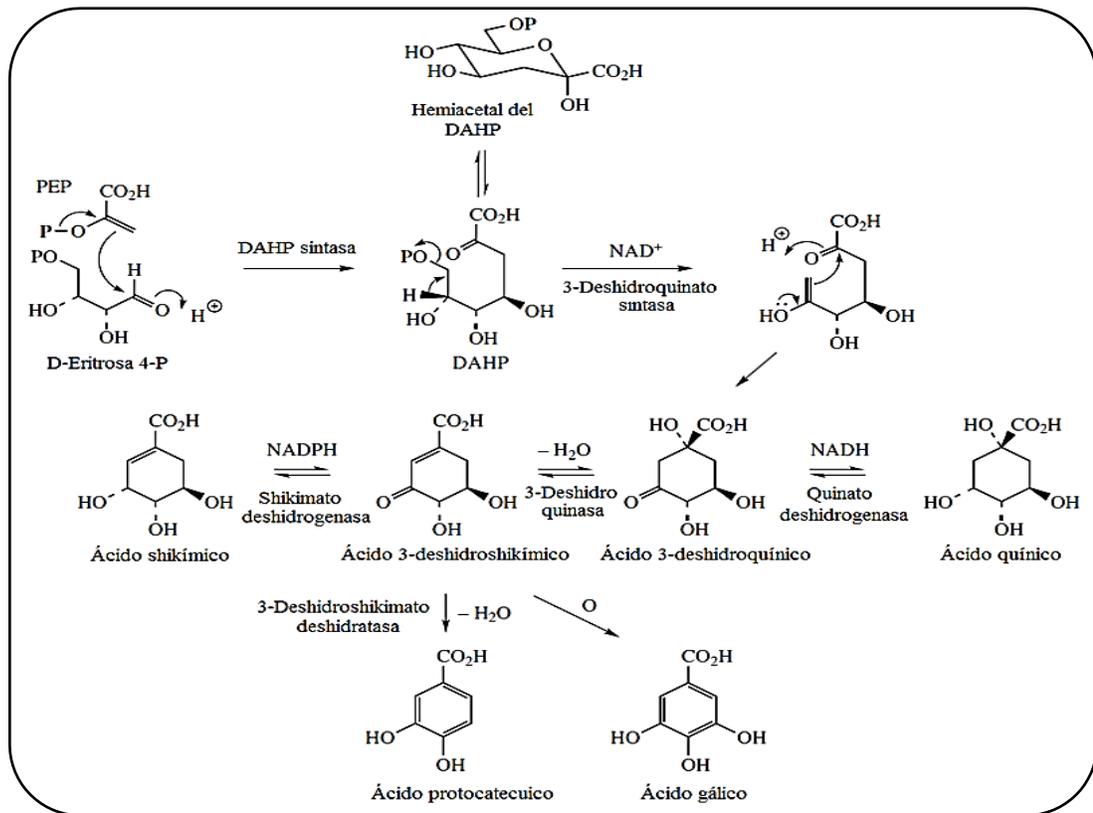
Químicamente, los compuestos fenólicos son sustancias que poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidroxilos (Scalbert et al., 2005), lo que les confiere sus propiedades antioxidantes, los polifenoles pueden proteger las células contra el daño oxidativo y por lo tanto limitar el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo (EO) causado por los radicales libres (RL) y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (EROS y ERNS) (Martínez *et al.*, 2002). El EO se define como el desequilibrio entre las especies oxidantes y reductoras a nivel celular en un organismo (Miller & Brzezinska-Slebodzinska, 1993). Entre los compuestos fenólicos más importantes se encuentran los flavonoides (Narayama *et al.*, 2001) los cuales, además de su comprobada actividad antioxidante, se les ha atribuido una gran diversidad de efectos terapéuticos, tales como actividad cardiotónica, antiinflamatoria, hepatoprotectora, antineoplástica, antimicrobiana, etc.

4.6 Síntesis de compuestos fenólicos en plantas

Los metabolitos secundarios de las plantas son sintetizados por una de dos vías biosintéticas: la ruta del ácido shikímico (Figura 3) o la vía del ácido malónico (o por las dos, por ejemplo, los flavonoides) (Taiz, 2006).

Los compuestos fenólicos juegan una variedad muy heterogénea de roles en las plantas, estos son atribuidos en general a sus productos secundarios, entre las funciones destacan: defensa ante herbívoros y patógenos, soporte mecánico a la planta, atracción de polinizadores o dispersores de frutos, algunos de ellos absorben la radiación ultravioleta, o actúan como agentes alelopáticos (por ejemplo, reducen el crecimiento de plantas competidoras que estén cerca) (Taiz, 2006).

Figura 3. Ruta de ácido Shikímico.



Nota: La biosíntesis de la mayoría de los fenoles comienza con los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano, los cuales se sintetizan a partir de fosfoenolpiruvato (PEP) y eritrosa-4-fosfato por una secuencia de reacciones (Mephisto, 2012).

4.7 Extracción con disolventes

Para poder aislar muchos de los compuestos de matrices sólidas, como las plantas, una opción viable a nivel laboratorio es la extracción con disolventes volátiles, la muestra se pone en contacto con disolventes tales como alcoholes, cloroformo, etc, que dependiendo la polaridad tales como grasas, aceites esenciales y ceras, así como compuestos fenólicos, carotenoides y vitaminas, por lo que los extractos son muy utilizados como remedios naturales principalmente como antioxidantes (Martínez, 2003).

4.8 Actividad antioxidante y radical libres

Existen muchas fuentes de antioxidantes naturales: avena, soya, té, granos de café, especias, arroz, aceites vegetales, papas, frutas, productos microbianos.

Los antioxidantes contenidos en frutas y vegetales son efectivos en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Shi, 2001).

En particular, los antioxidantes naturales que pueden ser hidrosolubles y liposolubles, pueden funcionar como compuestos reductores, interrumpen la cadena de formación de RL, inhiben o impiden la formación de oxígenos libres e inactivan los metales pro-oxidativos. Los RL se forman en el organismo mediante la respiración aeróbica y existen en diferentes formas como: anión superóxido, hidroxilos, peróxidos, y alcóxilos. Son dañinos ya que pueden reaccionar con componentes celulares importantes como el ADN o las membranas (Shi, 2001).

Los principales compuestos que tienen actividad antioxidante son: carotenoides, fosfolípidos, tocoferoles (vitamina E), vitamina C, compuestos fenólicos, pigmentos, y sistemas enzimáticos como el superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. Las vitaminas E, C, carotenos y los cofactores (Cu, Zn, Mn, Fe y Se) son importantes antioxidantes que funcionan de manera sinérgica inhibiendo la formación de RL. Los compuestos fenólicos interfieren con el proceso de oxidación al reaccionar con RL, quedan metales catalíticos y capturan el oxígeno. Estos compuestos se dividen en dos grupos: flavonoides y no flavonoides (Cedillo, 2006).

Los polifenoles o compuestos fenólicos ayudan a prevenir el riesgo de enfermedades crónicas como cáncer, degeneración neuronal relacionada con la edad y enfermedades cardiovasculares. Las plantas contienen una gran variedad de compuestos fenólicos como fenilpropanoides, derivados del ácido benzoico, taninos y ligninas (Macheix et al., 1990).

Los flavonoides que incluyen flavonas, flavonoles y taninos condensados, funcionan como quelantes de metales, atrapan RL, inhiben la xantina-oxidasa asociada a la formación de ERO y la proliferación de células cancerígenas en pulmones, estómago y colon, además, previenen enfermedades coronarias. En general, la actividad antioxidante aumenta cuando existen grupos hidroxilo o grupos donadores de hidrógeno en la estructura molecular del compuesto (Wang & Cao, 1996).

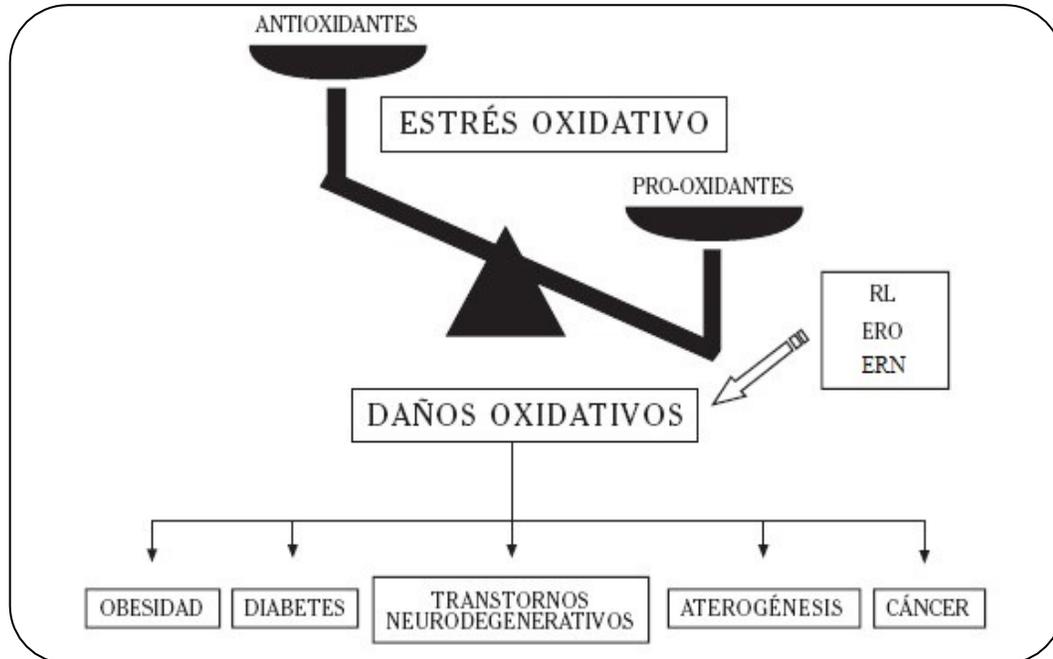
4.9 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo (EO) aparece en las células y tejidos cuando existe una perturbación del equilibrio entre las sustancias prooxidantes y antioxidantes a favor de las primeras. En la mayoría de las sustancias químicas conocidas, los electrones, con su carga eléctrica negativa se desplazan de forma apareada describiendo incesantemente una órbita u orbital alrededor del núcleo atómico. (Heredia *et al.*, 2012). En la segunda mitad del siglo XX fue posible determinar especies químicas que contienen uno o más electrones que realizan su recorrido orbital de forma o manera impar, lo cual trae consigo inestabilidad del equilibrio molecular que sólo se restablece cuando de sus proximidades logran sustraer el electrón requerido para constituir la indispensable paridad electrónica (Cruz *et al.*, 2013).

Como ya se mencionó la instauración del proceso de EO (Figura 4) ocurre por la existencia de un desequilibrio entre los sistemas oxidativos y los mecanismos antioxidantes, a favor de los primeros, llevando a la generación de grandes cantidades de RL o detrimento de la velocidad de neutralización de éstos (Halliwell & Whiteman, 2004). Este proceso conduce a la oxidación de biomoléculas con la consiguiente pérdida de sus funciones biológicas; así como al descontrol homeostático junto al potencial daño oxidativo contra las células y tejidos (Hicks *et al.*, 2006). La cronicidad del estrés oxidativo conlleva importantes implicaciones en el desarrollo de las enfermedades crónicas no transmisibles,

tales como la obesidad, la termogénesis, la diabetes, los trastornos neurodegenerativos y el cáncer (Galili et al., 2007).

Figura 4. Daño oxidativo en el organismo debido al estrés oxidativo.



Fuente: (Salas-Salvado, et al., 2008).

El daño oxidativo se relaciona con el origen y desarrollo de enfermedades crónicas, como la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), enfermedades cardiovasculares, daño oxidativo al ADN, cáncer y alteración de la visión (Serrano, 2005).

Estos pueden originarse por fallas en el proceso mitocondrial de la respiración aeróbica, por lo que funciones indispensables biológicas como el metabolismo de los alimentos y el ejercicio e innumerables patologías corporales están estrechamente ligadas al acontecer de los RL (González, 2006).

Los RL también se originan de alteraciones ambientales como la exposición a radiaciones ionizantes, rayos X– gamma, luz ultravioleta, polutantes atmosféricos (ozono, óxido nitroso, monóxido de carbono, dióxido de azufre, tetracloruro de carbono, refinерías, fábricas de papel), combustión de compuestos orgánicos con

producción de humo (carnes, cigarrillos, polución industrial fumígena), xenobióticos (pesticidas, herbicidas, fungicidas) y algunos fármacos (González, 2006).

4.10 Las enfermedades crónicas no transmisibles

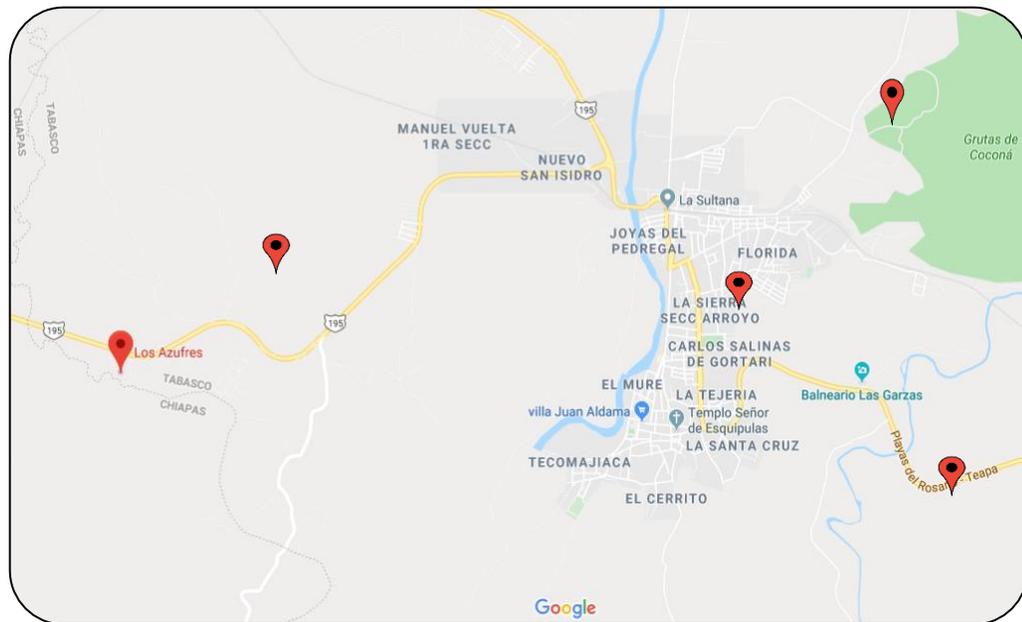
Las enfermedades crónicas no transmisibles se constituyen como uno de los mayores retos que enfrenta el sistema de salud debido al gran número de casos afectados, su creciente contribución a la mortalidad general, la aparición en edades cada vez más tempranas, el hecho de que son la causa más frecuente de incapacidad prematura, así como la complejidad y costo elevado de su tratamiento (Barba, 2018).

5. Procedimientos y Descripción detallada de las actividades

5.1 Ubicación de la muestra

Las muestras de *E. foetidum*, fueron recolectadas en diferentes lugares la zona Teapa (Figura 5), en los lugares donde se encontró siembra de esta hierba, la mayoría es de traspatio. El municipio de Teapa colinda al Norte con los municipios de Centro y Jalapa; al Sur y Oeste, colinda con el estado de Chiapas, y al Este con el municipio de Tacotalpa (INEGI 2018).

Figura 5. Sitios de recolección de las muestras *E. foetidum*.



En el Cuadro 2 se describe las muestras y las características de los sitios de recolección y las características del lugar en donde se recolectaron.

5.2 Metodología

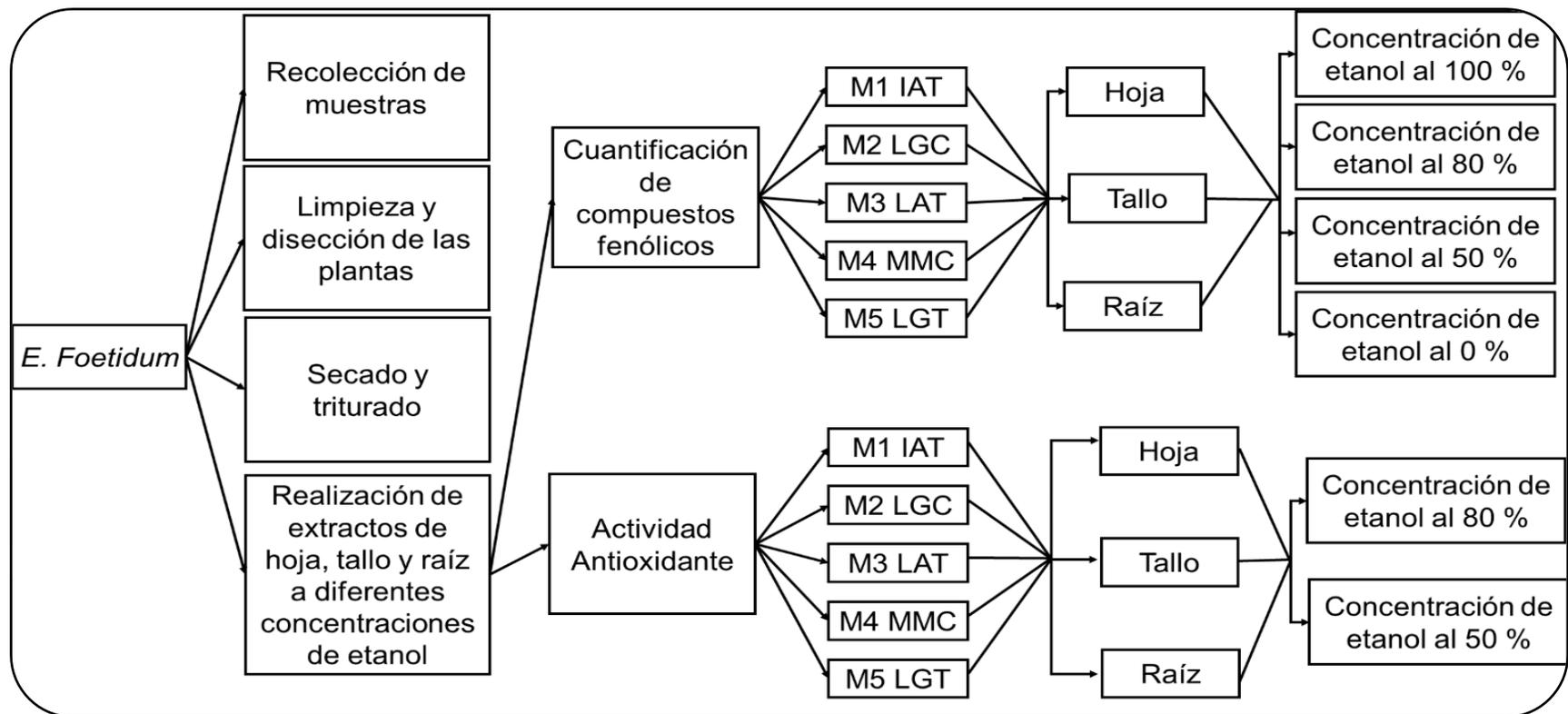
Cuadro 2. Descripción de las características del lugar y de las condiciones de las muestras de *E. foetidum*, adquiridas para el experimento.

Lugar	Muestras	Condiciones del Lugar
Ignacio Allende 2da secc; Tabasco		La tierra donde se encontraba es barrosa, hay mas plantas alrededor de esta y son muy pequeñas en comparación con la demás vegetación del lugar.
La Gloria, Chiapas		Comprada en el mercado Municipal de Teapa, en donde llegan a vender sus productos pobladores de Chiapas.
Los Azufres, Carretera Teapa- Pichucalco, Tabasco		El lugar está muy cuidado, la tierra está húmeda y no hay maleza que interfiera con su crecimiento, aquí el sol les solamente en las mañanas.
Mercado municipal “Diana Córdoba”, Chiapas		Esta muestra fue tomada del Mercado municipal, no sabemos en qué condiciones estaba la planta.
Rancho “La Guadalupe”, Eureka y Belén, Tabasco		El lugar en donde se tomaron las muestras está cerca del río y la tierra está húmeda, hay otras plantas creciendo a su alrededor.

5.2.1 Diagrama Experimental

En la Figura 6, se muestra el diagrama experimental de la investigación.

Figura 6. Diagrama experimental.

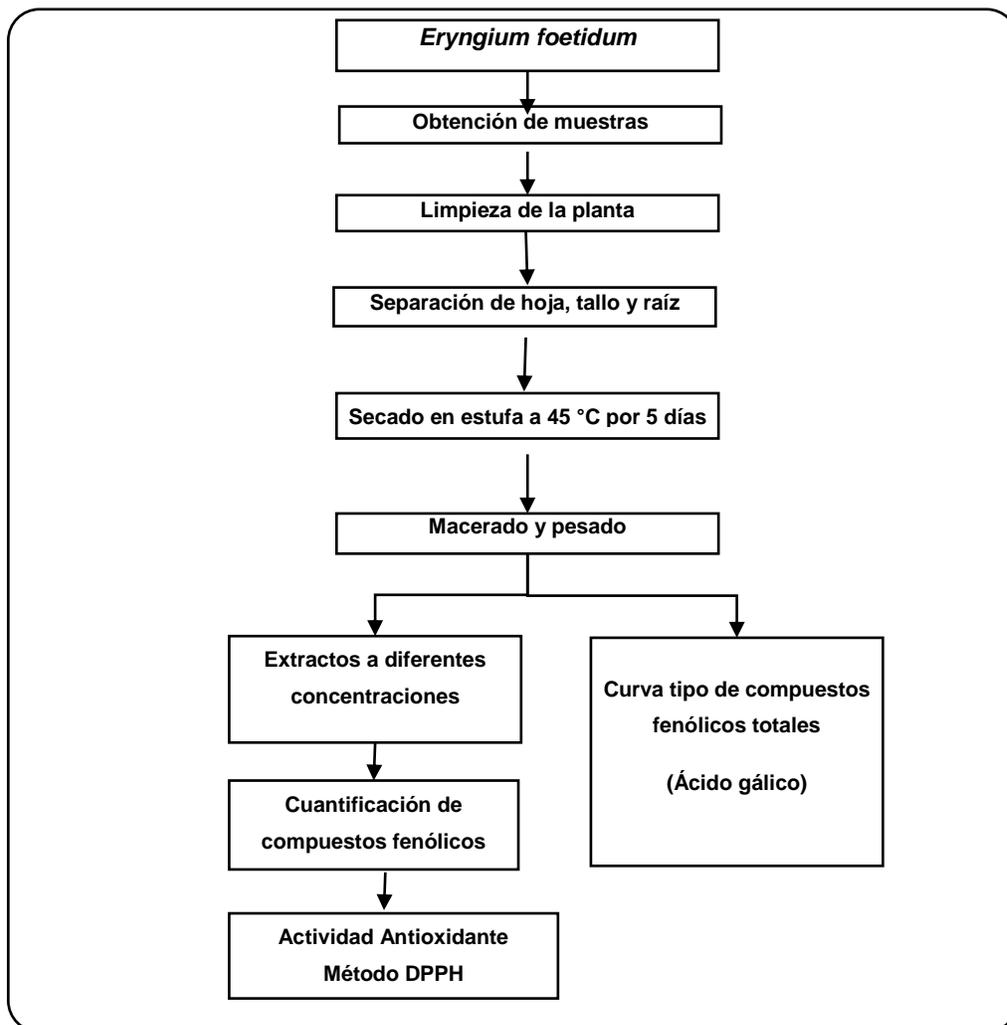


Nota: *M (muestra), IAT (Ignacio Allende, Tabasco), LGC (Las Gloria, Chiapas), LAT (Los Azufres, Tabasco), MMC (Mercado Municipal, Chiapas), LGT (Rancho “La Guadalupe”, Tabasco).

5.2.2 Diagrama de flujo del proceso.

A continuación, se presenta el diagrama de flujo de proceso (Figura 7).

Figura 7. Diagrama de flujo de proceso.



Fuente: Elaboración propia

5.2.3 Secado y acondicionamiento de las muestras

Las hojas, tallo y raíz se lavaron con agua destilada para retirar los restos de tierra, se retiró el exceso de agua y se pesaron, se determinó la humedad por medio de secado en estufa (marca Amerex instruments, Inc.) a 45 °C durante 5 días, hasta que el peso fue constante.

5.2.4 Obtención de extractos

Una vez secas las muestras se pulverizaron y se realizaron los ensayos por separado: hojas, raíz y tallo. Se obtuvieron extractos a una concentración de 1g de muestra/ 10 mL de disolvente: en agua, etanol-agua (50:50), etanol-agua (80:20) y etanol absoluto, se agitó y se dejó reposar por 24 h en oscuridad. Para determinar la concentración de compuestos fenólicos se hicieron diluciones 1:5 y 1:10 de los extractos de la hoja, tallo y raíz. (Anexo 1. Figura 14)

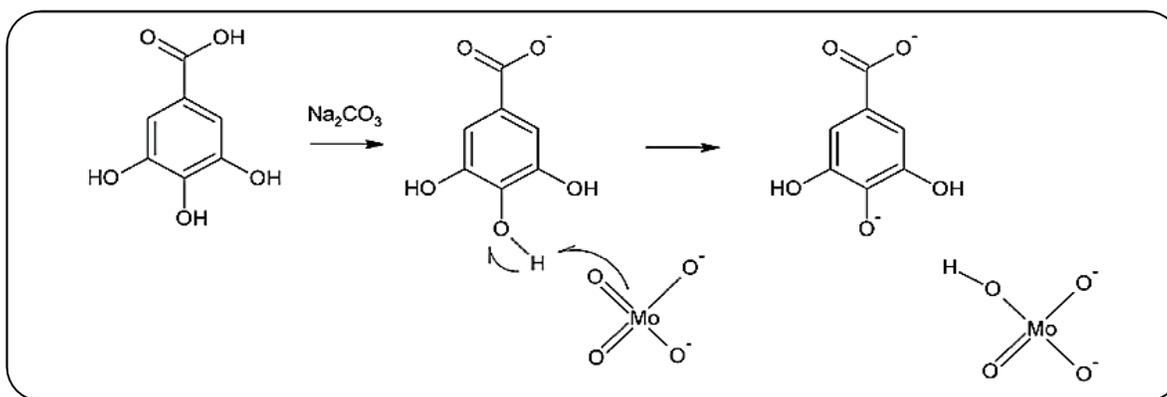
5.2.5 Cuantificación de compuestos fenólicos

Se determinó la concentración de compuestos fenólicos a los extractos obtenidos por el método de Folin-Ciocalteu, este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso susceptible de ser medido espectrofotométricamente a 760 nm, cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido de compuestos fenólicos (Garcia et al., 2015).

Para el ensayo se preparó la siguiente reacción: a 100 µL de extracto diluido se agregaron 500 µL de reactivo Folin-Ciocalteu (1:10 en agua destilada) se agitó e incubó 2 min a temperatura ambiente. Se agregan 400 µL de Na₂CO₃ al 10 % y se incubó a 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se leyó a 760 nm en el espectrofotómetro UV-1800 de la marca SHIMADZU.

Los resultados obtenidos se interpolaron en una curva tipo de ácido gálico (Figura 8) de la marca SIGMA-ALDRICH en concentraciones de 0, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g/mL}$, que se realizó por triplicado y de manera similar a la preparación de las muestras. Se eligió el ácido gálico como estándar ya que se trata de un ácido orgánico también conocido como ácido 3, 4, 5-trihidroxibenzoico, que se encuentra en las agallas, en las hojas de té, en la corteza de roble y otras plantas. La fórmula química es $\text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})_3\text{COOH}$. El ácido gálico se encuentra tanto en su forma libre como formando parte de taninos. (Núñez-Gastélum, 2017). En la figura 8 se muestra la reacción del ácido gálico con el reactivo de Folin.

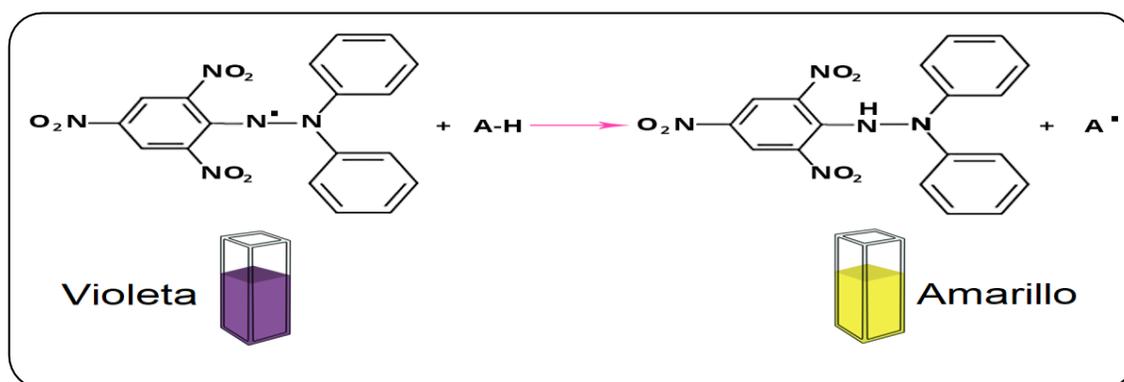
Figura 8. Reacción entre el ácido gálico y el reactivo de FC.



5.2.6 Determinación de la actividad antioxidante

Se determinó la actividad antioxidante de los extractos que tenían la mayor concentración de compuestos fenólicos con el método del atrapamiento del radical DPPH, que consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por la reacción de la presencia de una sustancia antioxidante (Figura 9) siendo medida espectrofotométricamente a 517 nm (Molyneux, 2004). (Anexo 1, Figura 14 al 18)

Figura 9. Reacción de decoloración del radical DPPH



Fuente: (Guija-Poma, et al., 2015).

5.3 Análisis estadístico

El programa que se utilizó para la obtener el análisis estadístico fue Statgraphics plus[®] 4.0, los resultados obtenidos se utilizaron dentro del programa fue la ANOVA multifactorial que ejecuta un análisis de varianza de varios factores para repetición. Realiza varias pruebas y gráficas para determinar qué factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre repetición (Anexo 2).

5.4 Cronograma de actividades

En la Figura 10 se muestra las actividades que se realizaron durante el transcurso del proyecto.

Figura 10. Cronograma de actividades.

Obtención de Extractos Etanólicos de <i>Eryngium foetidum</i> y Determinación de Actividad Antioxidante <i>in vitro</i>																		
Actividades	Inicio de actividad	Fin de actividad	Año 2019															
			Agosto		Septiembre					Octubre				Noviembre			Dic	
			19/08/19	26/08/19	02/09/19	09/09/19	16/09/19	23/09/19	30/09/19	07/10/19	14/10/19	21/10/19	28/10/19	04/11/19	11/11/19	18/11/19	25/11/19	02/12/19
Conocimiento del proyecto	19/08/19	23/08/19	■															
Recolección de muestras	19/08/19	26/08/19	■	■														
Secado y triturado de muestras	19/08/19	30/08/19	■	■														
Recopilación de antecedentes	26/08/19	30/08/19		■														
Creación de marco teórico	02/09/19	20/09/19			■	■	■											
Diseño experimental	02/09/19	06/09/19			■													
Determinación de compuestos fenólicos	05/09/19	12/09/19				■												
Discusión de resultados	13/09/19	20/09/19					■											
Determinación de actividad antioxidante método DPPH	23/09/19	02/10/19						■	■									
Discusión de resultados	03/10/19	25/10/19							■	■								
Conclusión de los resultados obtenidos	11/11/19	22/11/19												■	■			
Entrega de proyecto final	02/12/19	07/12/19																■

Fuente: Elaboración propia.

6. Resultados

6.1 Acondicionamiento de la planta

Se realizó la separación de la hoja, el tallo y la raíz para ser secadas, una vez secas las muestras, fueron maceradas aquí se obtuvieron el porcentaje de sólidos totales de la muestra que se puede observar en el Cuadro 3 (Anexo 3).

Cuadro 3. Porcentaje de sólidos del *E. Foetidum*.

	% de Sólidos		
	Hoja	Tallo	Raíz
M1 IAT	24	12	21
M2 LGC	16	13	19
M3 LAT	21	19	3
M4 MMC	15	14	4
M5 LGT	16	15	23

Nota: Muestra 1. Ignacio Allende, Tabasco; Muestra 2. Las Gloria, Chiapas; Muestra 3. Los Azufres, Tabasco; Muestra 4. Mercado Municipal, Chiapas; Muestra 5. Rancho “La Guadalupe”, Tabasco

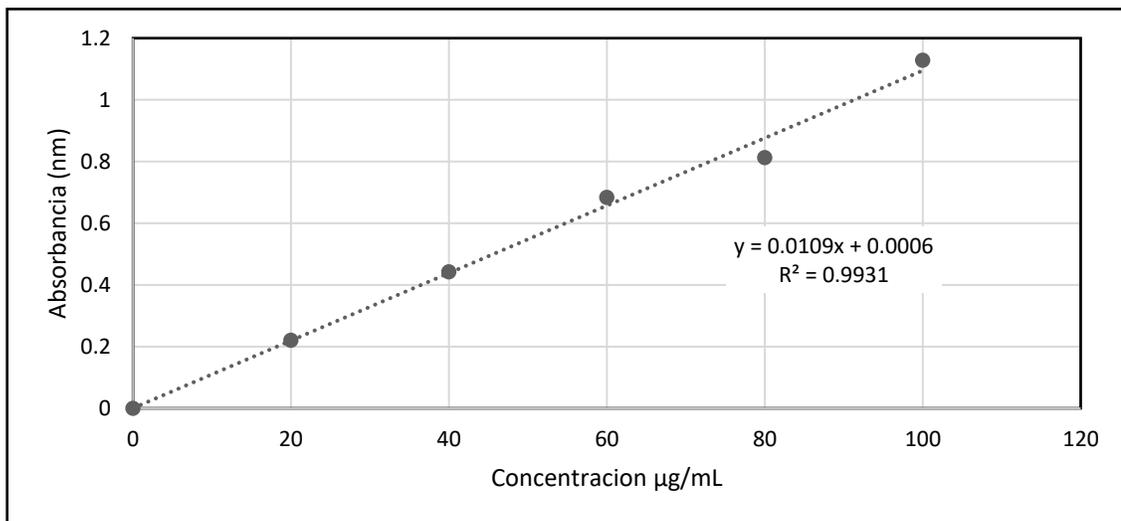
6.2 Cuantificación de compuestos fenólicos

El presente trabajo se analizó la concentración de compuestos fenólicos extraídos con agua, etanol/agua (50 y 80 %) y etanol absoluto en donde se evaluó el mejor rendimiento de extracción de los compuestos fenólicos.

Para poder determinar el contenido de compuestos fenólicos se realizó una curva de calibración referida a ácido gálico (Figura 11) ya que la estructura de esta es similar a los compuestos fenólicos que hay en las plantas para relacionar la variable dependiente “Y” (densidad óptica 760 nm) con una variable independiente “X” (concentración de ácido gálico $\mu\text{g/mL}$). El coeficiente de determinación simple R^2 indica cual es el porcentaje de variabilidad entre los dos

términos, se obtuvo la siguiente ecuación $y=0.0113x-0.0096$ y un intervalo de 0.998 de confianza para las mediciones mostradas. (Anexo 3)

Figura 11. Curva tipo de ácido gálico para cuantificar compuestos fenólicos totales.

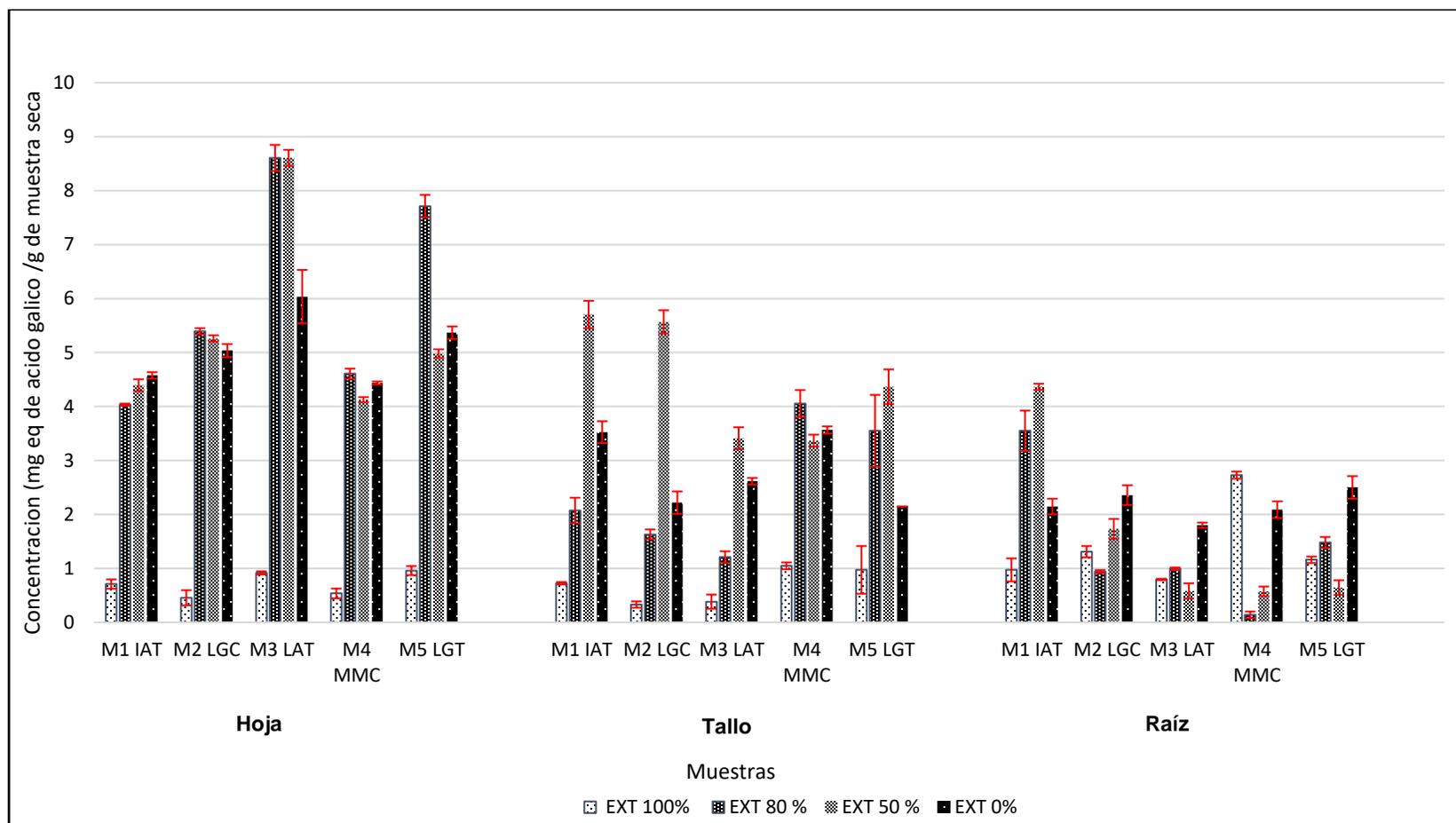


Fuente: propia

La determinación de compuestos fenólicos se lleva a cabo por triplicado para los diferentes extractos, y las absorbancias fueron interpoladas en la curva estándar para calcular la concentración de compuestos fenólicos totales para cada muestra.

En la Figura 12, se pueden observar de las diferentes concentraciones del disolvente a las que se sometieron, en el Cuadro 4 se muestra los promedios de las tres partes de la planta.

Figura 12. Concentración de compuestos fenólicos totales.



Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 4. Concentración de compuestos fenólicos totales (mg eq de ácido gálico/ g de planta) de *E. foetidum* extraídas con diferentes concentraciones de etanol.

	Etanol 100 %	Etanol 80 %	Etanol 50 %	Agua
Hoja	0.71 ±0.09	6.07±0.12	5.47±0.09	5.09±0.16
Tallo	0.691±0.14	2.504±0.27	4.483±0.22	2.814±0.11
Raíz	1.392±0.09	0.949±0.12	1.001±0.12	2.327±0.15

En comparación con Puente (2019) el Sacha Culantro (*Eryngium foetidum*) una variedad de perejil peruano presentó mayor contenido de polifenoles totales 25.6±0.2 (mg EAG/g RSP) en extracto cetónico, estos autores reportaron que la mayor cantidad correspondía a flavonoides 8.77±0.28 (mg Eq. Cat/100g RSP). Otros autores como Cruzado, et al (2013) encontró que el contenido de fenoles totales del extracto de alcachofa de la especie *Cynara scolymus* L. alcanzó de 117.3 mg de ácido gálico/g de extracto. Este valor resultó ser mayor que en otras especies de alcachofas reportadas (31 - 58 mg de ácido gálico/g de extracto).

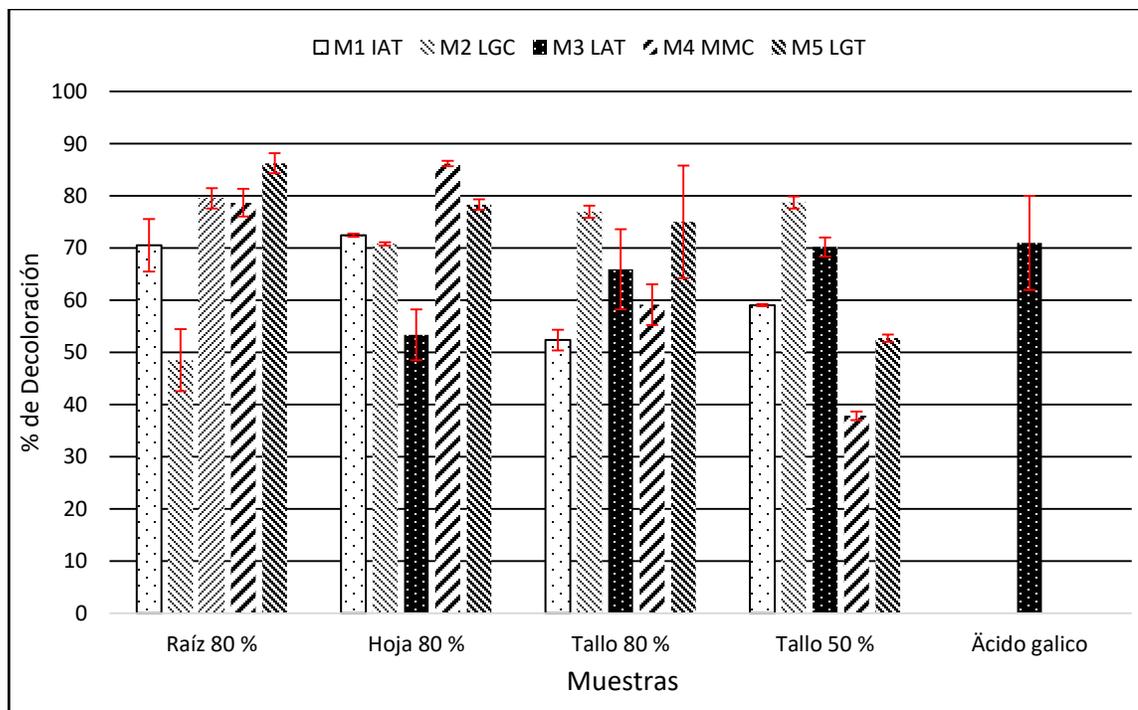
La diferencia de que obtuvieron mayores compuestos fenólicos debió ser porque utilizaron otros disolventes con diferentes polaridades, el hecho de haber utilizado etanol fue debido a que se desea que los extractos puedan ser consumidos sin otros tratamientos que los harían más costos y difícil de obtener por ejemplo la eliminación del disolvente con rotavapor, o por medio de destilaciones que podrían descomponer los compuestos, ya que estas operaciones unitarias precisan de calor para poder separar las mezclas.

Una vez determinada la concentración de compuestos fenólicos se procedió a ajustar los contenidos a una concentración de 100 µg eq. Ácido gálico/ mL de extracto, para obtener cantidades similares en las tres partes de la planta seca, esto con el fin de determinar el efecto de estos sobre la actividad antioxidante y que estas dependan únicamente de la cualidad cuantitativa de los compuestos fenólicos.

6.3 Actividad antioxidante método DPPH

Para determinar la actividad antioxidante se eligieron los extractos que contenían mayor concentración de compuestos fenólicos. En la Figura 13 se muestra los valores obtenidos de la actividad antioxidante que se presentaron en las distintas concentraciones de etanol.

Figura 13. Actividad antioxidante por el método DPPH (2,2-Difeni-1-picrilhidrazilo).



Fuente: autoría propia

Por otra parte los datos obtenidos de las tres partes de la planta del *E. foetidum* demuestran que en cualquier parte de ella encontraremos actividad antioxidante debido a que se obtuvieron datos similares entre ellos. Otros autores como Puente (2019) obtuvieron capacidad antioxidante 93.86 ± 3.37 (nmoles Fe^{2+} /g RSP) con extractos de *E. foetidum* con acetona estos obtuvieron mayor cantidad debido a que acidificaron la solución y por lo tanto obtuvieron mayores resultados. Osornio (2018) encontró que en germinados de cebada y malta (66.13 ± 0.06 % ARA) se obtenían mejores resultados con extractos de metanol acidificado con HCl (1 %) y acetona (75 %). Por otra parte, García-Cruz, et al (2012) encontro que en la Pitaya de mayo (*Stenocereus griseus* H.) fueron mas favorables para la pitaya naranja, que demostro tener mayor actividad antioxidante que la pitaya roja.

Otros autores han reportado el uso de hojas de diferentes frutos para obtener extractos con actividad, por ejemplo (Vit, et al., (2014)) reportaron que los extractos etanólicos de hojas y semillas de guanábana contenían mayor cantidad de flavonoides, polifenoles y proteínas que extractos de las mismas muestras usando metanol como disolvente, esto posiblemente relacionado a que los compuestos extraídos por el etanol son ligeramente más polares que los extraídos con el metanol. Paralelamente los extractos etanólicos también poseían mayor actividad antioxidante, los autores relacionaron esta actividad con el contenido de flavonoides, polifenoles y proteínas.

Por otro lado se ha reportado que extractos etanólicos de hojas de achiote, tiene actividad antimicrobiana la cual es debida a la presencia de sus compuestos antioxidantes. (Sepúlveda, et al., 2016). Reportan que el contenido de compuestos fenólicos está relacionado con el tiempo de extracción por lo que entre mayor tiempo transcurra, se permitirá mayor penetración del solvente en el tejido del material vegetal y por lo tanto mayor rendimiento de extracción, sin embargo también es importante considerar la relación soluto/sustrato, para una mejor superficie de respuesta.

Gutiérrez et al., (2009) Reportaron que los extractos hidroalcohólicos (80%) de plantas medicinales (*Eupatorium triplenerve*, *Equisetum arvense*, *Bixa Orellana*) eran ricos en polifenoles y flavonoides, proponen que dichos compuestos le confieren propiedades antioxidantes a estos extractos lo cual fue demostrado por medio de la capacidad para reducir el hierro (FRAP Ferric reducing ability power)

7. Conclusión

En la cuantificación de compuestos fenólicos se encontró que el extracto donde se obtuvo mayor concentración fue en hojas cuando el disolvente fue etanol al 80 y 50 %, mientras que con el tallo en los extractos de 50 % de etanol se obtuvieron mejores resultados, en la parte de la raíz se obtuvieron mejores resultados en la extracción acuosa.

La actividad antioxidante fue similar en todas las partes de la planta, además fue similar a la del ácido gálico a la misma concentración por lo que podemos proponer que los extractos que contienen etanol y agua se obtienen mejores resultados en la obtención de compuestos fenólicos y en la actividad antioxidante.

Por lo tanto, no es aconsejable que realicen extractos de etanol al 100 % debido a que no se extraen compuestos fenólicos.

Considerando el contenido de los compuestos fenólicos, actividad antioxidante, el *Eryngium foetidum* es una planta que brinda beneficios para la salud, y que puede ayudarnos a tratar padecimientos como la Diabetes ya que contiene actividad antioxidante.

9. Recomendaciones

- Es necesario hacer más estudios para que pueda saber el tipo de antioxidantes que está más presentes en la planta.
- Se recomienda hacer los mismos estudios con diferentes disolventes y así obtener mayores compuestos fenólicos y actividad antioxidante.
- Se recomienda hacer estudios *in vivo* para poder saber si se obtienen mejores resultados con la planta viva.

10. Bibliografía

Adams, C. D., 1971. Plantas con flores de Jamaica. *Universidad de West Indies*, p. 848.

Aly, A. A. E.-H., 2010. Biosynthesis of phenolic compounds and water soluble vitamins in Culantro (*Eryngium foetidum* L.) plantlets as affected by low doses of gamma irradiation.. *Fascicula Biologie*, pp. 356-361..

Barba, J., 2018. México y el reto de las enfermedades crónicas no transmisibles. El laboratorio también juega un papel importante. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, pp. 4-17.

Cedillo, C., 2006. *Identificación de los compuestos fenólicos en el capulín prunus serotonina EHRH y evaluación de su capacidad antioxidante y estabilidad en mermeladas*, s.l.: Tesis de Maestría.

Cruzado, M., Pastor, A., Castro, N. & Cedrón, J. C., 2013. Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de alcachofa (*Cynara scolymus* L.). *Rev. Soc. Quím. Perú*, 79(1).

Cruz, B. R., González, G. J. & Sánchez, C. P., 2013. Propiedades funcionales y beneficios para la salud del licopeno. *Nutr. Hosp.*, 28(5).

Fan, X. & Sokorai, K. J., 2002. Changes in volatile compounds of γ -irradiated fresh cilantro leaves during cold storage. *J. Agric. Food Chem*, Issue 50, pp. 7622-7626.

Galili, O. y otros, 2007. Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress.. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, pp. 292: H904-911..

García-Cruz, L., Salinas-Moreno, Y. & Valle-Guadarrama, S., 2012. Betalaínas, compuestos fenólicos y actividad antioxidante en pitaya de mayo (*Stenocereus griseus* H.). *Rev. Fitotec. Mex.* , pp. 1 - 5.

García, M. E., Fernández, S. I. & Fuentes, L. A., 2015. *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin Ciocalteu*. Valencia, s.n.

González, U. I., 2006. Radicales libres: Algunas consideraciones clínicas. *Gac Méd Caracas*.

Guija-Poma, E., Inocente-Camones, M. Á., Ponce- Pardo, J. & Zarzona-Norabuena, E., 2015. Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horiz Med*, pp. 57-60.

Halliwell, B. & Whiteman, M., 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *Br J Pharmacol*, pp. 142: 231-255..

Heredia, R. D., Fernández Caraballo, D., Alfonso Rodríguez, J. & Ballesteros Hernández, M., 2012. El estrés oxidativo en la insuficiencia renal asociada con hipertensión. *Rev Cubana Invest Biomédica*, pp. 16-25.

Hernández, L. B. L., 2011. Actualidades sobre los antioxidantes en los alimentos.. En: *Estrés Oxidativo Y Antioxidante*. s.l.:s.n.

Hicks, J., Torres-Ramos, Y. & Sierra-Vargas, M., 2006. Estrés oxidante, concepto y clasificación. *Rev Endocrinol Nutr*, pp. 14: 223-226..

Landín, B. P., 2016. *Medicamentos*. [En línea].

Le Bras, M., Clement, M., Pervaiz, S. & Brenner, C., 2005. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol Histopathol*, Volumen 20, p. 205.

Lingaraju, D., Sudarshana, M., Mahendra, C. & Rao, K., 2016. . Detección fitoquímica y actividad antimicrobiana de extractos de hojas de *Eryngium foetidum* L. (Apiaceae).. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 6(2), pp. 4339-4344.

Macheix, J., Fleuriet, A. & Billiot, J., 1990. Fruit Phenolics.

Marco-Mancebón, V. S., 2014. *Compuestos fenólicos*. España: s.n.

Martínez, F., González, G., Culebras, J. & Tuñón, M., 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. En: *Nutrición Hospitalaria*. s.l.:s.n., pp. 271-278..

Martínez, M. A., 2003. *Aceites esenciales*. Medellín: Facultad Química Farmacéutica.

Miller, J. & Brzezinska-Slebodzinska, E., 1993. Oxidative Stress, Antioxidants, and Animal. En: *Function, Journal of Dairy Science*,. s.l.:s.n., pp. 2812-2823.

Molyneux, P., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl(DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 2(26), pp. 211-219.

Narayama, K. y otros, 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical, effects and therapeutic potencial,. *Indian Journal Pharmacology*, pp. 2-16.

Núñez-Gastélum, J. A., 2017. *Reaccion entre el ácido gálico y el reactivo de FC*. s.l.:s.n.

OMS, 1978. *Medicina tradicional: definiciones*.. s.l.:s.n.

OMS, 2019. *Medicina tradicional: definiciones [Interne]*.. [En línea] Available at: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/.

Osornio, P. A., 2018. *Determinacion de propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de la malta*. Tesis de Licenciatura Para Ingenieria Bioquímica: Escuela Nacional De Ciencias Biológicas.

Paul, J., Seaforth, C. & Tikasingh, T., 2011. *Eryngium foetidum L. Fitoterapia*, 82(3), p. 302–308.

Puente, V. S. L., 2019. *Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de extractos de hoja de Sacha Culantro (Eryngium foetidum L.) y de Aceite de Copaiba (Copaifera paupera) procedentes de la Provincia de Coronel Portillo, Ucayali.* 1ra ed. Lima, Perú: Facultad de Ciencias de la Salud.

Salas-Salvado, J. y otros, 2008. Components of the Mediterranean-type food pattern and serum inflammatory markers among patients at high risk for cardiovascular disease.. *Eur J Clin Nutr*, Volumen 62, pp. 651-659.

Scalbert, A., Manach, C. & Morand, C., 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. En: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. s.l.:s.n., pp. 297-306..

Sepúlveda, R., Tatiana, C., Gelmy Luz, C. G. & José Edgar, Z. M., 2016. "Extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de hojas de Bixa orellana L.(achiote)". *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, Volumen 21.2 , pp. 133-144..

Serrano, M. G. F. M.-R. D. C. S. A. V. D., 2005. Chemical Constituents and Antioxidants Activity of Sweet Cherry at Different Ripening Stages. *Journal Agricultural Food Chemist`s*, pp. 2741-2745..

Shi, H., 2001. *Introducing natural antioxidants. Cap 8 en antioxidantes en Antioxidants in foods*. s.l.:CRC Press Inc. Boca Raton.

Simes, E., 2010. Introducción a la química general. En: s.l.:Editorial Sarmiento., p. 23 p..

Singh, B., Ramakrishna, Y. & Ngachan, S., 2014. Cilantro espinoso (*Eryngium foetidum L.*): una hierba culinaria especiada de uso común, descuidada, de Mizoram, India.. *Recursos genéticos y evolución de cultivos* , 61(6), pp. 1085-1090.

Taiz, L. y E. Z., 2006. Secondary Metabolites and Plant Defense. *Plant Physiology, Fourth Edition, Inc*, p. Capitulo 13.

Vit, y otros, (2014). "Composición química y actividad antioxidante de pulpa, hoja y semilla de guanábana *Annona muricata L.*". *Interciencia* 39.5, pp. 350-353.

Wang, H. & Cao, G. y P. R. L., 1996. Total Antioxidant Capacity of Fruits. *Journal Agricultural Food Chemist`s*, pp. 701-705.

White, L., Foster, S., Staff, H. f. H. & Emmaus, P., 2004. Las mejores alternativas naturales a los medicamentos.. *El Recetario Herbario*, p. 672 pp..

Wong, K. y otros, 1994. Composition of the leaf and root oil of *Eryngium foetidum*. *Essent Oil Res*, Issue 6, p. 369–374.

Zagrheca, S., 2013. Libro Blanco de los herbolarios y las plantas medicinales. En: *Libro Blanco de los herbolarios y las plantas medicinales*. s.l.:s.n.

11. Anexos

11.1 Anexo 1. Preparación de reactivos

Figura 14. Preparación de los extractos a diferentes concentraciones.



Para la obtención de extractos, se pesaron 5 g de muestra seca y 5 ml de disolvente que se utilizó para cada caso, alcohólico (100 % Etanol), hidroalcohólicos (80 % y 50 % Etanol) y el hídrico: (0 % Etanol). Estos se colocaron los tubos y se dejaron reposar durante 16 h. Para su posterior filtración y separación de los sólidos y líquidos.

Figura 15. Preparación del radical DPPH (2,2-Difeni-1-picrilhidrazilo).



Para realizar la solución DPPH se procedió a pesar 4 mg de DPPH para disolver en 100 mL de etanol. Luego se procedió a preparar el control y se preparó un

tubo con 100 μL de agua destilada donde se añaden 1000 μL de una solución 0.1 mM de DPPH en etanol se procede a agitar y dejar reaccionar por 30 min. Luego se leerá a una absorbancia a una longitud de onda de 517 nm.

Figura 16. Reactivo DPPH.



Especificaciones del producto: número de producto: G7384; número CAS: 149-91-7; MDL: MFCD00002510; fórmula: $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$; fórmula weight: 170.12 g/mol.

Figura 17. Preparación de la solución de ácido gálico.



Número registrado CAS: 149-91-7; nomenclatura IUPAC Unión Internacional de química pura y aplicada: ácido 3, 4, 5-trihidroxibenzoico; sinonimias. Ácido 3, 4,

5-trihidroxibenzoico; peligrosidad del ácido gálico. Número RTECS registro de efectos tóxicos de sustancias químicas: LW7525000.

Se realizó la curva tipo de ácido gálico (1 mg/mL). (Figura 10).

Se preparó la muestra a diferentes concentraciones.

Cuadro 5. Preparación de la muestra a diferentes concentraciones.

Solución	Agua destilada	Concentración
0	1000	0
20	980	20
40	960	40
60	940	60
80	920	80
100	900	100

Figura 18. Preparación de las muestras para leer en el espectro.



Para realizar las lecturas en el espectro se utilizaron tubos Eppendorf, en donde se colocaron las muestras a determinadas concentraciones, primero para la obtención de extractos se procedió a realizar lo siguiente: Preparar las diluciones de la muestra a 100 μL de la muestra, se agregan 500 μL de reactivo de Folin Ciocalteu (1:10 en agua destilada), se agito, y se dejó incubar 2 min a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a agregar 400 μL de Na_2CO_3

(75µg/mL) incubar 15 min 50°C, y se dejara enfriar a temperatura ambiente, se leyó a una longitud de onda de 760 nm.

Figura 19. Lectura en el espectrofotómetro UV-1800.



Las lecturas en el espectro se realizaron con dos diferentes absorbancias, para la lectura de compuestos fenólicos leyeron a 760 nm y para la actividad antioxidante se leyeron a 517 nm.

11.2 Anexo 2. Análisis estadístico

ANOVA Multifactorial ejecuta un análisis de varianza de varios factores para repetición. Realiza varias pruebas y gráficas para determinar qué factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre repetición. También evalúa la significancia de las interacciones entre los factores, si es que hay suficientes datos. Las pruebas-F en la tabla ANOVA le permitirán identificar los factores significativos. Para cada factor significativo, las pruebas de rangos múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La gráfica de medias y la gráfica de interacciones le ayudarán a interpretar los efectos significativos. Las gráficas de residuos le ayudarán a juzgar si los datos han violado los supuestos subyacentes al análisis de varianza.

- Variable dependiente: repetición
- Factores: 1. Disolvente %, 2. Parte planta; 3. Lugar muestras
- Número de casos completos: 180

11.2.1 Análisis de Varianza

Cuadro 6. Análisis de varianza para repetición - suma de cuadrados tipo III.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A: Disolvente %	203.801	3	67.9337	38.34	0*
B: parte planta	241.853	2	120.927	68.24	0*
C: Lugar muestras	7.65889	4	1.91472	1.08	0.3678
Residuos	301.248	170	1.77205		
Total (corregido)	754.561	179			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Nota: La tabla ANOVA descompone la variabilidad de repetición en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre repetición con un 95.0% de nivel de confianza. *Indica que no hay diferencias significativas entre ellas.

11.2.2 Medias por mínimos cuadrados

Cuadro 7. Tabla de medias por mínimos cuadrados para repetición con intervalos de confianza del 95.0 %.

Nivel	Casos	Media	Error Estándar	Límite Inferior	Límite Superior
MEDIA GLOBAL	180	2.76217			
Disolvente %					
0	45	3.41069	0.198441	3.01896	3.80242
50	45	3.53142	0.198441	3.13969	3.92315
80	45	3.17391	0.198441	2.78218	3.56563
100	45	0.932674	0.198441	0.540947	1.3244
Parte planta					
Hoja	60	4.24648	0.171855	3.90723	4.58572
Raíz	60	1.41747	0.171855	1.07822	1.75671
Tallo	60	2.62257	0.171855	2.28333	2.96182
Lugar muestras					
1	36	2.67182	0.221864	2.23385	3.10978
2	36	2.50526	0.221864	2.06729	2.94322
3	36	2.95787	0.221864	2.51991	3.39584
4	36	2.62726	0.221864	2.18929	3.06522
5	36	3.04866	0.221864	2.6107	3.48663

Nota: Esta tabla muestra la media de repetición para cada uno de los niveles de los factores. También muestra los errores estándares de cada media, los cuales son una medida de la variabilidad en su muestreo. Las dos columnas de la extrema derecha muestran intervalos de confianza del 95.0 % para cada una de las medias. Pueden desplegarse estas medias e intervalos seleccionado Gráfica de Medias de la lista de opciones gráficas.

11.2.3 Pruebas de múltiple Rangos

Cuadro 8. Pruebas de múltiples rangos para repetición por disolvente %.

Método: 95.0 porcentaje LSD					
Disolvente %	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos	
100	45	0.932674	0.198441	X	
80	45	3.17391	0.198441	X	
0	45	3.41069	0.198441	X	
50	45	3.53142	0.198441	X	
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites		
0 - 50		-0.12073	0.553985		
0 - 80		0.236784	0.553985		
0 - 100	*	2.47802	0.553985		
50 - 80		0.357515	0.553985		
50 - 100	*	2.59875	0.553985		
80 - 100	*	2.24123	0.553985		

* indica una diferencia significativa.

Nota: Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

11.3 Anexo 3. Tabla de datos de compuestos fenólicos y actividad antioxidante

Cuadro 9. Actividad antioxidante método DPPH.

		EXT 100 % *	EXT 80 %*	EXT 50 %*	EXT 0%*
Hoja	M1 IAT	0.70934265	4.03088669	4.39469027	4.57697235
	M2 LGC	0.45558247	5.39569828	5.26047484	5.03631933
	M3 LAT	0.91470718	8.60559358	8.60559358	6.03666245
	M4 MMC	0.53598858	4.60783285	4.12748894	4.4359882
	M5 LGT	0.95889157	7.71308193	4.98165052	5.36650747
Tallo	M1 IAT	0.72392089	2.07285712	5.70226469	3.52478455
	M2 LGC	0.32974094	1.63080571	5.5677733	2.21897643
	M3 LAT	0.38330419	1.21053634	3.41182152	2.61614332
	M4 MMC	1.04638469	4.05433217	3.36861588	3.56479223
	M5 LGT	0.97263029	3.54929238	4.36542914	2.14716356
Raíz	M1 IAT	0.97263029	3.54929238	4.36542914	2.14716356
	M2 LGC	1.30947544	0.9393106	1.73046238	2.35697861
	M3 LAT	0.7938316	0.99238148	0.58197526	1.79952617
	M4 MMC	2.72846637	0.13832976	0.57528	2.08840156
	M5 LGT	1.16077858	1.48019385	0.64381247	2.50088496

*Unidad de medida: mg eq de ácido gálico/ g de planta

Cuadro 10. Actividad antioxidante Método DPPH.

	M1 IAT	M2 LGC	M3 LAT	M4 MMC	M5 LGT
Raíz 80 %	71	48	80	79	86
Hoja 80 %	72	71	53	86	78
Tallo 80 %	52	77	66	59	75
Tallo 50 %	59	79	70	38	53
Ácido gálico	71	NA	NA	NA	NA

*NA (No aplica)