

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA**



**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICION  
HUMANA**

**TESIS**

**TÍTULO**

**“ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIBACTERIANA *In Vitro* DE LAS HOJAS DEL  
*Coriandrum sativum* (CULANTRO) Y *Eryngium foetidum* (SACHACULANTRO),  
FRENTE A DOS BACTERIAS”**

**Trabajo de final de carrera para optar el título profesional de Licenciados en  
Bromatología y Nutrición Humana**

**PRESENTADO POR:**

**Br. JIMENEZ SALINAS JENA**

**Br. IMAN TORRES ALEXANDER JAVIER**

**ASESORES:**

**Ing. ALENGUER GERÓNIMO ALVA ARÉVALO. Dr.**

**Blga. JESSY PATRICIA VASQUEZ CHUMBE. Mgr.**

**Co – Asesor:**

**Q.F. JHESUS JEAN PIERRE LOPEZ MESIA**

**IQUITOS – PERÚ**

**2016**

**“ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIBACTERIANA *In Vitro* DE LAS HOJAS DEL  
*Coriandrum sativum* (CULANTRO), Y *Eryngium foetidum* (SACHACULANTRO),  
FRENTE A DOS BACTERIAS”**

## AUTORIZACIÓN DE LOS ASESORES


Ingeniero Alenguer Gerónimo Alva Arévalo Dr., Bióloga Jessy Patricia Vásquez Chumbe Mgr., docentes principales del Departamento de Ingeniería de alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de Amazonía Peruana, Químico farmacéutico Jhesus Jean Pierre López Mesia.

### INFORMAMOS:

Que los bachilleres Jiménez Salinas Jena y Imán Torres Alexander Javier, han realizado bajo nuestra dirección, el trabajo final de carrera intitulado: "ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIBACTERIANA *In Vitro* DE LAS HOJAS DEL *Coriandrum sativum* (CULANTRO), Y *Eryngium foetidum* (SACHACULANTRO), FRENTE A DOS BACTERIAS"; y considerando que el mismo reúne los requisitos necesarios para ser presentado ante el Jurado Calificador, a tal efecto para la obtención del título de Licenciado en Bromatología y Nutrición Humana.

### AUTORIZAMOS:

A los citados bachilleres a presentar el Trabajo Final de Carrera, para proceder a su sustentación cumpliendo, así con la normativa vigente que regula el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.



---

Ing. ALENGUER G. ALVA ARÉVALO. Dr.



---

Blga. JESSY PATRICIA VASQUEZ CHUMBE. Mgr.



---

Q.F. JHESUS JEAN PIERRE LOPEZ MESIA.

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA**  
**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**  
**ESCUELA DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN HUMANA**

**MIEMBROS DE JURADO**

Tesis aprobada en sustentación pública en la ciudad de Iquitos en las instalaciones del SECEDO de la Universidad Nacional de Amazonía Peruana, llevado a cabo el día Viernes 02 de Setiembre del 2016, siendo los miembros del jurado calificador los abajo firmantes:

  
LITTMAN GONZALES RIOS  
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS  
CIP: 36169

Presidente

  
Inga Maria Isabel Maury Laura  
Ingeniero en Industrias Alimentarias  
CIP: 35238

Miembro

  
Fernando Tello Celis  
Ingeniero en Industrias Alimentarias  
CIP: 3

Miembro

  
Félix Humberto Cabrera Sánchez  
Ingeniero en Industrias Alimentarias  
CIP: 77142

Miembro Suplente



**UNAP**

**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

Escuela de Formación Profesional de  
Bromatología y Nutrición Humana

**ACTA DE SUSTENTACIÓN**

En la ciudad de Iquitos, siendo las 18:15 horas del día Viernes 02 de setiembre 2016, en las instalaciones del SECEDO-UNAP, ubicado en la calle Alférez West N° 553 de esta ciudad, se dio inicio a la sustentación pública del Trabajo de Final de Carrera intitulado **"EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIBACTERIANA In. Vitro DEL *Coriandrum sativum* (CULANTRO) Y *Eryngium foetidum* (SACHACULANTRO), FRENTE A DOS BACTERIAS"**, presentado por los bachilleres: **ALEXANDER JAVIER IMAN TORRES** y **JENA JIMENEZ SALINAS**, con el asesoramiento de don **Alenguer Gerónimo Alva Arévalo**, doña **Jessy Patricia Vásquez Chumbe** y don **Jhesus Jean Perre Lopez Mesia**.



Estando el Jurado Calificador conformado por los siguientes miembros, según Resolución Decanal N° 161-FIA-UNAP-2016, del 02 de agosto del 2016.

- |                                     |   |                  |
|-------------------------------------|---|------------------|
| Ing. Littman Gonzales Rios          | - | Presidente       |
| Ing. Maria Isabel Maury Laura       | - | Miembro          |
| Ing. Fernando Tello Tello           | - | Miembro          |
| Ing. Félix Humberto Cabrera Sánchez | - | Miembro Suplente |

Siendo las 19:30 horas del mismo día, se dio por concluida la sustentación, habiendo sido aprobado con la nota de 16 y el calificativo de muy bueno estando los bachilleres aptos para obtener el Título Profesional de Licenciado en Bromatología y Nutrición Humana.

El Jurado Calificador alcanzará a las sustentantes, si el caso lo requiere, las correcciones u observaciones presentadas.

Presidente

LITTMAN GONZALES RIOS  
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS  
CIP: 35163

Miembro Titular

Ing. Maria Isabel Maury Laura  
Ingeniero en Industrias Alimentarias  
CIP: 35258

Miembro Titular

Fernando Tello Celis  
Ingeniero en Industrias Alimentarias  
CIP: 7

Miembro Suplente

Félix Humberto Cabrera Sánchez  
Ingeniero en Industrias Alimentarias  
CIP: 77142



# **DEDICATORIA**

## **JIMENEZ SALINAS JENA**

A DIOS por todas sus bendiciones y permitirme terminar la tesis y culminar así una etapa más en mi vida. A mis padres Miguel A. Jiménez Montenegro y Nolda Z. Salinas Vela, por su apoyo incondicional y amor. A mis hermanos Gustavo y Miguel por estar conmigo siempre. A mi mamá Norma por sus consejos y cariño.

“Confía en el Señor con todo tu corazón y no te apoyes en tu propia prudencia; reconócelo en todos tus caminos, y él enderezará tus veredas. Proverbios 3:5-6.”

## **IMAN TORRES ALEXANDER JAVIER**

A DIOS por darme vida para poder concluir el presente trabajo de tesis, a mi madre y padre Rosa Lupe Torres Tello por su apoyo incondicional, por sus consejos, cariño y por estar ahí cuando más lo necesito, a mi tía Silvia Torres Tello quien es como una madre para mí, por su apoyo que siempre me brinda.

A mis hermanos Rosa y Albert, aunque tengamos diferencias siempre estarán ahí conmigo.

## AGRADECIMIENTO

*“Que mejor que escalar la montaña, si te detienes, puedes ver todo, pero a la vez te puedes caer, mejor es llegar a la cima y verlo todo, más tranquilo, sintiendo deleite de un logo más...”*

Agradecemos en primer lugar a DIOS por la vida y la salud, y permitirnos terminar con éxito nuestra tesis, que será de gran utilidad para futuras investigaciones.

La culminación de este presente trabajo de investigación no habría sido posible sin la ayuda de las siguientes personas:

❖ Al Ing. **ALENGUER GERONIMO, ALVA ARÉVALO DR**, por brindarnos su ambiente de trabajo, por la ayuda, consejos y recomendaciones a la hora de llevar acabo el desarrollo de este presente trabajo.

❖ A la **Blga. JESSY PATRICIA, VASQUEZ CHUMBE**, por habernos permitido usar el laboratorio en el cual ella está a cargo, por haber dedicado una importante parte de su tiempo en compartir sus conocimientos, para el desarrollo y culminación del presente trabajo de tesis.

❖ Al **Q.F. JEAN PIERRE LOPEZ MESIA**, por su ayuda en la parte experimental de la tesis, y en la redacción de la misma.

❖ A **TANY, CORINA, Y KAROL**, por habernos apoyado de manera desinteresada durante el desarrollo de la tesis.

Y a todas las personas que de una u otra forma contribuyeron con la realización de esta tesis.

....Muchas gracias!!!

# INDICE DE CONTENIDO

	Pag.
LISTA DE TABLAS	I
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE ANEXOS	IV
<b>CAPITULO I: INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>CAPITULO II: REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>5</b>
2.1. ANTECEDENTES.....	5
2.2. <i>CORIANDRUM SATIVUM</i> (CULANTRO) .....	6
2.2.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	7
2.2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA .....	8
2.2.3. DISTRIBUCIÓN Y HABITAD.....	8
2.2.4. UTILIZACIÓN .....	8
2.2.5. ESTUDIOS FITOQUIMICOS Y FARMACOLÓGICOS .....	9
2.2.6. TOXICOLOGÍA .....	9
2.3. <i>ERYNGIUM FOETIDUM</i> (SACHACULANTRO).....	10
2.3.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	10
2.3.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA .....	11
2.3.3. DISTRIBUCIÓN Y HABITAD.....	11
2.3.4. ESTUDIOS FITOQUIMICOS Y FARMACOLÓGICOS .....	12
2.3.5. UTILIZACIÓN .....	12
2.3.6. TOXICOLOGÍA .....	13
2.4. ANTIOXIDANTE .....	13
2.4.1. DEFINICIÓN.....	13
2.4.2. ALIMENTOS COMO FUENTE DE ANTIOXIDANTES .....	15
2.4.2.1. ALIMENTO NUTRACEUTICO .....	16
2.4.2.2. ALIMENTOS FUNCIONALES.....	17
2.4.3. RADICALES LIBRES.....	19
2.4.4. ESTRÉS OXIDATIVO .....	20
2.4.5. PRO – OXIDANTE .....	21
2.4.7. COMPUESTOS FENÓLICOS.....	22
2.4.7.1. ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.....	23
2.4.7.2. COMPUESTOS FENOLICOS EN ALIMENTOS.....	24
2.4.8. ANÁLISIS PARA ANTIOXIDANTES FENÓLICOS.....	27
2.4.8.1. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES .....	27
2.4.8.2. DETERMINACIÓN DE TANINOS .....	29
2.4.8.3. DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS .....	32
2.4.8.4. DETERMINACION DE FLAVONOIDES .....	37
2.4.9. ENSAYO DEL DPPH (1,1-DIFENIL-2-PICRIL-HIDRAZILO).....	41
2.4.9.1. LOS RESULTADOS DEL ENSAYO DPPH● SE HAN PRESENTADO DE DIFERENTES MANERAS .....	42
2.4.10. TÉCNICAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS .....	43
2.4.10.1. ENSAYOS ULTRAVIOLETA.....	43
2.4.11. ESPECTROFOTOMETRÍA .....	44
2.4.11.1. PARAMETROS DE MEDICIÓN .....	45
2.5. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	46
2.5.1. CEPAS DE ESTUDIO .....	47
2.5.1.1. <i>Escherichia coli</i> .....	47
2.5.1.2. <i>Salmonella sp.</i> .....	50



2.5.2.	<i>ENSAYOS ANTIMICROBIANOS</i> .....	52
2.5.2.1.	MÉTODO DE DIFUSION EN DISCO .....	53
2.5.2.2.	MÉTODO DE MACRODILUCIÓN .....	53
<b>CAPITULO III: MATERIALES Y METODOS</b> .....		<b>55</b>
3.1.	EQUIPOS .....	55
3.2.	MATERIALES.....	56
3.3.	REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS.....	58
3.4.	TIPO Y DISEÑO MUESTRAL PARA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIBACTERIANA .....	59
EL MÉTODO DE LA INVESTIGACIÓN FUE EL MÉTODO DESCRIPTIVO, EXPERIMENTAL, Y LONGITUDINAL.....		59
3.5.	DISEÑO MUESTRAL .....	60
3.6.	POBLACIÓN Y MUESTRA .....	60
3.6.1.	<i>POBLACIÓN</i> .....	60
3.6.1.1.	POBLACIÓN VEGETAL.....	60
3.6.1.2.	POBLACIÓN MICROBOLÓGICA.....	60
3.6.2.	<i>MUESTRA</i> .....	60
3.7.	PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN .....	61
3.8.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE .....	63
3.8.1.	<i>EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL (DPPH)</i> 63	
3.8.2.	<i>PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO</i> .....	64
3.8.3.	<i>DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE CON EL MÉTODO DEL DPPH</i> .....	64
3.8.4.	<i>DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES</i> .....	64
3.8.5.	<i>DETERMINACIÓN TANINOS</i> .....	65
3.8.6.	<i>DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS, POR EL MÉTODO pH- DIFERENCIAL</i> .....	65
3.8.6.1.	PROCEDIMIENTO.....	65
3.8.7.	<i>DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES</i> .....	66
3.8.8.	<i>DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES</i> .....	67
3.8.10.	<i>ANALISIS DE LOS DATOS</i> .....	68
3.9.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA POR EL MÉTODO DE DIFUSION EN DISCO Y MACRODILUSION.....	68
3.9.1.	<i>MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO</i> .....	68
3.9.1.1.	DISOLUCIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	68
3.9.1.2.	DE LOS CONTROLES.....	68
3.9.1.3.	CULTIVOS EN AGAR.....	68
3.9.1.4.	PREPARACIÓN DEL INOCULO.....	69
3.9.1.5.	INOCULACIÓN DE LAS PLACAS.....	69
3.9.1.6.	APLICACIÓN DE LOS DISCOS .....	70
3.9.1.7.	INCUBACION.....	70
3.9.1.8.	LECTURA DE LAS PLACAS E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS.....	70
3.9.1.9.	VALORES CRITICOS PARA LA MEDIDA DE SENSIBILIDAD EN DISCO .....	70
3.9.2.	<i>MÉTODO DE MACRODILUSIÓN</i> .....	71
3.9.2.1.	PREPARACIÓN DEL INÓCULO Y DE LAS DILUCIONES .....	71
3.9.2.2.	PREPARACION DE CONTROLES .....	71
3.9.2.3.	INCUBACIÓN.....	72
3.9.2.4.	LECTURA E INTERPRETACIÓN DEL CIM .....	72
<b>CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....		<b>73</b>
4.1.	EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, FENOLES TOTALES, TANINOS, ANTOCIANINAS, FLAVONOIDES, CAROTENOS Y RETINOL DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS DE <i>CORIANDRUM SATIVUM</i> (CULANTRO DEL PAIS). .....	73

4.1.1.	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DEL DPPH EN LAS HOJAS DE <i>Coriandrum sativum</i> (CULANTRO DEL PAIS).....	73
4.1.2.	DETERMINACION DE FENOLES TOTALES EN LAS HOJAS DE <i>Coriandrum sativum</i> (CULANTRO DEL PAIS). 75	75
4.1.3.	DETERMINACION DE TANINOS EN LAS HOJAS DE <i>Coriandrum sativum</i> (CULANTRO DEL PAIS). 76	76
4.1.4.	DETERMINACION DE ANTOCIANINAS EN LAS HOJAS DE <i>Coriandrum sativum</i> (CULANTRO DEL PAIS). 77	77
4.1.5.	DETERMINACION DE FLAVONOIDES EN LAS HOJAS DE <i>Coriandrum sativum</i> (CULANTRO DE PAIS). 79	79
4.2.	EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, FENOLES TOTALES, TANINOS, ANTOCIANINAS, FLAVONOIDES, CAROTENOS Y RETINOL DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS DE <i>ERYNGIUM FOETIDUM</i> (SACHACULANTRO).....	81
4.2.1.	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DEL DPPH EN LAS HOJAS DE <i>Eryngium foetidum</i> (SACHACULANTRO).....	81
4.2.2.	DETERMINACION DE FENOLES TOTALES DE LAS HOJAS DE <i>Eryngium foetidum</i> (SACHACULANTRO).....	83
4.2.3.	DETERMINACION DE TANINOS EN LAS HOJAS DE <i>Eryngium foetidum</i> (SACHACULANTRO). .....	84
4.2.5.	DETERMINACION DE FLAVONOIDES EN LAS HOJAS DE <i>Eryngium foetidum</i> (SACHACULANTRO). 87	87
4.2.7.	RESUMEN ENTRE LAS HOJAS DE CULANTRO Y SACHACULANTRO .....	89
4.3.	EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS DEL <i>CORIANDRUM SATIVUM</i> (CULANTRO DEL PAIS), Y <i>ERYNGIUM FOETIDUM</i> (SACHACULANTRO).....	91
4.3.1.	MÉTODO DIFUSIÓN EN DISCO DE LAS HOJAS DE <i>Coriandrum sativum</i> (CULANTRO DEL PAIS) ..	91
4.3.2.	METODO DE MACRODILUCIÓN DE LAS HOJAS DE <i>Coriandrum sativum</i> (CULANTRO DEL PAIS) .	92
4.3.3.	MÉTODO DIFUSIÓN EN DISCO DE LAS HOJAS DE <i>Eryngium foetidum</i> (SACHACULANTRO) .....	94
4.3.4.	METODO DE MACRODILUCIÓN DE LAS HOJAS DE <i>Eryngium foetidum</i> (SACHACULANTRO).....	95
	<b>CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>98</b>
5.1.	CONCLUSIONES .....	98
5.2.	RECOMENDACIONES .....	99
	<b>CAPITULO VI: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS Y BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>100</b>
6.1.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	100
6.2.	BIBLIOGRAFIA .....	102
	<b>ANEXO.....</b>	<b>110</b>

## LISTA DE TABLAS

TABLA N° 1: Clasificación Taxonómica del Culantro .....	8
TABLA N° 2: Clasificación Taxonómica del <i>Eryngium foetidum</i> .....	11
TABLA N° 3: Clasificación de la radiación Electromagnética y efectos de la radiación sobre las moléculas. (Miller 2003).....	44
TABLA N° 4: Clasificación Taxonómica de <i>Escherichia coli</i> . (Escherich, T. (1885) «Die darmbakterien des neugeborenen und säuglings». <i>Fortschritte der Medizin</i> , 3: 515-522,547-554) .....	48
TABLA N° 5: Clasificación Taxonómica de salmonella Sp. ( <a href="https://es.wikipedia.org/wiki/Salmonella#cite_note-1">https://es.wikipedia.org/wiki/Salmonella#cite_note-1</a> ).....	50
TABLA N° 6: Materiales utilizados en el trabajo de investigación .....	56
TABLA N° 7: Reactivos y medios de cultivos usados en el proyecto de tesis .....	58
TABLA N° 8: Promedios de las repeticiones y lecturas realizadas a las hojas de <i>Coriandrum sativum</i> (Culantro).....	73
TABLA N° 9: Porcentaje de inhibición de las hojas de <i>Coriandrum sativum</i> (Culantro). .....	74
TABLA N° 10: Contenido de fenoles totales de las hojas de <i>Coriandrum sativum</i> (Culantro).....	76
TABLA N° 11: Contenido de Catequinas y proantocianidoles (Taninos) de las hojas de <i>Coriandrum sativum</i> (Culantro). .....	77
TABLA N° 12: Absorciones y cálculo de antocianinas presentes en las hojas de <i>Coriandrum sativum</i> (Culantro).....	78
TABLA N° 13: Determinación de flavonoides de las hojas de <i>Coriandrum sativum</i> (Culantro). .....	79
TABLA N° 14: Lecturas realizadas a las hojas de <i>Coriandrum sativum</i> (CULANTRO) para determinar $\beta$ -CAROTENO .....	80
TABLA N° 15: lecturas realizadas a las hojas DE <i>Coriandrum sativum</i> (CULANTRO) para determinar retinol.....	80
TABLA N° 16: Promedios de las repeticiones y lecturas realizadas a las hojas de <i>Eryngium foetidum</i> (Sachaculantro). .....	81
TABLA N° 17: Porcentaje de inhibición de las hojas de <i>Eryngium foetidum</i> (Sachaculantro). .....	82
TABLA N° 18: Contenido de fenoles totales de la hoja de <i>Eryngium foetidum</i> (Sachaculantro). .....	83
TABLA N° 19: Contenido de Catequinas y proantocianidoles (Taninos) de la hoja de <i>Eryngium foetidum</i> (Sachaculantro).....	84
TABLA N° 20: Absorciones y cálculo de antocianinas presentes en la hoja del <i>Eryngium foetidum</i> (Sachaculantro). .....	86
TABLA N° 21: Determinación de flavonoides de las hojas de <i>Eryngium foetidum</i> (Sachaculantro). ....	87
TABLA N° 22: LECTURAS REALIZADAS A LAS HOJAS DE SACHACULANTRO PARA DETERMINAR $\beta$ -CAROTENO .....	88
TABLA N° 23: LECTURAS REALIZADAS A LAS HOJAS DE SACHACULANTRO PARA DETERMINAR RETINOL .....	88
TABLA N° 24: Comparación de la actividad antioxidante y/o compuestos presentes. ....	89
TABLA N° 25: Media de los halos de inhibición (mm) del extracto de <i>Coriandrum sativum</i> (CULANTRO) diferentes concentraciones frente a <i>Escherichia coli</i> . .....	91

TABLA N° 26: Media de los halos de inhibición (mm) del extracto de <i>Coriandrum sativum</i> (CULANTRO) diferentes concentraciones frente a <i>Salmonella sp.</i> .....	92
TABLA N° 27: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de las hojas de <i>Coriandrum sativum</i> (Culantro) frente a <i>Escherichia coli.</i> .....	93
TABLA N° 28: Concentración Mínima Inhibitoria del control positivo frente a <i>Escherichia coli.</i> .....	93
TABLA N° 29: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de las hojas de <i>Coriandrum sativum</i> (Culantro) frente a <i>Salmonella sp.</i> .....	93
TABLA N° 30: Concentración Mínima Inhibitoria del control positivo frente a <i>Salmonella Sp.</i> .....	93
TABLA N° 31: Media de los halos de inhibición (mm) del extracto de <i>Eryngium foetidum</i> (SACHACULANTRO) a diferentes concentraciones frente a <i>Escherichia coli.</i> .....	95
TABLA N° 32: Media de los halos de inhibición (mm) del extracto de <i>Eryngium foetidum</i> (SACHACULANTRO) a diferentes concentraciones frente a <i>Salmonella sp.</i> .....	95
TABLA N° 33: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de <i>Eryngium foetidum</i> frente a <i>Escherichia coli.</i> .....	96
TABLA N° 34: Concentración Mínima Inhibitoria del control positivo frente a <i>Escherichia coli</i> .....	96
TABLA N° 35: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de <i>Eryngium foetidum</i> frente a <i>Salmonella sp.</i> .....	97
TABLA N° 36: Concentración Mínima Inhibitoria del control positivo frente a <i>Salmonella sp.</i> .....	97

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA N° 1: <i>Coriandrum sativum</i> (Culantro).....	6
FIGURA N° 2: <i>Eryngium foetidum</i> (Sachaculantro).....	10
FIGURA N° 3: Estructura del Fenol.....	23
FIGURA N° 4: Estructura básica de los flavonoides.....	23
FIGURA N° 5: Taninos (Polímeros de catequina).....	24
FIGURA N° 6: Árbol familiar de los compuestos fenólicos.....	27
FIGURA N° 7: Mecanismo de reacción de vainillina con taninos.....	31
FIGURA N° 8: Estructura molecular de las antocianinas.....	33
FIGURA N° 9: Estructura y sustituyentes de las antocianinas.....	35
FIGURA N° 10: Estructura de las antocianinas a diferentes valores de pH.....	36
FIGURA N° 11: Estructura de La quercetina.....	39
FIGURA N° 12: Estructura básica de un flavonoide.....	40
FIGURA N° 13: Flavonoides, Estructura básica y tipos.....	41
FIGURA N° 14: Características estructurales de los principales tipos de flavonoides.....	41
FIGURA N° 15: Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el Antioxidante.....	42
FIGURA N° 16: <i>Escherichia coli</i> .....	47
FIGURA N° 17: <i>Salmonella Sp.</i> .....	50
FIGURA N° 18: PROCESO DE OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DEL <i>Coriandrum sativum</i> (CULANTRO), Y <i>Eryngium foetidum</i> (SACHACULANTRO).....	62
FIGURA N° 19: Direcciones en el sembrado del inóculo sobre la superficie del agar.....	69
FIGURA N° 20: Porcentaje de inhibición a las diferentes concentraciones de las hojas de <i>Coriandrum sativum L.</i> (Culantro).....	74
FIGURA N° 21: Curva padrón de ácido gálico para cálculo de fenoles totales.....	75
FIGURA N° 22: Curva estándar de taninos para cálculo de Taninos.....	76
FIGURA N° 23: Absorción del extracto etanólico de la hoja de <i>Coriandrum sativum L.</i> (Culantro) de 400 a 700 nm a pH 4.5 para la determinación de antocianinas.....	77
FIGURA N° 24: Absorción del extracto etanólico de la hoja de <i>Coriandrum sativum L.</i> (Culantro) de 400 a 700 nm a pH 1 para la determinación.....	78
FIGURA N° 25: Porcentaje de inhibición a las diferentes concentraciones de Sachaculantro ( <i>Eryngium foetidum</i> ).....	82
FIGURA N° 26: Absorción del extracto etanólico de la hoja de <i>Eryngium foetidum</i> (Sachaculantro) de 400 a 700 nm a pH 4.5 para la determinación de antocianinas.....	85
FIGURA N° 27: Absorción del extracto etanólico de la hoja de <i>Eryngium foetidum</i> (Sachaculantro) de 400 a 700 nm a pH 1 para la determinación de antocianinas.....	85
FIGURA N° 28: Cuadro comparativo de compuestos fenólicos presentes en la hojas de <i>Coriandrum sativum</i> (Culantro) y hoja de <i>Eryngium foetidum</i> (Sachaculantro).....	89

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO N° 1: Absorbancias del extracto de la hoja de <i>Coriandrum sativum</i> L. (Culantro del pais) con el método DPPH, primera lectura .....	111
ANEXO N° 2: Absorbancias del extracto de la hoja de <i>Coriandrum sativum</i> L. (Culantro del pais) con el método DPPH, segunda lectura. ....	111
ANEXO N° 3: Absorbancias del extracto de la hoja de <i>Coriandrum sativum</i> L. (Culantro del pais) con el método DPPH, tercera lectura .....	112
ANEXO N° 4: Absorbancias del extracto de la hoja de <i>Eryngium foetidum</i> (Sachaculantro) con el método DPPH, primera lectura .....	112
ANEXO N° 5: Absorbancias del extracto de la hoja de <i>Eryngium foetidum</i> (Sachaculantro) con el método DPPH, segunda lectura. ....	113
ANEXO N° 6: Absorbancias del extracto de la hoja de <i>Eryngium foetidum</i> (Sachaculantro) con el método DPPH, tercera lectura .....	113
ANEXO N° 7: Determinación de fenoles totales de la hoja de <i>Coriandrum sativum</i> L. (Culantro del pais).....	114
ANEXO N° 8: Determinación de Catequinas y Proantocianidoles (Taninos) de la hoja de <i>Coriandrum sativum</i> L. (Culantro del pais). ....	114
ANEXO N° 9: Determinación de antocianinas de la hoja de <i>Coriandrum sativum</i> L. (Culantro del pais). ....	115
ANEXO N° 10: Absorbancias obtenidas entre 400-700 nm para la determinación de antocianinas de la hoja de <i>Coriandrum sativum</i> L. (Culantro del Pais). ....	115
ANEXO N° 11: Absorción del extracto etanólico de la hoja de <i>Coriandrum sativum</i> L. (Culantro del Pais) de 400 a 700 nm a pH 4.5 para la determinación de antocianinas.....	116
ANEXO N° 12: Absorción del extracto etanólico de la hoja de <i>Coriandrum sativum</i> L. (Culantro del Pais) de 400 a 700 nm a pH 1 para la determinación.....	117
ANEXO N° 13: LECTURAS REALIZADAS A LAS HOJAS DE CULANTRO PARA DETERMINAR $\beta$ -CAROTENO .....	118
ANEXO N° 14: Determinación de flavonoides de la hoja de <i>Coriandrum sativum</i> L. (Culantro del pais). ....	118
ANEXO N° 15: LECTURAS REALIZADAS A LAS HOJAS DE CULANTRO PARA DETERMINAR RETINOL .....	119
ANEXO N° 16: Determinación de fenoles totales de la hoja de <i>Eryngium foetidum</i> (Sachaculantro).119	
ANEXO N° 17: Determinación de Catequinas y Proantocianidoles (Taninos) de la hoja de <i>Eryngium foetidum</i> (Sachaculantro).....	120
ANEXO N° 18: Determinación de antocianinas de la hoja de <i>Eryngium foetidum</i> (Sachaculantro). ..	120
ANEXO N° 19: Absorbancias obtenidas entre 400-700 nm para la determinación de antocianinas de la hoja de <i>Eryngium foetidum</i> (Sachaculantro).....	121

ANEXO N° 20: Absorción del extracto etanólico de la hoja de <i>Eryngium foetidum</i> (Sachaculantro) de 400 a 700 nm a pH 4.5 para la determinación de antocianinas. ....	123
ANEXO N° 21: Absorción del extracto etanólico de la hoja de <i>Eryngium foetidum</i> (Sachaculantro) de 400 a 700 nm a pH 1 para la determinación de antocianinas. ....	123
ANEXO N° 22: Determinación de flavonoides de la hoja de <i>Eryngium foetidum</i> (Sachaculantro) .....	124
ANEXO N° 23: LECTURAS REALIZADAS A LAS HOJAS DE SACHACULANTRO PARA DETERMINAR $\beta$ -CAROTENO .....	124
ANEXO N° 24: LECTURAS REALIZADAS A LAS HOJAS DE SACHACULANTRO PARA DETERMINAR RETINOL .....	125
ANEXO N° 25: Resumen de fenoles totales de las hojas de Culantro ( <i>Coriandrum sativum</i> L.) y de Sachaculantro ( <i>Eryngium foetidum</i> ). ....	126
ANEXO N° 26: Resumen de Taninos de las hojas de Culantro ( <i>Coriandrum sativum</i> L.) y de Sachaculantro ( <i>Eryngium foetidum</i> ). ....	126
ANEXO N° 27: Resumen de Antocianinas de las hojas de Culantro ( <i>Coriandrum sativum</i> L.) y de Sachaculantro ( <i>Eryngium foetidum</i> ). ....	127
ANEXO N° 28: Resumen de Flavonoides de las hojas de Culantro ( <i>Coriandrum sativum</i> L.) y de Sachaculantro ( <i>Eryngium foetidum</i> ). ....	127
ANEXO N° 29: Procedimiento para la preparación y el control de calidad de la turbidez estándar de Mc- Farland. ....	128
ANEXO N° 30: Procedimiento para obtención del extracto etanólico de <i>Coriandrum sativum</i> (Culantro) y de <i>Eryngium foetidum</i> (Sachaculantro). ....	129
ANEXO N° 31: Procedimiento para la evaluación de la actividad antibacteriana por el método difusión en disco. ....	130
ANEXO N° 32: Procedimiento para la evaluación de la actividad antibacteriana por el método macrodilución .....	134
ANEXO N° 33: Determinación de la actividad antioxidante por el método del 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH). ....	137
ANEXO N° 34: Determinación de Compuestos Fenolicos. ....	139

## RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se determinó la actividad antioxidante y antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Coriandrum sativum* (culantro del país) y *Eryngium foetidum* (sachaculantro). Para la evaluación de antioxidantes se utilizó el extracto etanólico acidificado con 1% de ácido fórmico, se hizo pruebas de la Actividad Antioxidante (AA) y con los datos obtenidos por medio del espectrofotómetro UV-Vis se determinó la presencia de diferentes compuesto, siendo los mas representativos para *Coriandrum sativum* (culantro del país) las antocianinas ( $38,3686 \pm 3,6416$ mg de cianidina-3-glucosido/100g de muestra original) y los flavonoides ( $30,45 \pm 0,09$ gramos de quercetina/100g muestra original) y para *Eryngium foetidum* (sachaculantro) los fenoles totales ( $192,415 \pm 0,097$ mg EAG/100 g muestra original) y los flavonoides ( $10,34 \pm 0,0$ g de quercetina/100g muestra original); también se determinó la presencia de carotenos y retinol. Asi mismo se evaluó la Actividad Antibacteriana de los extractos etanólicos de *Coriandrum sativum* (culantro del país) y *Eryngium foetidum* (sachaculantro) frente a dos bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella sp.*, por el método de difusión en disco y por el método de macrodilución, dándonos resultados negativos, afirmando de esta manera que las cepas bacterianas son resistentes a los extractos etanólico.

**PALABRAS CLAVES:** *Coriandrum sativum*, Culantro, *Eryngium foetidum*, Sachaculantro, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, Actividad Antioxidante, Actividad Antibacteriana.



## ABSTRACT

In this research the antioxidant and antibacterial activity of ethanol extract from the leaves of *Coriandrum sativum* (culantro) and *Eryngium foetidum* (Sachaculanthro) was determined. The ethanolic extract acidified with 1% formic acid was used for the evaluation of antioxidants, proof of antioxidant activity (AA) and the data obtained through spectrophotometer UV-Vis the presence of different compound was determined, being the most representative for *Coriandrum sativum* (culantro) anthocyanins ( $38.3686 \pm 3,6416\text{mg}$  cyanidin-3-glucoside / 100g original sample) and flavonoids (quercetin  $0,09\text{gramos} \pm 30.45$  / 100g original sample) and *Eryngium foetidum* (sachaculanthro) total phenols ( $192.415 \pm 0,097\text{mg}$  EAG / 100 g original sample) and flavonoids (quercetin  $10.34 \pm 0,0\text{g}$  / 100g original sample); the presence of carotenes and retinol was also determined. The same manner the antibacterial activity of ethanol extracts of *Coriandrum sativum* (culantro) and *Eryngium foetidum* (sachaculanthro) against two bacteria: *Escherichia coli* and *Salmonella sp* was evaluated, by the method of disc diffusion and Macrodilution showing us negative results, thus asserting that the bacterial strains are resistant to ethanol extracts.

**Key words:** *Coriandrum sativum*, Coriander, *Eryngium foetidum*, Sachaculanthro, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, Antioxidant Activity, Antibacterial Activity.

## CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

El Perú es un país con una geografía muy popular que determina la existencia de una gran variabilidad de pisos climáticos, en sus amplias listas de flores y fauna se citan especies endémicas, nativas e introducidas, además goza de una gran riqueza ancestral en la utilización de plantas como medicamentos, como alimentos, empleados para un sinnúmero de enfermedades; haciéndolas parte de la cultura de los pueblos. El consumo de hortalizas es vital para la salud humana puesto que poseen innumerables propiedades alimenticias, y son fuente inagotable de vitaminas, minerales, fibra y energía. (García *et al.*, 2002).

Diversos estudios experimentales sobre salud humana confirman la asociación entre la elevada ingesta de vegetales y frutas con el bajo riesgo de padecer enfermedades crónicas. Las hortalizas son una rica fuente de una variedad de nutrientes que incluye vitaminas, minerales, fibras, y otras clases de principios activos. Estos principios pueden tener mecanismos de acción superpuestos y complementarios, que incluyen la modulación de las enzimas de detoxificación, el estímulo del sistema inmunológico, la reducción de agregación plaquetaria, la modulación de la síntesis del colesterol y del metabolismo hormonal, la reducción de la presión sanguínea, así como efectos antibacterianos, antivirales y antioxidantes. (Parra y Justo, 2003).

A la familia botánica Apiaceae (la familia del apio), anteriormente llamada familia Umbelliferae pertenecen 455 géneros y unas 3600 especies de plantas. Entre las especies sobresalientes están el *Coriandrum sativum* (culantro del país) y el *Eryngium foetidum* (sachaculantro). (Morales-Payán, 2011).

En el Perú, el uso cotidiano de especias aromáticas como el siuca culantro, también llamado sacha culantro, y el culantro es utilizado en cada uno de sus platos típicos: sopas, parrillas de carne de sajino, cerdo, res, preparados con gallina, tragos exóticos, el uso indispensable en el plato emblemático “Juanes” con el aroma característico que hace más apetecible al comensal. Así mismo, a nivel mundial el uso del siuca culantro o sacha culantro como aromático alimentario es diverso por las características de su aceite esencial. (Collazos *et al.*, 2013).

Por todo lo descrito líneas atrás se tomó la iniciativa de estudiar e investigar estas dos hortalizas, el *Coriandrum sativum* (culantro del país) y el *Eryngium foetidum* (sachaculantro), intentando de esta manera informar a la población los beneficios que nos da el consumo de las mismas para mejorar la calidad de vida de las personas. Se logró determinar la actividad antioxidante y antibacteriana que estas dos plantas poseen,

plasmandando todo el estudio en seis capítulos muy interesantes. Empezando con el CAPITULO I: Introducción, CAPITULO II: Revisión de la Literatura, en esta parte del trabajo pudimos recopilar información de diferentes autores sobre actividad antioxidante, compuestos fenólicos,  $\beta$ -carotenos y retinol, así mismo, sobre actividad antimicrobiana, *Escherichia coli* y *Salmonella sp.*

CAPITULO III: Materiales y Métodos, en este capítulo se explican todos los materiales que se utilizaron para este estudio, de igual modo los métodos utilizados: para la evaluación de la actividad antioxidante por el método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), para la determinación de antocianinas por el método de ph-diferencial de Sotero y Garcia (2009), para la determinación de fenoles totales por la metodología de Singleton y Rossi (1965) modificada por Vela y Cuzcano (2015), para la determinación de flavonoides por el método de Sotero y Garcia (2009), para la determinación de taninos por el método de Valls *et al.*(2000), de la misma manera para la actividad antibacteriana se utilizó el método de difusión en agar por el método de Kirby-Bauer y macrodilución por el método de la National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

El CAPITULO IV: Resultados y discusiones. De la Actividad Antioxidante (AA), la obtención de datos del espectrofotómetro UV-Vis nos indica la presencia de compuestos fenólicos en las hojas de *Coriandrum sativum* (culantro del país) en orden decreciente flavonoides, antocianinas, fenoles totales y taninos; en el caso de las hojas de Sachaculantro flavonoides, fenoles totales y antocianinas. También se determinó la presencia de carotenos y retinol, así mismo, los resultados de la evaluación de la actividad Antibacteriana de los extractos etanólicos de *Coriandrum sativum* (culantro del país) y *Eryngium foetidum* (sachaculantro) frente a dos bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella sp.*, se puede afirmar que las cepas bacterianas son resistentes a los extractos etanólicos para ambos métodos utilizados; en el CAPITULO V: Conclusiones y Recomendaciones, obtuvimos que tanto las hojas de *Coriandrum sativum* (culantro del país) como de *Eryngium foetidum* (sachaculantro) presentan actividad antioxidante y compuestos fenólicos los cuales serían los posibles responsables de dicha actividad, sin embargo, para actividad antimicrobiana las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* Son resistentes a dichos extractos. Terminando en el CAPITULO VI: Bibliografía y Referencias bibliográficas utilizadas en el presente trabajo.

## CAPITULO II: REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. ANTECEDENTES

- ❖ Según Martha I. Ardila Q; Andrés F. Vargas A; Jorge E. Pérez C.; Luis F. Mejía (2009). Muchos estudios en el mundo se han realizado con los aceites esenciales obtenidos de diferentes plantas clasificadas como medicinales o como especias; la intención de estos estudios ha sido diferente en el sentido de buscar compuestos que inhiban el crecimiento ya sea de bacterias, hongos, virus y parásitos en alimentos, en aguas residuales o también para ser utilizados como medicamentos. En aquellos aceites esenciales que han presentado mayor capacidad inhibitoria se han encontrado como mayores componentes del mismo, compuestos tales como el timol, el carvacrol, el linalool, el aldehído cinámico, la alicina y el eugenol. El aceite esencial de *Coriandrum sativum* ha sido utilizado para tratar algunas dolencias no relacionadas con las enfermedades infecciosas; sin embargo, se ha demostrado que dicho aceite esencial tiene actividad antimicrobiana frente a diferentes géneros de bacterias Gram positivas (*Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*) y Gram negativas; el efecto de esta planta se ha buscado tanto en las hojas como en las semillas y en los tallos de los mismos.
  
- ❖ Pérez SF (2012), evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* y la composición química del aceite esencial de las hojas frescas de *Eryngium foetidum* L. “siucaculantro”, Por el método de difusión en agar se determinó la actividad antimicrobiana, frente a los siguientes microorganismos: *S. aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis* ATCC1228, *B. subtilis* ATCC6633, *E. coli* ATCC8739 y *P. aeruginosa* ATCC 9027 mostrando actividad antibacteriana frente a estas cepas bacterianas. *Eryngium foetidum* L. es una especie vegetal que habita en suelos inundables y de altura; también en huertos hortícolas y en campo abierto como en sombreado, siendo tolerante a la inundación. Las partes aprovechables de esta planta son el tallo, hojas y frutos. Es originaria de la amazonia occidental y cultivada en toda América tropical. En el Perú está ampliamente distribuida en Loreto, San Martín y Ucayali. El sabor y aroma que tiene es muy similar al del *Coriandrum sativum* “culantro”, siendo utilizada por su aromaticidad en sopas, guisos ensaladas y platos típicos de la región Amazónica.

- ❖ Rodríguez J. (2014). Trabajo con el aceite esencial del sachaculanthro para elucidar la composición química del aceite esencial de las hojas frescas de *Eryngium foetidum* L. “siuca culantro” y su actividad antioxidante *in vitro*; que permitió elucidar e identificar los siguientes componentes químicos: p-cimeno, 1-undecene, undecane, decanal, 1-decanol, 2,6,10-trimetiltetradecano, undecanal, 2,4,6-trimetilfenol, 2,4,5-trimetilbenzaldehido, ácido cáprico, dodecanal, trans-2-undecen-1-ol, 2-dodecenal, ácido 2,4,6-trimetilbenzoico, nonadecano, ácido láurico, tetradecanal, ácido linoleico, ácido mirístico, 1-nonadecene, ácido palmítico y ácido oleico. En la determinación de la actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial presenta un efecto de captación de 70 % equivalente a 150mg / mL.
- ❖ Trevejo *et al.* (2001), trabajaron con el aceite esencial de *Eryngium foetidum* L. para la caracterización e identificación de los componentes del aceite esencial y destinar los aceites a la industria de los alimentos para su uso como saborizante. Donde se pudo identificar los siguientes compuestos: Benceno-1-(1,5 dimetil, 4 hexanil)-4 metil; b-sesquifelandreno; Ciclohexenil-1-metil-4-(5 metil, 2,4 hexadienil); b-farneseno; C15-aldehido.

## 2.2. *Coriandrum sativum* (CULANTRO)



**FIGURA N° 1: *Coriandrum sativum* (Culantro)**

Fuente: [https://es.wikipedia.org/wiki/Coriandrum#cite\\_note-2](https://es.wikipedia.org/wiki/Coriandrum#cite_note-2)

### 2.2.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

El *Coriandrum sativum* (culantro del país) es una especie cultivada que integra grupos de hierbas medicinales, aromáticas y de condimento de mayor consumo; ésta es industrializada para la extracción de aceites esenciales y productos farmacéuticos; así como también se destaca por ser repelente de insectos a nivel de campo y almacenaje. El culantro, con el pasar de los años se ha ido expandiendo en el mercado tanto nacional como internacional. (Morales, 1995).

Es una planta anual que alcanza alrededor de 75 cm de altura. Presenta el tallo estirado y dos clases de hojas, las inferiores que se parecen al perejil y las superiores que son copiosas y finamente divididas. Florece en forma de sombrillitas con flores blancas pequeñas. (Morales-Payán, 2011).

El culantro pertenece a la familia botánica Apiaceae (la familia del apio), anteriormente llamada familia Umbelliferae. A esta familia pertenecen 455 géneros y unas 3600 especies de plantas, de las cuales algunas de las más conocidas son el apio vianda o apio de raíz (*Arracacia xanthorrhiza*), el apio de ensalada (o *celery* en inglés, *Apium graveolens*), la zanahoria (*Daucus carota*), el perejil (*Petroselinum sativum*), el anís (*Pimpinella anisum*), el eneldo (*Anethum graveolens*), el hinojo (*Foeniculum vulgare*) y el comino (*Cuminum cyminum*). (Morales-Payán, 2011).

El culantro es una planta herbácea, con un crecimiento inicial lento que luego se vuelve acelerado. Todos los órganos del culantro contienen aceites aromáticos que se liberan cuando las células se rompen, al frotar, cortar o prensar partes de la planta. Las hojas tienen la lámina prácticamente plana, de color verde claro u oscuro. En casi todas las variedades el pecíolo es verde, aunque algunas lo tienen de color púrpura. El tallo es erguido y ramificado, llegando a medir hasta 35 pulgadas (90 cm) de alto cuando la planta entra en su etapa de reproducción. La planta va floreciendo por etapas, de modo que no salen flores en toda la planta a la vez. Las flores están agupadas en inflorescencias en los extremos de las ramas y atraen polinizadores. Dependiendo de la variedad, sus flores son de color blancuzco, rosa, o morado. Las semillas van madurando en el mismo orden en que se produjeron las flores. (Filgueira, 2000).

## 2.2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

TAXONOMÍA	
Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Orden:	<i>Apiales</i>
Familia:	<i>Apiaceae</i>
Subfamilia:	<i>Apioideae</i>
Tribu:	<i>Coriandreae</i>
Género:	<i>Coriandrum</i>
Especie:	<i>Coriandrum sativum</i> L.

**TABLA N° 1: Clasificación Taxonómica del Culantro**

Fuente: [https://es.wikipedia.org/wiki/Coriandrum\\_sativum](https://es.wikipedia.org/wiki/Coriandrum_sativum)

## 2.2.3. DISTRIBUCIÓN Y HABITAD

Raymond (1982) y Reed (1993), comentaron que el culantro pertenece a la clase Dicotiledónea, es un miembro de la familia Apiaceae y se considera que es originario de Europa Meridional, Asia Menor y Norte de África, encontrándose espontáneamente en algunas regiones Españolas. Su introducción a América Latina fue en 1519 durante la colonización y después a través de Massachussets, Estados Unidos en 1670 por inmigrantes Europeos (Anónimo, 1999). Se cultiva en Europa, Medio Oriente, Norte de la India, Asia Menor y América. (Rodale,1991).

## 2.2.4. UTILIZACIÓN

El follaje fresco o deshidratado de culantro se usa como condimento y como material medicinal. El culantro es usado ampliamente en salsas, pastas y sofritos en las cocinas asiática y americana. Sus propiedades culinarias, medicinales y aromáticas están íntimamente ligadas a su contenido de aceites esenciales o volátiles. Del culantro se dice que es anestésico, reduce flatulencias y es afrodisíaco. También es usado para el tratamiento de la ansiedad y el insomnio.

Medicinalmente, estudios han demostrado que el consumo frecuente de culantro puede contribuir a reducir la concentración de colesterol, glucosa y triglicéridos en

seres humanos, y que es sus hojas existen químicas con propiedades antibacterianas. Nutricionalmente, las hojas contienen calcio y vitaminas A, B<sub>2</sub> y C, y las semillas poseen antioxidantes. Por su sabor característico, en repostería se usan las semillas, ya sean maduras o inmaduras, molidas o enteras. (Chithra y Leelamma, 2004).

### **2.2.5. ESTUDIOS FITOQUÍMICOS Y FARMACOLÓGICOS**

Según Martha I. Ardila Q; Andrés A; Jorge C.; Luis M. (2009). Muchos estudios en el mundo se han realizado con los aceites esenciales obtenidos de diferentes plantas clasificadas como medicinales o como especias; la intención de estos estudios ha sido diferente en el sentido de buscar compuestos que inhiban el crecimiento ya sea de bacterias, hongos, virus y parásitos en alimentos, en aguas residuales o también para ser utilizados como medicamentos. En aquellos aceites esenciales que han presentado mayor capacidad inhibitoria se han encontrado como mayores componentes del mismo, compuestos tales como el timol, el carvacrol, el linalool, el aldehído cinámico, la alicina y el eugenol. El aceite esencial de *Coriandrum sativum* ha sido utilizado para tratar algunas dolencias no relacionadas con las enfermedades infecciosas; sin embargo, se ha demostrado que dicho aceite esencial tiene actividad antimicrobiana frente a diferentes géneros de bacterias Gram positivas (*Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*) y Gram negativas; el efecto de esta planta se ha buscado tanto en las hojas como en las semillas y en los tallos de los mismos.

### **2.2.6. TOXICOLOGÍA**

El *Coriandrum sativum* (culantro del país) es una hierba segura cuando se utiliza en las cantidades recomendadas, tal como considera la agencia Americana *Food and Drug Administration* (FDA); aunque contiene algunas sustancias tóxicas, el culantro contiene dos principios tóxicos presentes en el aceite esencial, y que le dan olor a la planta: el linalol y furanocumarinas (bergapteno y umbeliferona).

Estos principios tóxicos del aceite esencial son los causantes de la reacción de dermatitis por contacto.



### 2.3. *Eryngium foetidum* (SACHACULANTRO)



**FIGURA N° 2: *Eryngium foetidum* (Sachaculantro)**

Fuente:<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/14/EryngiumfoetidumMM.jpg/240px-EryngiumfoetidumMM.jpg>

#### 2.3.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

El Sachaculantro es una planta herbácea perenne. Todas las partes de la planta producen aceites esenciales que le imparten su fuerte aroma. Las raíces son guesas y se extienden generalmente a menos de un pie (31 cm) de distancia del tallo. El tallo es muy corto durante la etapa de crecimiento vegetativo de la planta, pero llega a 2 pies (61 cm) de alto en la etapa de producción de flores y semillas. Las hojas aparecen formando una roseta alrededor de la base del tallo, son alargadas, generalmente entre 5 y 12 pulgadas (13 a 31 cm) de largo, y unas 2 pulgadas (5 cm) de ancho, con los bordes aserrados. En su etapa adulta la planta tiene de siete a diez hojas. Las plantas comienzan a florecer aproximadamente a los 3 meses después de la siembra, siendo más tempranas las plantas que crecen a pleno sol o las que crecen en días largos y cálidos (verano), mientras que son más tardías las que crecen con 60-70% de sombra. Las flores son pequeñas y blancuzcas, y salen en gupos en las puntas de ramas del tallo, sobre estructuras en forma de cabezuelas o cilindros de hasta media pulgada (1.3 cm) de largo y 1/5 de pulgada (0.5 cm) de diámetro. Las semillas son pequeñísimas y livianas (de aproximadamente 66,000 a 78,500 semillas por onza), de color pardo cuando están maduras. (Morales – Payán, 2011).

### 2.3.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

TAXONOMÍA	
Reino:	<i>Plantae</i>
Orden:	<i>Apiales</i>
Familia:	<i>Apiaceae</i>
Subfamilia:	<i>Saniculoideae</i>
Tribu:	<i>Saniculeae</i>
Género:	<i>Eryngium</i>
Especie:	<i>E. foetidum</i> L.

TABLA N° 2: Clasificación Taxonómica del *Eryngium foetidum* (Sacha Culantro)

Fuente: [https://es.wikipedia.org/wiki/Eryngium\\_foetidum](https://es.wikipedia.org/wiki/Eryngium_foetidum)

### 2.3.3. DISTRIBUCIÓN Y HABITAD

El Sacha culantro tuvo su origen en las zonas tropicales de las Américas, probablemente en el área comprendida entre Panamá, Veracruz (México) y el archipiélago del Caribe. Los nativos de América lo usaban extensamente como condimento y como planta medicinal desde tiempos ancestrales, pero era desconocido fuera del hemisferio occidental hasta la llegada de los europeos a partir de finales del siglo XV. Los europeos llevaron semillas de culantro a otras partes del mundo; ya para el siglo 17 se sembraba en Asia y Europa, pasando luego a las zonas tropicales de todos los continentes y siendo muy estimada en la cocina y la medicina naturista de América y de países asiáticos como Bangladesh, Camboya, India, Indonesia, Laos, Malasia, Singapur, Tailandia y Vietnam. (Chithra y Leelamma, 2004).

En el Perú, esta planta es abundante en los departamentos de Loreto y Ucayali. El sachá culantro pertenece a la familia botánica Apiaceae (la familia del apio), anteriormente llamada familia Umbelliferae. A esta familia pertenecen 455 géneros y unas 3,600 especies de plantas, de las cuales algunas de las más conocidas son el apio vianda o apio de raíz (*Arracacia xanthorrhiza*), el apio de ensalada (o *celery* en inglés, *Apium graveolens*), la zanahoria (*Daucus carota*), el perejil (*Petroselinum sativum*), el anís (*Pimpinella anisum*), el eneldo (*Anethum graveolens*), el hinojo (*Foeniculum vulgare*) y el comino (*Cuminum cyminum*). (Guerra, 1999).

#### **2.3.4. ESTUDIOS FITOQUIMICOS Y FARMACOLÓGICOS**

Pérez SF (2012), evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* y la composición química del aceite esencial de las hojas frescas de *Eryngium foetidum* L. "Sacha Culantro", mediante el método de destilación por arrastre de vapor de agua; posteriormente fue sometido a un análisis fisicoquímico: gavedad específica (0,930 g/mL), índice de refracción (1,475). Seguidamente se determinó cualitativamente la composición química por medio del Espectro fotómetro de Masas acoplado a Cromatógrafo de Gases (EM/CG), determinándose los siguientes compuestos: (1-metiletil) benceno; 1-metil-2-(1-metiletil) benceno; 2, 4, 6-trimetil fenol; dodecanal; 2-dodecanal, 2,4,5 trimetilbenzaldehido; 2,4,5 - trimetilbenzoico, octadecano, ácido mirístico y ácido linoleico. Por el método de difusión en agar se determinó la actividad antimicrobiana, frente a los siguientes microorganismos: *S. aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis* ATCC1228, *B. subtilis* ATCC6633, *E. coli* ATCC8739 y *P. aeruginosa* ATCC 9027 mostrando actividad antibacteriana frente a estas cepas bacterianas. *Eryngium foetidum* L. es una especie vegetal que habita en suelos inundables y de altura; también en huertos hortícolas y en campo abierto como en sombreado, siendo tolerante a la inundación. Las partes aprovechables de esta planta son el tallo, hojas y frutos. Es originaria de la amazonia occidental y cultivada en toda América tropical. En el Perú está ampliamente distribuida en Loreto, San Martín y Ucayali. El sabor y aroma que tiene es muy similar al del *Coriandrum sativum* "culantro", siendo utilizada por su aromaticidad en sopas, guisos ensaladas y platos típicos de la región Amazónica.

Medicinalmente, el consumo de las hojas o de la infusión de hojas sirve para mejorar catarro, convulsiones, diabetes, diarrea, estreñimiento, fiebre, inflamaciones, vómitos y para estimular el apetito. La infusión de las raíces es usada para los malestares antes indicados, en adición a mejorar condiciones de alta presión, escorbuto, neumonía, reumatismo y de aumentar el flujo menstrual y la fertilidad en seres humanos. Dependiendo de la forma en que se use, se le atribuyen también propiedades bactericidas, laxantes, y de aumento de fertilidad en humanos. (Paul *et al.*, 2011).

#### **2.3.5. UTILIZACIÓN**

El contenido relativamente alto de aceites esenciales o aromáticos en el cultivo está asociado a sus usos como condimento y planta medicinal. Generalmente se aprovechan las hojas y tallos para uso como condimento y toda la planta tiene usos medicinales. Culinariamente, el Sachaculantro es usado extensamente en la cocina

del Caribe, Latinoamérica y Asia tropical, de forma similar al cilantrillo, en sofritos, salsas y pastas. Nutricionalmente, las hojas del Sacha culantro contienen un 90% de agua, pero tienen alta concentración de caroteno, calcio, hierro, vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), vitamina C, vitamina A y proteínas.

### **2.3.6. TOXICOLOGÍA**

Los estudios toxicológicos de un extracto de la planta, en el ratón muestran que la LC<sub>50</sub> por vía intravenosa es superior a 50 mg/kg y por vía oral a 1 g/kg. (Bernal *et al.*, 2002).

## **2.4. ANTIOXIDANTE**

### **2.4.1. DEFINICIÓN**

Los antioxidantes son compuestos que reducen la velocidad de oxidación controlando la formación de radicales libres, los cuales juegan un papel importante en enfermedades degenerativas como cáncer, cataratas, enfermedades neurodegenerativas, aterosclerosis, infecciones, enfermedades inflamatorias crónicas, diabetes, y enfermedades autoinmunes, entre otras. (Shahidi y Naczk, 1995a; Gutteridge y Halliwell, 2000).

Los antioxidantes derivados de las plantas desde el punto de vista fitoquímico pueden ser taninos, lignanos, estilbenos, cumarinas, quinonas, xantonas, ácidos fenólicos, flavones, flavonoles, catequinas, antocianinas y proantocianinas los cuales debido a sus propiedades redox pueden actuar como donadores de hidrógenos y de esta manera prevenir o retrasar el desarrollo de enfermedades degenerativas. (Marwah *et al.*, 2007).

Los antioxidantes también se utilizan en la industria de alimentos, cosmética, pinturas, aceites, polímeros y, en general, para proteger cualquier sustancia susceptible a la oxidación mediada por radicales libres. (Halliwell y Gutteridge, 1999).

En los alimentos el proceso de auto-oxidación y generación de la rancidez es causado por radicales libres como consecuencia de la peroxidación lipídica y en los sistemas vivos los radicales libres atacan moléculas biológicas claves, produciendo muchas enfermedades degenerativas. (Suja *et al.*, 2004).

Los antioxidantes pueden actuar:

- A) Previniendo la formación de ROS.
- B) Interceptando el ataque de ROS.
- C) Secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas.
- D) Facilitando la reparación del daño causado por ROS.
- E) Manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes.
- F) Amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de ROS.

Según el modo de acción, los antioxidantes se clasifican en primarios, secundarios o terciarios:

- ❖ Primarios: Impiden la formación de radicales libres, frenan la reacción en cadena de los radicales libres, especialmente de las especies reactivas del oxígeno (ROS) ó son quelantes de metales de transición. Se comportan como captadores de estos ROS.
- ❖ Secundarios: Interrumpen la reacción de propagación de los radicales libres ó desplazan las especies reactivas del oxígeno (ácido ascórbico, carotenoides, glutatión y la mayoría de las enzimas antioxidantes).
- ❖ Terciarios: Reparar el daño causado a las moléculas por los radicales libres ó eliminan aquéllas que se han deteriorado.

En el organismo humano los radicales libres están controlados mediante un amplio espectro de antioxidantes de origen endógeno (enzimas antioxidantes, glutatión, albúmina, transferrina, ácido úrico, bilirrubina) y exógenos a través de la dieta (vitamina E y C, carotenoides, selenio, compuestos fenólicos).

Estos engloba un vasto grupo de fitoquímicos, que presentan en su estructura un anillo aromático con por lo menos un hidroxilo (Rice – Evans, 1996; Wang *et al.*, 1996) y que, por poseer esta configuración, actúan como agentes reductores capaces de interrumpir la reacción de oxidación por dos maneras: por la donación de electrones o átomos de hidrogeno a los radicales libres, convirtiéndolos en productos estables, o por su complejación con metales presentes en el medio. (Satué – García, *et al.*, 1997; Villano *et al.*, 2007).

## 2.4.2. ALIMENTOS COMO FUENTE DE ANTIOXIDANTES

En todo el mundo hay un sinnúmero de alimentos naturales con poder antioxidante que aún no se han estudiado, sin embargo existen investigaciones que están encaminadas a encontrar el poder antioxidante o determinar la capacidad antioxidante de estas. La población en general obliga a las industrias a encontrar alimentos con beneficios para la salud y la creación de nuevos productos ya que son estos los que consumen y demandan productos de calidad. La cebolla morada que es un buen antiinflamatorio, antibacterial, rica en selenio, potasio, fibra, vitamina C, vitamina E y polifenoles; la granada que es una rica fuente de vitamina B<sub>6</sub>, polifenoles, potasio y vitamina C; la manzana a la cual se le atribuyen propiedades anticancerígenas, es recomendable para combatir el asma y el cáncer de pulmón, es un excelente antioxidante ya que contiene flavonoides, polifenoles y vitamina C, el jitomate contiene licopeno (poderoso antioxidante), rico en propiedades anticancerígenas, puede ayudar a normalizar la presión arterial y proteger la piel; el aguacate fortalece las funciones cerebrales y las funciones del sistema nervioso central, contiene fibra, potasio, vitamina E, carotenoides, polifenoles y luteína; el ajo posee propiedades antivirales y su consumo puede ayudar a prevenir el cáncer, es un excelente antioxidante, contiene compuestos polifenoles y potasio. (Hernández y Gonzales, 1999).

Las frutas en general, además de presentar importante fuente de vitaminas, minerales y fibras, poseen compuestos con actividad antioxidante (Melo *et al.*, 2008), dentro de los cuales se destacan los compuestos fenólicos. Actualmente el consumo de frutas viene aumentando en virtud de su valor nutritivo y de sus efectos biológicos a la salud (Kuskoski *et al.*, 2006). Las frutas poseen compuestos como vitamina C y E, carotenoides, clorofila y fitoquímicos, como compuestos fenólicos, flavonoides, glucósidos y taninos (Pellegini *et al.*, 2007), que poseen relación con la prevención de ciertas dolencias y enfermedades cardiovasculares y circulatorias (Stoclet *et al.*, 2004) debido a su efecto antioxidante. Dietas ricas en frutas y vegetales están asociadas a un reducido riesgo de dolencias crónicas. (Hertog *et al.*, 1997).

Rodríguez *et al.* (2006), estudiaron la actividad antioxidante de la *Mentha spicata L.* (hierbabuena), *Mentha piperita L.* (menta), *Petroselinum crispum Miller* (perejil de hojas planas), *Ocimum basilicum L.* (albahaca común) y orégano francés, las cuales exhiben actividades antioxidantes diferentes, de acuerdo con los valores estimados por el ensayo del ABTS, observaron el orden siguiente: hierbabuena > menta > albahaca = perejil > orégano francés. Según los valores por el método del FRAP, el

comportamiento fue similar al anterior, con excepción de la albahaca, la que sobresalió del resto de las plantas estudiadas con más del doble de la actividad antioxidante de la que le sigue, la hierbabuena, tanto la menta como la hierbabuena se distinguen por su elevado poder antirradical, mientras la albahaca resultó ser la hierba aromática de mayor poder reductor.

Es fundamental tener conocimiento que el valor de los compuestos antioxidantes presentes en las frutas es influenciado por diversos factores como cultivar, factores genéticos, estadios de maduración, condiciones climáticas y por el suelo. Además de eso, los compuestos bioactivos también son muy susceptibles a las reacciones de oxidación que ocurren durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos. (Borowska y Mazur, 2008).

Paralelamente, la extracción y la purificación de antioxidantes de fuentes naturales, ha tomado esencial uso para la utilización de esas sustancias como aditivos en alimentos, fármacos y cosméticos. Está evidenciado que la selección de un proceso adecuado de extracción puede además aumentar la concentración de compuestos antioxidantes en el extracto, remover componentes indeseables antes de la adición del compuesto en el alimento. (Schwarz *et al.*, 2001).

#### **2.4.2.1. ALIMENTO NUTRACEUTICO**

Sustancias químicas o biológicas activas que pueden encontrarse como componentes naturales de los alimentos o adicionarse a los mismos. Se presenta en una matriz no alimenticia (píldoras, cápsulas, polvo, etc.), y que administrada en dosis superior a la existente en esos alimentos, presume un efecto favorable sobre la salud, mayor al que posee el alimento normal. Por ende, los productos nutracéuticos tienen la capacidad de fortalecer las condiciones saludables, sirviendo como auxiliar en el cuidado y mantenimiento de la salud, así como en la prevención de enfermedades y en la mejora de las funciones fisiológicas del organismo. (Sloan, 1996).

Los nutracéuticos se diferencian de los medicamentos en que éstos últimos no tienen un origen biológico natural, difieren de los extractos e infusiones de hierbas y similares en la concentración de sus componentes y no tienen por qué tener una acción terapéutica.

Los alimentos nutracéuticos previenen las enfermedades crónico degenerativas que son los infartos, embolias, hipertensión, diabetes, cánceres hormonodependientes (glándulas mamarias, próstata, tiroides, etc). (Delgado y Paredes, 2003).

### **2.4.2.2. ALIMENTOS FUNCIONALES**

Según la IFIC (Consejo Internacional de Información sobre Alimentos) son aquellos que aparte de su papel nutritivo básico desde el punto de vista material y energético, son capaces de proporcionar un efecto positivo en la salud tanto en el mantenimiento del estado de salud como en la reducción del riesgo de padecer una enfermedad.

Dentro de algunos ejemplos de alimentos funcionales se encuentran: tomates cuyo contenido en licopeno reduce el riesgo del cáncer de próstata, muchos pescados cuyo contenido en ácidos omega-3 reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares y las frutas y verduras, cuyos flavonoides neutralizan los radicales libres oxidantes.

Los alimentos funcionales aportan al organismo determinadas cantidades de vitaminas, grasas, proteínas, hidratos de carbono y otros elementos necesarios, pero cuando un alimento funcional ayuda a la calidad y mantenimiento de la vida y salud o a la prevención de enfermedades, entonces se puede llamar Nutracéutico. Desde este ángulo los alimentos funcionales son parte de la nutracéutica.

Los alimentos funcionales suelen presentarse en forma de alimentos para uso diario, enriquecidos con determinados nutrientes o sustancias beneficiosas para la salud. Por ejemplo leche o zumos enriquecidos con vitaminas, minerales, fitosteroles y ácidos grasos esenciales, margarinas, aceites, yogur, entre otros. Una categoría de alimentos funcionales de mucha relevancia es la de los denominados alimentos probióticos que son definidos como aquellos que contienen microorganismos vivos y tienen algún beneficio en la salud debido a que proveen un equilibrio en la flora intestinal (Tomasik, 2003; When food meets medicine, 1991). Estos productos contienen bacterias de los géneros Bifidobacterium y/o Lactobacillus o levaduras del género Saccharomyces. Los más utilizados son las bacterias formadoras de ácido láctico. Los probióticos tienen una variedad de efectos positivos en la salud como son la prevención de diversos cánceres del tracto gastrointestinal, de niveles altos de colesterol sanguíneo comprobados efectos contra los infartos del corazón y embolias cerebrales.

El desarrollo de los alimentos funcionales constituye una oportunidad palpable de contribuir a mejorar la calidad de la dieta, así como la selección de alimentos que pueden afectar positivamente la salud y el bienestar del individuo. Con este alimento se logra un impacto positivo en la salud, previniendo o curando alguna enfermedad, además del valor nutritivo que contiene.



Dentro de los alimentos funcionales se distinguen:

- a) **Probiótico:** Productos que contienen microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades suficientes ejercen un efecto positivo en la salud más allá de los efectos nutricionales.
- b) **Prebiótico:** Productos que contienen uno o más ingredientes no digeribles que benefician al consumidor por estimular selectivamente el crecimiento o la actividad de microorganismos específicos de la microflora intestinal.
- c) **Simbiótico:** Es una mezcla de prebiótico y probiótico.

#### **2.4.2.2.1. EL ORIGEN DE LOS ALIMENTOS FUNCIONALES (AF), LOS FOSHU**

El concepto de AF nació en Japón. En los años 80's, las autoridades sanitarias japonesas se dieron cuenta que para controlar los crecientes gastos en salud pública, generados por la mayor expectativa de vida de la población mayor, era necesario proporcionar también una mejor calidad de vida a esta población, muy respetada por lo demás según los códigos sociales de la población oriental (Arai *et al.*, 2000). Se introdujo así un nuevo concepto de alimentos, los que se desarrollaron específicamente para mejorar la salud y para reducir el riesgo de contraer enfermedades en este segmento de la población. Nacieron de esta forma los FOSHU, abreviatura del inglés "Food with Specific Health Uses" (Saito *et al.*, 2007). Los FOSHU, se caracterizan por tener efectos benéficos específicos en la salud del consumidor como resultado de sus ingredientes (prebióticos, probióticos, antioxidantes, ácidos grasos omega-3, ácido fólico, fitoesteroles, fitoestrógenos, entre otros), o porque se le han removido aquellos componentes del alimento que pueden tener un efecto perjudicial en la salud, como por ejemplo la remoción de componentes alérgenos, irritantes, hipercalóricos, entre otros (Yamada *et al.*, 2008). Los productos aprobados como FOSHU, que actualmente en Japón son más de seiscientos (Durán y Valenzuela, 2010), corresponden a alimentos procesados y no a cápsulas, comprimidos, pastillas, u otras formas farmacéuticas.

El Centro de Información Internacional de Alimentos (IFIC) de la Unión Europea los define como "aquellos productos a los cuales intencionalmente y en forma controlada se les adiciona un compuesto específico para incrementar su propiedades saludables" y define como alimentos saludables a "aquellos que en su estado natural, o con mínimo procesamiento, tienen compuestos con propiedades beneficiosas para la salud" (Biesalski *et al.*, 2010). Es así como las tendencias han ido evolucionando en lo que significa nuestra alimentación y el desarrollo de los

alimentos, desde el concepto más básico de saciar el hambre, hasta hoy día, donde los requerimientos de alimentación y la conservación de la salud están muy estrechamente relacionados. (Robertfroid, 2002).

### **2.4.3. RADICALES LIBRES**

Desde el punto de vista químico los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad, señalado por el punto situado a la derecha del símbolo. Poseen una estructura birradicálica, son muy reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forman y son difíciles de dosificar. (Cheesman *et al.*, 1998; Romero *et al.*, 1998).

A bajas concentraciones los radicales libres son necesarios para el buen funcionamiento celular pudiendo actuar como segundos mensajeros estimulando la proliferación celular y/o actuando como mediadores para la activación de las células. Sin embargo, un exceso de los mismos puede acumularse hasta niveles tóxicos dando como resultado que se produzcan diversas acciones sobre el metabolismo de los principios inmediatos, que pueden ser origen del daño celular.

La capacidad que tenga cada radical libre para actuar como agente oxidante está determinada por factores como su reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad. Son responsables del daño oxidativo de macromoléculas biológicas como el DNA, lípidos, carbohidratos y proteínas. Participan en los mecanismos fisiopatológicos de muchas enfermedades, como algunos tipo de cáncer, diabetes, patologías cardiovasculares, procesos reumáticos, patologías gastroentéricas, afecciones broncopulmonares o procesos neurodegenerativos. También están implicados en procesos fisiológicos como el envejecimiento, el daño causado por el ejercicio físico agotador y otros.

Las principales especies reactivas del oxígeno o sustancias prooxidantes son:

- ❖ Radical hidroxilo (OH)
- ❖ Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) Anión superóxido ( $O_2^-$ )
- ❖ Oxígeno singlete ( $^1O_2$ )
- ❖ Oxígeno nítrico (NO)
- ❖ Peróxido (ROO)
- ❖ Semiquinona (Q)

- ❖ Ozono

Existen algunas circunstancias en que también se producen radicales libres como son:

- ❖ Los componentes del humo del cigarro.
- ❖ Contaminantes ambientales.
- ❖ Radiaciones.
- ❖ Luz ultravioleta,
- ❖ Compuestos tóxicos.
- ❖ Dietas desbalanceadas o pobres.
- ❖ Dietas hipercalóricas y altas en grasas.
- ❖ Ejercicio o trabajo extenuante. (Dabrowska *et al.*, 2009).

#### **2.4.4. ESTRÉS OXIDATIVO**

No es el estrés al que comúnmente las personas son expuestas por el trabajo, las presiones o los problemas que enfrentan día a día si no el producto de la acción que tienen los radicales libres sobre las células que componen el cuerpo humano. Un radical libre es un átomo o molécula que contiene un electrón desapareado en su orbital exterior, dicho electrón confiere alta reactividad oxidante por ser muy inestable, por lo que reacciona de inmediato ante otras sustancias que estén cercanas, la principal molécula generadora de radicales libres es la del oxígeno. (Gutiérrez *et al.*, 2004).

Lo que resulta contradictorio tomando en consideración que el oxígeno es la base de la vida debido a que los seres humanos son organismos aeróbicos, resulta incoherente el hecho de que el oxígeno siendo tan importante para la sobrevivencia de dichos organismos, sean la causa de daños en el mismo, pero esta acción surge debido a que el oxígeno al entrar a al organismo interviene en una serie de reacciones de óxido-reducción complejas en las que se producen algunas especies derivadas de este que son reactivas y se convierten en lo que son los radicales libres que son llamados ERO (especies reactivas del oxígeno), la mitocondria es el principal productor de las ERO, ya que la respiración celular se verifica específicamente a este nivel, como se sabe el 90% del total del oxígeno inhalado se consume en la mitocondria y alrededor del 2% del oxígeno reducido se transforma en el radical superóxido, estas especies son las que principalmente contribuyen al estrés oxidativo, que ha sido relacionado con varias enfermedades como la aterosclerosis, la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, derrame cerebral, artritis,

enfermedades inflamatorias crónicas, cáncer, y entre otras enfermedades degenerativas. (Lini *et al.*, 2011).

La acción que los ERO tienen en el cuerpo humano a aumentado debido a que el mundo y la forma de vida a dado un gran giro, ya que las personas se encuentran rodeadas de contaminación de todo tipo que estas mismas han creado sin ninguna conciencia además del gran cambio en la alimentación y en ciertos hábitos, todo esto afecta la manera en que el organismo responde a circunstancias adversas así como su buen funcionamiento. Por lo que los radicales libres son influenciados por factores ambientales externos, tales como: los componentes del humo del cigarro, contaminantes ambientales, radiaciones, luz ultravioleta, compuestos tóxicos, dietas desbalanceadas o pobres, dietas hipercalóricas y altas en grasas, ejercicio o trabajo extenuante. La exposición de la piel a la luz UV inicia una reacción foto-oxidativa que afecta el estado antioxidante y aumenta el nivel celular de las especies reactivas del oxígeno (ERO), acompañado por la activación de muchas vías de señalización ROS-sensible. Esto perjudica la capacidad de la piel para protegerse de la generación excesiva de ROS como resultado del estrés oxidativo aumentado. (Mohammad *et al.*, 2007).

#### **2.4.5. PRO – OXIDANTE**

Es conveniente tener en cuenta que los compuestos antioxidantes pueden mostrar un comportamiento prooxidante bajo ciertas condiciones (Nieto *et al.*, 2011). Dicha actividad prooxidante puede acelerar el daño a las moléculas tales como ADN, carbohidratos o proteínas. (Aruoma *et al.*, 1997).

El Camú Camú es un fruto con un alto contenido de vitamina C (Collazos, 1993), compuesto que el ser humano no lo puede sintetizar y necesariamente debe ingerirlo en su dieta. Esta vitamina es un eficiente antioxidante; pero, también puede actuar como un agente prooxidante cuando se administra en altas dosis, especialmente cuando está en presencia de elevadas cantidades de metales de transición, como el hierro y cobre, generando radicales hidroxilo. (Sardi, 2004).

#### **2.4.6. VITAMINA “A”**

La vitamina A también se conoce como Retinol. Es una sustancia orgánica, soluble en las grasas, que se encuentra en la Naturaleza en dos formas: como vitamina A activa o retinol, y como pigmentos carotínicos o carotenos.

### **1.1.1.1. CAROTENOIDES**

Los carotenoides o tetraterpenoides son una clase de pigmentos terpenoides con 40 átomos de carbono derivados biosintéticamente a partir de dos unidades de geranylgeranylpirofosfato, en su mayoría son solubles en solventes apolares y de coloraciones que oscilan entre el amarillo (por ejemplo el  $\beta$ -caroteno) y el rojo (por ejemplo el licopeno).

Los carotenoides se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, en bacterias, y muy pocos se han reportado en animales (por ejemplo los colores rojizos de las plumas del flamingo son debidos a la cantaxantina, un carotenoide), y particularmente invertebrados marinos como las esponjas, estrellas de mar, pepinos de mar, erizos de mar, y otros. En los animales superiores el  $\beta$ -caroteno es un requerimiento dietario esencial pues es precursor de la vitamina A.

Los carotenoides se encuentran principalmente en partes aéreas de las plantas, especialmente en hojas, tallos y flores, en frutos (por ejemplo tomate, pimentón, etc.), y en menor proporción en raíces por ejemplo la zanahoria.

Se conocen más de 600 carotenoides, y se les encuentra en forma libre, como ésteres de ácidos grasos o como glicósidos. Sin embargo los glicósidos carotenoides son muy raros, un ejemplo de estos últimos es la crocina. (Martínez, 2003).

### **1.1.1.2. RETINOL**

Los Retinoides son una serie de compuestos derivados de la vitamina A que se han revelado muy importantes para numerosos procesos biológicos tales como el crecimiento, la regulación de la proliferación y diferenciación de los tejidos epiteliales, el mantenimiento de las funciones visuales y en la reproducción.

Los retinoides son una familia de moléculas de bajo peso molecular, derivadas de moléculas hidrofóbicas de la vitamina A estos compuestos exhiben sus efectos en el crecimiento y diferenciación de muchos tejidos celulares y su empleo ha mostrado ser relevante clínicamente para el tratamiento de algunos tipos de cáncer y de enfermedades dermatológicas. (Allende, 1997).

### **2.4.7. COMPUESTOS FENÓLICOS**

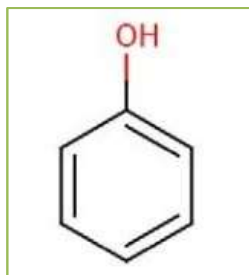
Los compuestos fenólicos o polifenoles, son las sustancias que poseen un anillo aromático, unidos a uno o más grupos hidroxilo, incluyendo derivados funcionales (ésteres, glucósidos, etc.). (Macheix *et al.*, 1990).

Los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente.

Los fenoles están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal. La característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol. (Robbins, 2003; Kähkönen *et al.*, 2001).

#### 2.4.7.1. ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

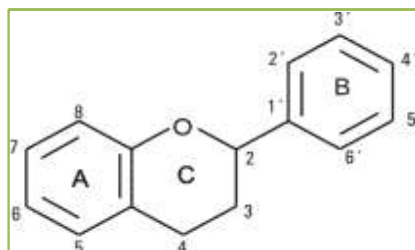
El término fenoles comprende aproximadamente 8000 compuestos que aparecen en la naturaleza. Todos ellos poseen una estructura común: un anillo fenol, un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo.



**FIGURA N° 3: Estructura del Fenol**

Fuente: <http://cienciasdejoseleg.blogspot.pe/2011/12/nomenclatura-de-gupos-hidroxilo-unidos.html>

Los flavonoides son los polifenoles que poseen al menos 2 subunidades fenólicas; los compuestos que tienen 3 o más subunidades fenólicas se denominan taninos. (Robbins, 2003).

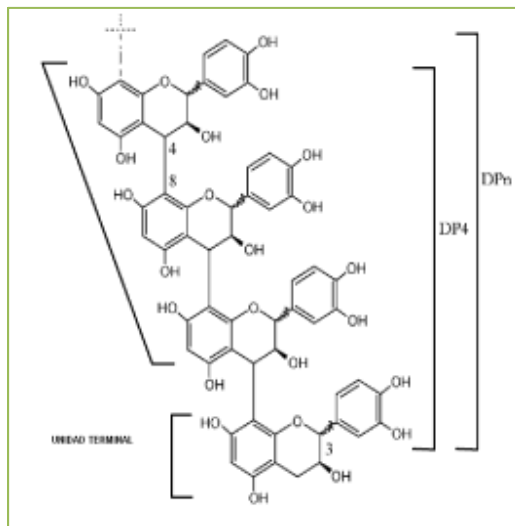


**FIGURA N° 4: Estructura básica de los flavonoides. (Pérez, 2003)**

Los flavonoides son derivados fenólicos sintetizados en cantidades substanciales por las plantas. Comprenden alrededor de 4000 compuestos identificados, son derivados hidroxilados, metoxilados y glicosilados de la 2 fenil benzo y pirano, que consiste en dos anillos benceno combinados por mediación del oxígeno contenido en el anillo pirano. Estos compuestos poseen actividad antioxidante y capacidad para capturar radicales libres. (Vinson *et al.*, 1995).

La actividad antioxidante de los distintos grupos de compuestos depende de la estructura individual y del número de oxidrilos sustituyentes, así como del peso molecular. En los flavonoides, esta característica se asocia con la presencia en la molécula de grupos orto dihidroxi en el anillo B, un doble enlace entre el C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> en conjunto con la posición 4 - oxo en el anillo C, y grupos 3-5 hidroxilo, y la función 4 - oxo en los anillos A y C. (Velioglu *et al.*, 1998).

Los taninos o polifenoles poliméricos tienen mayor actividad antioxidante que los fenoles monoméricos simples. (Hagerman *et al.*, 1998).



**FIGURA N° 5: Taninos (Polímeros de catequina). (Hagerman *et al.*, 1998).**

#### **2.4.7.2. COMPUESTOS FENOLICOS EN ALIMENTOS**

Los flavonoides son la clase predominantemente descrita de los fenoles presentes en los alimentos, porque son aproximadamente 2/3 de los fenoles consumidos en la dieta humana. Los taninos también son una fuente importante de antioxidantes. Debido a su presencia ubicua en los alimentos de origen vegetal, los humanos

consumen compuestos fenólicos a diario. El rango de consumo es de 25 mg a 1g por día dependiendo del tipo de dieta (frutas, vegetales, granos, té, especias). (Robbins, 2003; Hagerman *et al.*, 1998).

Existen numerosos estudios sobre la actividad antioxidante de los alimentos de consumo corriente en las diferentes culturas: las frutas, las hierbas, el té, el cacao, las verduras, los cereales, entre otros.

Las frutas, especialmente las agrupadas en lengua inglesa bajo el nombre de berries *Vaccinium myrtillus* (arándanos), *Ribes nigrum* (cassis o corintos negos), *Ribes gossularia* (uva espina ó grosella), *Rubus idaeus* (frambuesa), *Ribes rubrum* (corintos rojos) y *Fragaria ananassa* (frutilla) son una fuente importante de antioxidantes en la dieta. En estas frutas se encuentran presentes derivados de los ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos, antocianos, flavonoles, catequinas y taninos (hidrolizables y condensados). Muchos de estos compuestos exhiben una variedad de efectos biológicos, incluyendo actividad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria y acciones vasodilatadoras. Los extractos de las frutas antes mencionadas resultaron altamente antioxidantes, inhibieron la formación de hidroperóxidos en metil linoleato y la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de los liposomas. También tienen capacidad para capturar especies reactivas del oxígeno generadas químicamente. (Kähkönen *et al.*, 2001).

El té se ha usado como bebida de consumo diario y como medicina por cientos de años en China. Posee efectos antipiréticos y diuréticos, actividad antioxidante, antimutagénica y anticáncer, así como también capacidad para capturar los radicales libres y el oxígeno activo. Previene el daño oxidativo sobre el DNA e inhibe la peroxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). La ingesta regular de té mejora el status antioxidante *in vivo*, y por lo tanto, disminuye la incidencia de ciertos tipos de cáncer y de enfermedades coronarias. Las propiedades antioxidantes y antimutagénicas del extracto de té varían con la intensidad de la fermentación del té durante el proceso de manufactura. El té verde no fermentado tiene un poder antioxidante superior al del té negro fermentado. (Penman y Gordon, 1997; Gow-Chin Yen y Hui-Yin Chen, 1995; Benzie y Szeto, 1999).

Los granos de cacao no fermentados son ricos en polifenoles, los cuales comprenden 12 al 18% del peso seco total del grano entero. Los polifenoles presentes son catequinas, procianidinas y antocianidinas. Luego de la fermentación y el secado, los flavonoides sufren una variedad de reacciones de oxidación y polimerización que originan taninos. Los fenoles del cacao tienen propiedades



antioxidantes *in vitro*. El café verde tiene alto contenido de polifenoles, entre ellos el ácido ferúlico y cafeico, cuya actividad antioxidante ha sido demostrada *in vitro* e *in vivo*. El grano tostado disminuye la concentración en polifenoles. El café descafeinado no presenta diferencias con el café sin descafeinar respecto de su poder antioxidante. La protección contra la oxidación de las LDL no se debe a un solo compuesto, sino que es el resultado de la acción de varios compuestos fenólicos. La composición química de las bebidas varía grandemente: consiste en epicatequinas en el té verde, epicatequinas y taninos en el té negro, catequinas, procianidinas y antocianinas en el cacao, y en el café hay ácido clorogénico, ácido cafeico y melanoidinas. Café, cacao y té contienen polifenoles con altas actividades antioxidantes. (Ricchelle *et al.*, 2001).

En hierbas aromáticas tales como *Salvia officinalis* (Salvia), *Thymus vulgaris* (Tomillo), *Ginkgo biloba* L. (Ginkgo), *Mentha spicata* (Menta), *Artemisia vulgaris* (Ajenjo), *Aloe barbadensis* (aloe), *Valeriana officinalis* L. (Valeriana), *Allium schoenoprasum* (Ciboulette), *Taraxacum officinale* (Diente de león), *Anethum graveolens* (Dill), *Lavandula angustifolia* (Lavanda), *Foeniculum vulgare* (Hinojo), *Origanum vulgare* (Orégano), *Origanum majorana* (Mejorana), *Melissa officinalis* (Melisa), *Petroselinum crispum* (Perejil), *Rosmarinus officinalis* (Romero), *Ocimum basilicum* (Albahaca), *Laurus nobilis* (Laurel), *Sambucus nigra* (Sauco), *Coriandrum sativum* (Coriandro), *Crocus sativus* (Azafrán), *Chamaemelum nobile* (Manzanilla), *Tilia* (Tilo), y *Vinca minor* (Vinca) se estudió el poder antioxidante y la composición polifenólica. Cada hierba tiene una composición fenólica diferente, y el poder antioxidante de cada uno de estos compuestos también es diferente. La actividad antioxidante de los flavonoides se incrementa con el N° de grupos hidroxilo sustituyentes del anillo B, específicamente en el C-3'. Existe una correlación lineal positiva entre el contenido fenólico y la capacidad antioxidante de las hierbas, en consecuencia, las hierbas son una buena fuente potencial de antioxidantes naturales. Romero y tomillo presentaron mayor concentración polifenólica y mayor poder antioxidante. (Proestos *et al.*, 2005).

Los cítricos contienen flavonoides en forma de flavonas polimetoxiladas y flavanonas glicosiladas. Tienen propiedades anticancerígenas, antivirales, antiinflamatorias, efectos sobre la fragilidad capilar y capacidad para inhibir la agregación de las plaquetas humanas. Las cáscaras y las semillas de los cítricos tienen capacidad antioxidante con respecto a la oxidación del citonela, debida a estos compuestos fenólicos. Sus extractos pueden ser útiles para evitar la oxidación de los jugos de frutas y aceites esenciales. Generalmente, las semillas poseen mayor actividad

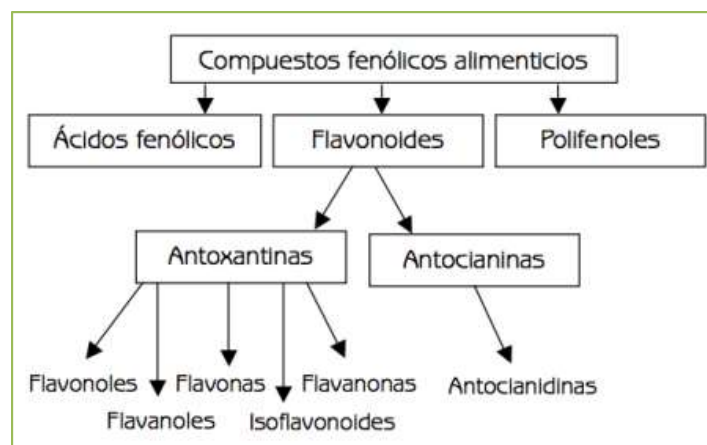
antioxidante que las cáscaras. No siempre se verifica una relación directa entre mayor concentración fenólica y mayor actividad antioxidante en los cítricos. (Bocco *et al.*, 1998).

## 2.4.8. ANÁLISIS PARA ANTIOXIDANTES FENÓLICOS

### 2.4.8.1. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

#### 2.4.8.1.1. DEFINICION

Según Messina (2003), los compuestos fenólicos, una de las clases más importantes de los fotoquímicos, se agrupan de acuerdo a su estructura química en tres grupos principales: los ácidos fenólicos, los polifenoles y los flavonoides, siendo este último, el grupo más común con más de 4000 compuestos identificados. Los flavonoides se dividen en dos grandes grupos: antoxantinas y antocianinas, que se agrupan a su vez en subclases (figura 6) que están relacionadas estructuralmente, pero tienen funciones diferentes. (Peterson *et al.*, 2000; Zambrano, 2003).



**FIGURA N° 6: Árbol familiar de los compuestos fenólicos.**  
(Ochoa y Ayala 2004)

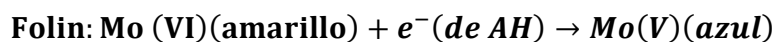
#### 2.4.8.1.2. DETERMINACIÓN

El método espectrofotométrico desarrollado por Folin y Ciocalteu (1927); Sellappan *et al.*, (2002) y modificado por Singleton y Rossi (1965), para la determinación de fenoles totales, se fundamenta en su carácter reductor y es el más empleado. Se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en

medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ). La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 765 nm, los resultados se expresan en mg de ácido gálico por 100 g de muestra.

El ensayo de Folin-Ciocalteu (F-C) es un método comúnmente utilizado en el área de agroquímica e industrias alimenticias, por su simplicidad, por la disponibilidad comercial del reactivo y por ser un procedimiento ya estandarizado (Singleton *et al.* 1999). Inicialmente, fue aplicado al análisis de 19 proteínas tomando como ventaja la actividad del reactivo frente al residuo de proteína, tirosina (que contiene un grupo fenol). Muchos años después este ensayo se extendió al análisis de fenoles totales en vino y desde entonces se le ha encontrado muchas aplicaciones.

El reactivo de F-C utiliza un mecanismo de reacción de oxidación/reducción, que no es específico para fenoles. El método implica la oxidación de fenoles en solución alcalina por el heteropolianión molibdotungstosfórico amarillo y la medición colorimétrica del molibdotungstosfato azul resultante. Este complejo azul tiene su máxima absorción dependiendo de su composición fenólica, además del pH de las soluciones implicadas (Cicco *et al.*, 2009).



$$\lambda_{max} = 765 \text{ nm}$$

Reactivo de Folin. En el cual el Mo (VI) es reducido a Mo (V) con un  $e^-$  donado por un antioxidante.

En el ensayo F-C original, se usa el buffer de carbonato para ajustar el pH y el punto final de reacción se alcanza a los 120 min aproximadamente a temperatura ambiente. Aunque es un tiempo demasiado extenso y dificulta la implementación de un análisis de rutina, aún es utilizado por algunos investigadores. En diferentes trabajos se ha variado concentración del reactivo, alcalinidad y temperatura, buscando una reducción significativa del tiempo necesario para llegar a un estado estacionario. (Magalhães *et al.*, 2010), adaptó el método, en el cual se varia la alcalinidad, al reemplazar el buffer de carbonato por una solución de hidróxido de sodio logando disminuir el tiempo de reacción a 4 min y conseguir resultados altamente confiables. Al final se debe tener muy presente la concentración alcohólica

en la mezcla, puesto que según Singleton *et al.*, (1999), el incluir solventes diferentes al agua en las muestras, algunas veces puede interferir la formación de la solución azul.

Una de las modificaciones al método propuesta por Singleton y Rossi (1965), implica el uso de ácido gálico como compuesto fenólico de referencia, de tal manera que los resultados se expresan en equivalentes de ácido gálico (EAG). Sin embargo, múltiples trabajos han utilizado igual variedad de estándares, entre los que se cuentan: catequina, ácido tánico, ácido clorogénico, ácido caféico, ácido protocatecuico y ácido ferúlico, lo cual imposibilita la comparación entre muestras, además de las variaciones que implica la no estandarización del método en cuanto a condiciones críticas como proporciones de reactivos, temperatura y tiempo de lectura. (Prior *et al.*, 2005).

Pese a esto, actualmente el método de Folin-Ciocalteu es ampliamente utilizado, principalmente en complemento con otros métodos para medición de actividad antioxidante, puesto que ya se conoce el valor de EAG para una amplia cantidad de frutas, vegetales, bebidas (Brat, 2006); por lo tanto, es posible la comparación de una muestra con estos datos, siempre y cuando se sigan los procedimientos reportados.

## **2.4.8.2. DETERMINACIÓN DE TANINOS**

### **2.4.8.2.1. DEFINICIÓN**

Los taninos son compuestos fenólicos hidrosolubles de sabor áspero y amargo que abundan en algunas plantas que presentan interesantes propiedades astringentes y antiinflamatorias, suelen acumularse en las raíces, cortezas, frutos y están también presentes en sus hojas, aunque en menor proporción.

Antiguamente utilizados como colorantes de pieles y alimentos, los taninos son el resultado de la combinación de un fenol y un azúcar. Suelen tener varios usos: la precipitación de la gelatina a través de los taninos sirve para clarificar el vino, como así también la capacidad de precipitar proteínas sirve para el curtido de pieles. En ese sentido, los taninos se intercalan entre las fibras de colágeno, estableciendo uniones que permiten crear una gran resistencia frente al agua y el calor, haciendo que la piel se convierta en cuero. Esta combinación de los taninos con proteínas de la piel, forman precipitados resistentes a la putrefacción, lo cual priva a las bacterias

contaminantes de su sustrato nutritivo. Su poder astringente lo hace apto para la cicatrización de heridas, sobre todo administrados en forma de cataplasmas.

Así mismo la precipitación de los alcaloides, tras un envenenamiento atenúa la toxicidad. Estas virtudes se deben a la propiedad que tienen de combinarse a otras sustancias (proteínas, fibras, alcaloides, gelatinas, etc.) para originar reacciones fenólicas. Las plantas que tienen taninos y esencias (salvia, menta, etc.) son muy útiles como antisépticos y antiinflamatorios en casos de bronquitis, hemorroides, sabañones, etc. (Evans, 1984).

Son sus principales características las siguientes. (Yagüe, 1969):

- ❖ Compuestos químicos no cristalizables cuyas soluciones acuosas son coloidales, de reacción ácida y sabor astringente.
- ❖ Precipitan con gelatina, albúmina y alcaloides en solución.
- ❖ Con las sales férricas dan coloraciones negro azuladas o verdosas.
- ❖ Producen un color rojo intenso con ferricianuro de potasio y amoníaco.
- ❖ Precipitan a las proteínas en solución y se combinan con ellas, haciéndolas resistentes a la enzimas proteolíticas. Esta propiedad, denominada astringencia, fue mencionada anteriormente.

Dado que estos compuestos se han investigado durante más de 100 años, diseñaron diferentes clasificaciones de acuerdo con el nivel del conocimiento que de éstos se tenía en los diferentes períodos de tiempo.

La clasificación de Freudenberg, que actualmente es empleada, tiene su fundamento en el tipo de estructura base del tanino.

Es así que los agrupa en dos grandes clases: taninos hidrolizables (obtienen el pirogalol) y taninos condensados (obtienen el catecol), con las siguientes características. (Yagüe, 1969):

### **1. Taninos hidrolizables:**

Se hidrolizan con facilidad por la acción de los ácidos, bases o enzimas, en un azúcar, un polialcohol y un ácido fenolcarboxílico. Dependiendo del tipo de ácido que se produce por la reacción se subdividen en: galotaninos (ácido gálico) y elagitaninos (ácido elágico o dilactona estable del ácido hexahidroxidifénico).

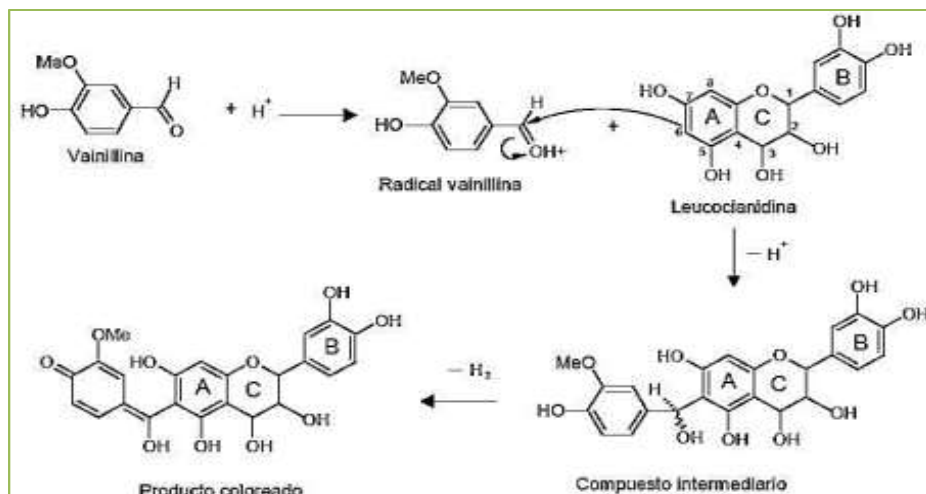
## 2. Taninos condensados

Son derivados de unidades de flavan-3,4-dioles (leucoantocianidinas o proantocianidinas monómeras), conocidos actualmente también como proantocianidinas condensadas, al ser tratados con ácidos en caliente, se origina una polimerización progresiva hasta dar taninos amorfos, llamados flobafenos o taninos rojos, en ellos, los núcleos bencénicos están unidos por átomos de carbono (por ejemplo C-4 a C-8, C-4 a C-6), dan coloración verde con  $\text{FeCl}_3 \cdot 3$  y precipitan con soluciones de bromo.

### 2.4.8.2.2. DETERMINACIÓN

El método de la vainillina se usa ampliamente para la cuantificación de proantocianidinas (taninos condensados) en frutas y granos. El ensayo de la vainillina es específico para flavan-3-ol, dihidrochalconas y proantocianinas, las cuales tienen un enlace simple en la posición 2,3 y poseen grupos hidroxilos en la posición meta del anillo B. La catequina es un flavan-3-ol monomérico frecuentemente usado como un estándar en el ensayo de la vainillina.

El metanol, disolvente usado para el ensayo de la vainillina, puede afectar la cinética de reacción de la catequina y taninos con vainillina diferencialmente.



**FIGURA N° 7: Mecanismo de reacción de vainillina con taninos. (Shahidi y Naczk 1995).**

El ensayo de la vainillina en metanol es más sensible para los taninos poliméricos que para los flavan-3-oles monoméricos. Este ensayo es generalmente reconocido como un método útil para la detección y cuantificación de taninos condensados en plantas

debido a su sensibilidad, especificidad y simplicidad. Sin embargo, debe ser considerada la posibilidad de interferencias con dihidrochalconas y antocianinas. El método se puede usar para cuantificar taninos condensados en un intervalo de 5-500 µg con precisión y exactitud mayores a 1 µg cuando la concentración óptima de reactantes y disolventes son elegidos. (Shahidi y Naczk, 1995b).

Este método se basa en la condensación de la vainillina con proantocianinas en una solución acidificada. La vainillina protonada, un electrófilo débil, reacciona con el anillo del flavonoide en la posición 6 u 8. El producto de esta reacción se deshidrata fácilmente para dar un color rosa ligero a un intenso rojo cereza. La estabilidad del color del aducto vainillina-tanino puede incrementarse cuando la luz es excluida y la temperatura de reacción es controlada y entonces se obtienen resultados exactos y reproducibles. (Shahidi y Naczk, 1995a).

### **2.4.8.3. DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS**

#### **2.4.8.3.1. DEFINICIÓN**

Las antocianinas representan los principales pigmentos solubles en agua visibles al ojo humano. Estos pigmentos son responsables de la gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul en varias frutas, vegetales y cereales, y se encuentran acumulados en las vacuolas de la célula (Wagner, 1982). Las antocianinas están presentes en diferentes órganos de las plantas, tales como frutas, flores, tallos, hojas y raíces (Brouillard, 1982). Sin embargo, en ciertas especies, las antocianinas son localizadas en regiones discretas de la vacuola celular, llamadas antocianoplastos. (Pecket y Small, 1980).

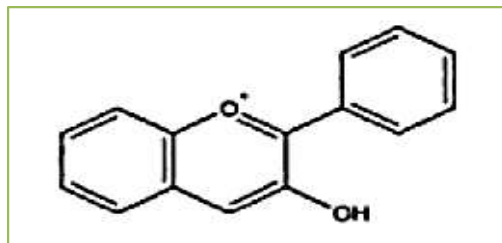
Pertenecen al grupo de los flavonoides y su estructura básica es un núcleo de flavón, el cual consta de dos anillos aromáticos unidos por una unidad de tres carbonos (Figura 10). Químicamente las antocianinas son glucósidos de las antocianidinas, es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace  $\beta$ -glucosídico. La estructura química básica de estas agliconas es el ión flavilio (Badui, 2006), también llamado 2-fenil-benzopirilio (Wong, 1995), que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio (A) y un anillo fenólico (B); el flavilio normalmente funciona como un catión. (Badui, 2006).

De todas las antocianidinas que actualmente se conocen (aproximadamente 20), las más importantes son la pelargonidina, delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y

malvidina, nombres que derivan de la fuente vegetal de donde se aislaron por primera vez, Las tres primeras son más frecuentes en frutos, en tanto que el resto lo son en flores; la combinación de éstas con los diferentes azúcares genera aproximadamente 150 antocianinas. Los carbohidratos que comúnmente se encuentran son la glucosa y la ramnosa, seguidos de la galactosa, xilosa y la arabinosa, ocasionalmente, la gentobiosa, la rutinosa y la soforosa.

El color de las antocianinas depende de varios factores intrínsecos, como son los sustituyentes químicos que contenga y la posición de los mismos en el gupo flavilio; por ejemplo, si se aumentan los hidroxilos del anillo fenólico se intensifica el color azul, mientras que la introducción de metoxilos provoca la formación del color rojo (Badui, 2006). Las antocianinas son interesantes por dos razones. La primera por su impacto sobre las características sensoriales de los alimentos, las cuales pueden influenciar su comportamiento tecnológico durante el procesamiento de alimentos, y la segunda, por su implicación en la salud humana a través de diferentes vías (De Pascual-Teresa y Sánchez-Ballesta, 2008). Las antocianinas son de interés particular para la industria de colorantes alimenticios debido a su capacidad para impartir colores atractivos. (Konczack y Zhang, 2004).

Son sensibles a las variaciones de pH, a pH 3 el pigmento está presente como sales de flavilo de color rojo, a pH 8 es color violeta y a pH 11 es de color azul. Las antocianinas juegan un rol importante en la producción de vinos, siendo la “enocianina” responsable del color que se utilizan para intensificar el color de los vinos y en colorantes de alimentos como jugos, jamones y licores.



**FIGURA N° 8: Estructura molecular de las antocianinas. (Wong 1995).**



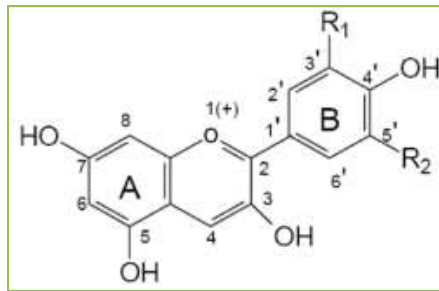
#### **2.4.8.3.2. DETERMINACIÓN**

La técnica empleada más comúnmente hoy en día es la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) puesto que esta permite la separación simultánea, la identificación y cuantificación de los compuestos de antocianinas sin requerir pureza excesiva de los extractos (Escribano-Bailon *et al.*, 2004). Las columnas (diámetro interno 4.6 mm y largo 100-300 mm) son usualmente mantenidas a temperatura ambiente, y los sistemas de elusión son binarios, usando solventes acidificados acuosos tales como ácido acético, ácido perclórico o ácido fórmico en un solvente orgánico tal como metanol o acetonitrilo (Horbowicz *et al.*, 2008). Las antocianinas separadas son detectadas y cuantificadas a 525 nm y la identificación de antocianinas está basada en los tiempos de retención correspondientes y espectros ultravioleta- visibles (UV-Vis) comparado con la de los estándares auténticos puros tales como delphinidina-3-glucósido, delphinidina-3-rutinósido, cianidina-3-glucósido, cianidina-3galactósido, cianidina-3-rutinósido, peonidina-3-glucósido, petunidina-3-glucósido, pelargonidina -3-glucósido y cloruro de cianidina que están comercialmente disponibles.

El contenido total de antocianinas es calculado en  $\mu\text{g/g}$  usando una curva estándar para cianidina-3-glucósido o delphinidina-3- glucósido (las antocianinas más comunes en granos) (Abdel-Aal y Hucl, 2003). Los espectros de absorción UV-Vis de una antocianina puede proveer información sobre la naturaleza de la antocianidina, modelo de glucosilación y posiblemente de acilación (Costa *et al.*, 2000). Las antocianinas tienen un rango de absorción amplio al final del azul del espectro visible con una absorción máxima observada en las regiones de 500-535 nm (Abdel-Aal *et al.*, 2006). En adición, la electroforesis capilar (CE) ha sido usada para separar los compuestos iónicos de antocianinas por su carga (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009). El uso de la CE en la separación de antocianinas es bastante nueva, pero promisoria debido al alta hidrosolubilidad de estos compuestos. La CE ha sido empleada para la determinación cuantitativa de antocianinas en vino como una alternativa de la RP-HPLC. (Saenz-Lopez *et al.*, 2003).

#### **2.4.8.3.3. ESTRUCTURA Y ESTABILIDAD**

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos A y B unidos por una cadena de 3 C. Variaciones estructurales del anillo B resultan en seis antocianidinas conocidas.



Aglicona	Substitución		$\lambda_{max}$ (nm) espectro visible
	R1	R2	
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH3	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH3	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH3	OCH3	510 (azul-rojo)

**FIGURA N° 9: Estructura y sustituyentes de las antocianinas.**  
(Durts y Wrolstad, 2001)

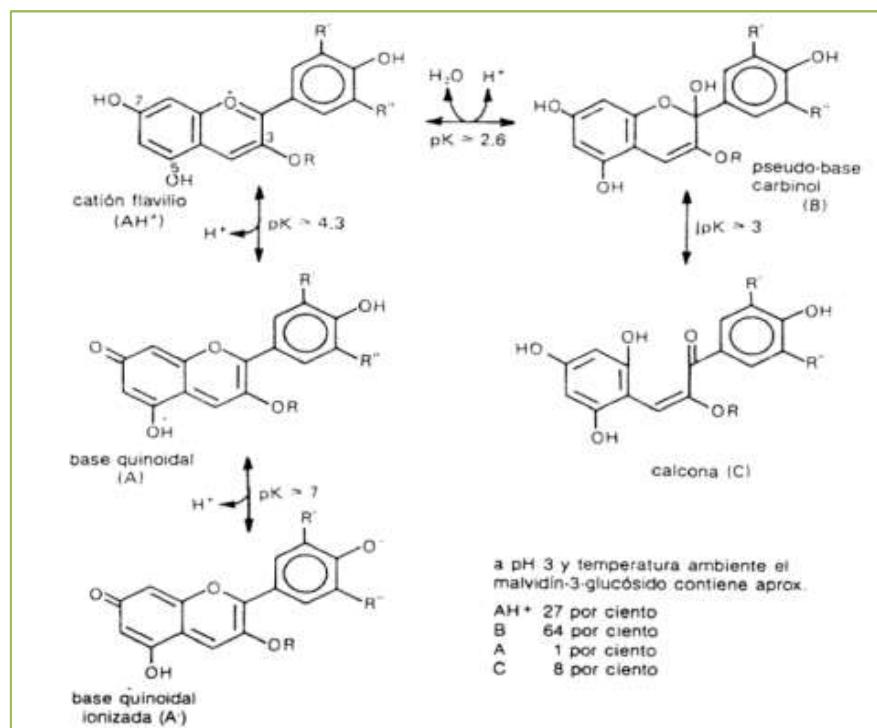
El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas.

En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad. Dentro de los sacáridos glicosilantes se encuentran la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa. Otra posible variación en la estructura es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos pueden ser alifáticos, tales como: malónico, acético, málico, succínico u oxálico; o aromáticos: p-coumárico, caféico, ferúlico, sinápico, gálico, o p-hidroxibenzóico. (Stintzing *et al.*, 2002), demostraron que el tipo de sustitución glicosídica y de acilación producen efectos en el tono de las antocianinas; es así como sustituciones glicosídicas en la posición 5 al igual que acilaciones aromáticas, producen un desplazamiento hacia las tonalidades púrpura.

A pesar de las ventajas que las antocianinas ofrecen como posibles sustitutos de los colorantes artificiales, su incorporación a matrices alimenticias o productos farmacéuticos y cosméticos son limitadas debido a su baja estabilidad durante el

procesamiento y el almacenamiento (Cevallos y Cisneros, 2004). Factores como su misma estructura química, pH, concentración, temperatura, presencia de oxígeno y ácido ascórbico, y actividad de agua de la matriz determinan la estabilidad del pigmento.

Efecto del pH. El pH tiene efecto en la estructura y la estabilidad de las antocianinas (Fig. 12). La acidez tiene un efecto protector sobre la molécula. En soluciones acuosas a valores de pH inferiores a dos, básicamente 100% del pigmento se encuentra en su forma más estable o de ión oxonio o catión flavilio ( $AH^+$ ) de color rojo intenso. A valores de pH más altos ocurre una pérdida del protón y adición de agua en la posición 2, dando lugar a un equilibrio entre la pseudobase carbinol o hemicetal (B) y la forma chalcona (C), o de cadena abierta. Tanto el hemicetal como la chalcona, son formas incoloras y bastante inestables. A valores de pH superiores a siete se presentan las formas quinoidales (A,  $A^-$ ) de color púrpura que se degradan rápidamente por oxidación con el aire. (Hutchings, 1999).



**FIGURA N° 10: Estructura de las antocianinas a diferentes valores de pH (Coulate, 1984).**

El efecto del ácido ascórbico sobre la estabilidad de las antocianinas ha sido explicado por (Jurd, 1972 y Poesi-Langston, 1981), como una posible reacción de condensación entre el ácido y los pigmentos. Otros factores. La concentración del pigmento y la actividad de agua de la matriz afectan la estabilidad del color. (Garzón y Wrolstad, 2002), compararon la estabilidad de la antocianina de fresa (pelargonidina 3-glucósido) con la de la antocianina de la cáscara de rábano (pelargonidina 3-soforósido 5-glucósido acilada con ácidos aromáticos y alifáticos) y encontraron que dicha estabilidad era independiente de la estructura, a una misma concentración de pigmento. (Hoshino *et al.*, 1982), demostraron que cuando la concentración de antocianinas alcanza valores altos, se presentan fenómenos de autoasociación entre dos cationes flavilio, dos formas hemiacetal, dos bases quinoidales, e inclusive, entre una base quinoidal y un catión flavilio y protegiendo la molécula de antocianina. Por otro lado, incrementos en la actividad de agua del medio causan degradación de las antocianinas probablemente debido a una mayor interacción entre el agua y el catión flavilio para formar la pseudobase inestable. (Garzón y Wrolstad, 2001; Olaya *et al.*, 2008).

#### **2.4.8.4. DETERMINACION DE FLAVONOIDES**

##### **2.4.8.4.1. DEFINICIÓN**

Los flavonoides se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas (Hertog *et al.*, 1996), aportando parte del sabor y del color; la mayoría son solubles en agua y no son sintetizados por el cuerpo humano ni producidos sintéticamente. Los usos de los flavonoides dependen de su forma de combinarse; cada planta contiene una única combinación de flavonoides. (Schieber *et al.*, 2001).

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana. (Aherne *et al.*, 2002).

Estos compuestos fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, quien en 1930 aisló de la cáscara del limón una sustancia, la citrina, que regulaba la

permeabilidad de los capilares. Los flavonoides se denominaron en un principio vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C (porque se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C). Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado, y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950. (Singleton *et al.*, 1981).

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Peres, 1994). Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer. (Jang, 1997).

Sus propiedades antirradicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica (Jovanovic *et al.*, 1998) y se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides (con respuestas antiprostanoide y antiinflamatoria), de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos) y de proteger a las lipoproteínas baja densidad de la oxidación (prevención de la placa de ateroma). (Yang *et al.*, 2000; Geleijnse *et al.*, 2002).

Además de sus conocidos efectos antioxidantes, los flavonoides presentan otras propiedades que incluyen la estimulación de las comunicaciones a través de las uniones en hendidura, el impacto sobre la regulación del crecimiento celular y la inducción de enzimas de detoxificación tales como las monooxigenasas dependientes de citocromo P-450, entre otras. (Stahl *et al.*, 2002).

Como características generales de estos compuestos debemos señalar su solubilidad en agua y en etanol, su carácter fenólico y su intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro debido a la presencia de sistema aromático y conjugado.

Una clasificación preliminar del tipo de flavonoide en un extracto de planta, puede hacerse basado inicialmente en un estudio de sus propiedades de solubilidad y de comportamiento ante reacciones de color; esto, seguido por un examen y/o del extracto hidrolizado.

La separación puede hacerse por procedimientos cromatográficos, y la identificación de los componentes individuales por comparaciones cromatográficas y espectroscopia con compuestos estándares o con la literatura. (Lock, 1994).

#### 2.4.8.4.2. DETERMINACIÓN

La identificación, cuantificación y extracción de los flavonoides ha despertado un gran interés debido a que se ha encontrado que poseen propiedades benéficas para la salud del ser humano, tales como actividades anticancerígenas, antiinflamatorias, antivirales, antialérgicas, protección contra enfermedades del corazón y propiedades antioxidantes ya que retardan los cambios oxidativos en los alimentos, mejorando así la calidad y el valor nutricional de estos. Todos estos efectos en la salud atraen la atención de incorporar éstos compuestos a los productos alimenticios. (Kang *et al.*, 2006).

Una manera sencilla de cuantificar la concentración de flavonoides en especies vegetales se basa el método espectrofotométrico UV-Vis. Indicado por (Sotero y García, 2009) donde se realiza lecturas a 474 nm del extracto etanólico previamente diluido usando agua destilada como blanco, usando quercetina como patrón de flavonoides y expresando los resultados en mg de quercetina/100 g de muestra.

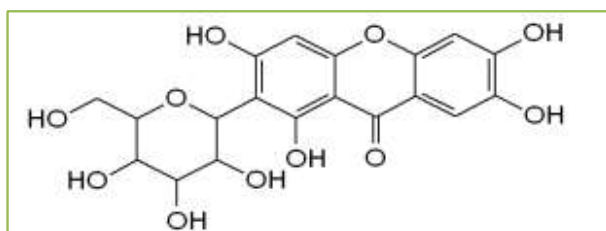
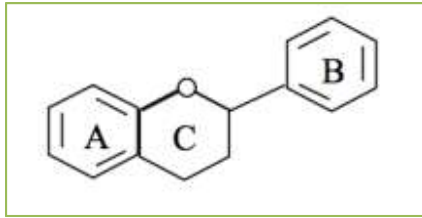


FIGURA N° 11: Estructura de La quercetina. (Sotero y García, 2009)

#### 2.4.8.4.3. ESTRUCTURA DEL FLAVONOIDE

Los flavonoides tienen una estructura de anillos formada por 15 carbonos ( $C_6-C_3-C_6$ ), que consiste en dos anillos aromáticos (A y B) que contienen generalmente grupos hidroxilos, unidos por una cadena lineal de 3 carbonos como se muestra en la figura 14.

En algunos casos, el anillo heterocíclico C ocurre en forma abierta. (Friedli, 2003).



**FIGURA N° 12: Estructura básica de un flavonoide.**  
(Ochoa y Ayala, 2004).

Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Kühnau, 1976) (fig. 15). La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química (Bors *et al.*, 1990). Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C. En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

- 1) Flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
- 2) Flavonoles, representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
- 3) Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
- 4) Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

Tres características estructurales son importantes para su función:

- a) La presencia en el anillo B de la estructura catecol u O-dihidroxi;
- b) La presencia de un doble enlace en posición 2,3.
- c) La presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5 (Letan, 1966).

La quercitina presenta las tres características, mientras que la catequina solo presenta la segunda y la diosmetina la primera.

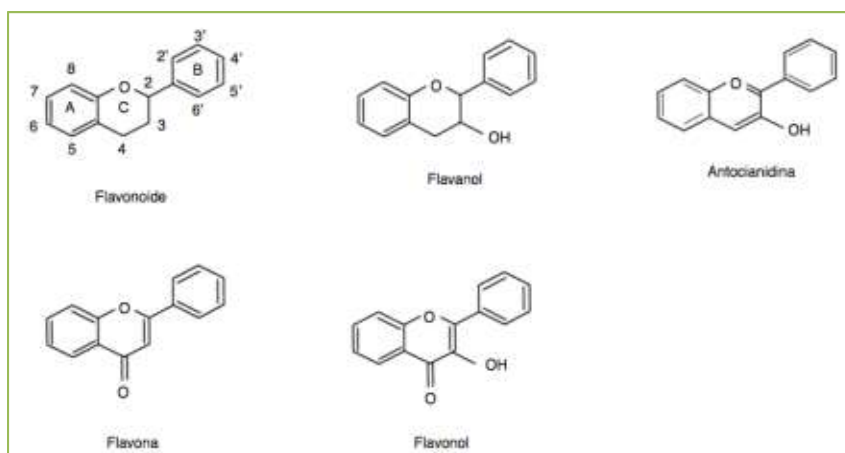


FIGURA N° 13: Flavonoides, Estructura básica y tipos. (Martínez *et al.*, 2002).

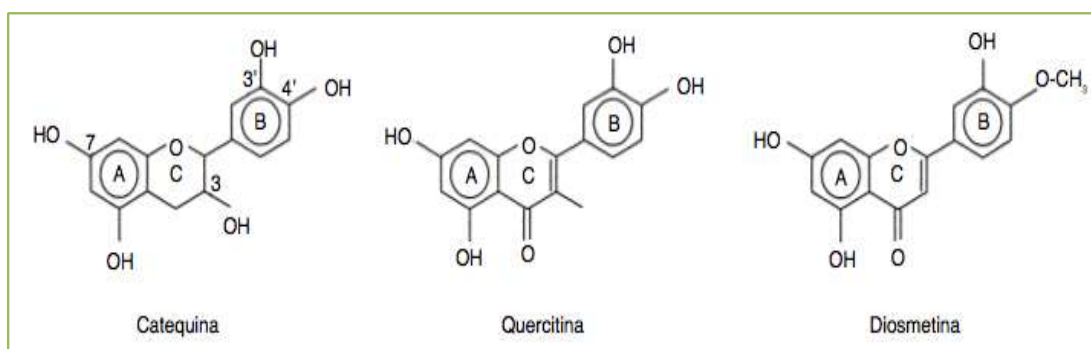


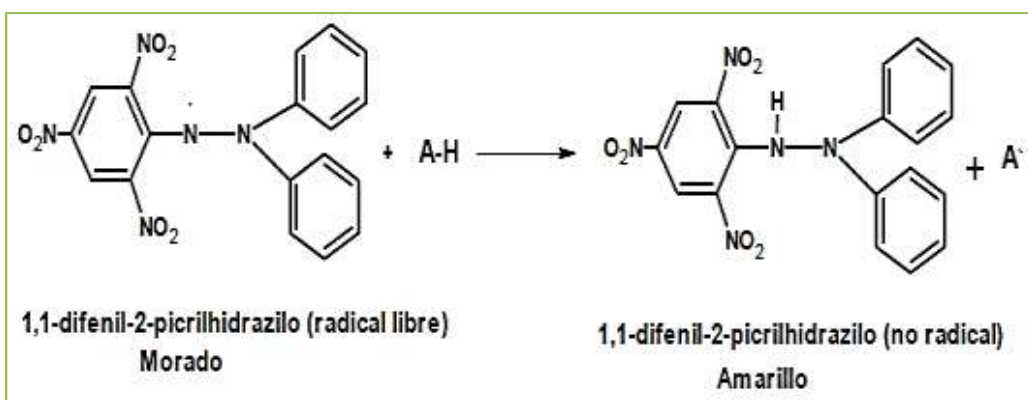
FIGURA N° 14: Características estructurales de los principales tipos de flavonoides. (Martínez *et al.*, 2002).

#### 2.4.9. ENSAYO DEL DPPH (1,1-DIFENIL-2-PICRIL-HIDRAZILO)

Este método fue propuesto por Blois (1958) en el cual se demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH• para aceptar un átomo de hidrógeno (H•) proveniente de una molécula de cisteína. La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno como se muestra en la figura 8, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado



espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes. Después de aproximadamente tres décadas este ensayo comenzó a utilizarse rutinariamente para la caracterización de las propiedades antioxidantes. El procedimiento original para el ensayo DPPH• ha sido adoptado por muchos laboratorios y a pesar de que existen modificaciones a conveniencia, una revisión detallada de la literatura ha revelado que la mayoría de los estudios están basados en un tiempo de reacción de 20-30 min en vez de un tiempo de reacción total de 120 minutos requerido para alcanzar el estado estacionario y completar la reacción redox. (Ojha *et al.*, 2012).



**FIGURA N° 15: Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el Antioxidante. (Alam *et al.*, 2012).**

#### **2.4.9.1. LOS RESULTADOS DEL ENSAYO DPPH• SE HAN PRESENTADO DE DIFERENTES MANERAS**

La mayoría de los estudios expresan los resultados como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria ( $IC_{50}$ ), definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%. Este valor se calcula graficando el porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto. Para extractos de plantas o compuestos puros el valor  $IC_{50}$  cambia de acuerdo a la concentración final del DPPH• usado. (Deng *et al.*, 2011).

El ensayo DPPH tiene algunas desventajas que limitan su aplicación, entre estas se encuentran:

- ❖ La diferencia en el mecanismo de reacción que normalmente ocurre entre antioxidante y radicales peroxilo.

- ❖ DPPH: es un radical del nitrógeno de larga vida, lo cual no guarda similitud con los radicales peroxilo altamente reactivos y transitorios involucrados en la peroxidación lipídica. Muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peroxilo, reaccionan lentamente o son inertes al DPPH. Esto se evidencia en el tiempo necesario para determinar el IC<sub>50</sub> que van en un rango de 1.15 min (Ácido ascórbico) a 103 min (Rutina).
- ❖ La reacción cinética entre el DPPH: y los antioxidantes no es lineal con la concentración de DPPH, por lo cual es arbitrario medir la capacidad antioxidante usando IC<sub>50</sub>.
- ❖ La reacción de DPPH: con eugenol fue reversible, lo que podría resultar en falsas lecturas (bajas) para la capacidad antioxidante de muestras que contengan eugenol y otros fenoles que guarden un tipo de estructura similar.

#### **2.4.10. TÉCNICAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS**

Los métodos espectrofotométricos no son nuevos en el campo de la química analítica y hasta hoy en día son usados frecuentemente para la determinación de polifenoles (Escarpa y González, 2001). Entre este tipo de técnicas, los métodos usados comúnmente para determinar polifenoles en alimentos destacan el ensayo de la vainillina para la determinación de compuestos flavan-3-ol, dihidrochalconas y proantocianidinas que tienen una unión simple en la posición 2,3 y poseen grupos hidroxilos en la posición meta del anillo B (Martínez-Valverde *et al.*, 2000) y el ensayo de Folin-Ciocalteu para la cuantificación de polifenoles totales, esta técnica llegó a ser la más utilizada para determinar de manera cuantitativa a los polifenoles. Este método consiste básicamente en generar cierto color a través de la adición del reactivo de Folin – Ciocalteu en un medio alcalino a una determinada muestra.

Swain y Goldstein (1964), utilizaron diversos métodos espectrofotométricos, y en base a la utilización, recomendaron el ensayo de Folin-Ciocalteu como el reactivo más conveniente para la determinación espectrofotométrica de polifenoles totales. (Escarpa y González, 2001).

##### **2.4.10.1. ENSAYOS ULTRAVIOLETA**

Se han realizado numerosos estudios para desarrollar técnicas rápidas de cuantificación de compuestos fenólicos mediante ensayos ultravioletas. Cada grupo de compuestos fenólicos se caracteriza por tener una o varias absorbancias máximas a distintas longitudes de onda dentro del espectro ultravioleta. Así, los

fenoles simples tienen una absorbancia máxima entre 220 y 280 nm, mientras que los compuestos fenólicos relacionados presentan una amplia variación en la longitud de onda a la cual presentan una absorbancia máxima. (Martínez – Valverde *et al.*, 2000).

#### 2.4.11. ESPECTROFOTOMETRÍA

La radiación electromagnética puede clasificarse según la longitud de onda o de frecuencia. La frecuencia y longitud de onda están relacionadas por la siguiente fórmula:

$$\lambda \nu = c$$

Donde  $\lambda$  es la longitud de onda (cm),  $\nu$  es la frecuencia y  $c$  es la velocidad de luz ( $3 \times 10^{10}$  cm/s). Las unidades de la longitud de onda son generalmente nanómetros, pero también pueden utilizarse Angstroms, milimicras o centímetros.

Muestra los intervalos de longitudes de onda para las diversas categorías de radiaciones electromagnéticas.

$$1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$$

$$1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$$

$$1 \text{ \mu m} = 10^{-6} \text{ m}$$

$$1 \text{ cm} = 10^{-2} \text{ m}$$

**TABLA N° 3: Clasificación de la radiación Electromagnética y efectos de la radiación sobre las moléculas. (Miller, 2003).**

REGIÓN	RATOS X	ULTRAVIOLETA	VISIBLE	INFRARROJO	MICROONDAS
Longitud de onda, nm	0.1-100	100-400	400-800	800-100000	$10^5$ - $10^3$
Efecto sobre la molecula	Excitación de los electrones de sub	Excitación de los electrones de valencia	Excitación de los electrones de valencia	Aumento de la vibraciones moleculares	Aumento de las rotaciones moleculares

Las especies químicas interactúan electromagnéticamente en forma que reducen la intensidad de la radiación. Los efectos de la interacción varían con la longitud de onda de la radiación y la naturaleza de las especies químicas, e incluyen transiciones en las vibraciones moleculares, las rotaciones moleculares y en los niveles de energía.

## 2.4.11.1. PARAMETROS DE MEDICIÓN

### 2.4.11.1.1. LA ABSORBANCIA (A)

Es el logaritmo en base diez del recíproco de la transmitancia (T), en el que el disolvente puro es el material de referencia; esto es,  $A = \log_{10} 1/T = -\log_{10} T$ . Las interacciones electromagnéticas con la materia provocan la absorción o emisión de energía EMR a través de la transición de los electrones entre niveles cuánticos o discretos de energía, vibraciones de enlaces, rotaciones moleculares y transición de electrones entre orbitales de átomos y moléculas.

La espectrofotometría de absorción de infrarrojos es adecuada para análisis orgánicos, pues los enlaces en alquenos, ésteres, alcoholes y otros grupos funcionales tienen fuerzas muy diferentes y absorben la radiación de infrarrojos en una gran variedad de frecuencias o energías. Esta absorción se refleja en el espectrógrafo en forma de picos. No se deben tomar medidas de absorbancias muy bajas o muy altas puesto que disminuye la exactitud del método. La absorbancia es adimensional y generalmente se presenta con mínimo tres decimales, algunos instrumentos permiten obtenerla con cuatro decimales. (Manfred *et al.*, 1999).

### 2.4.11.1.2. INDICE DE ABSORBANCIA

Es el cociente de dividir la absorbancia (A) entre el producto de la concentración de la sustancia (c), expresada en gramos por litro, y la longitud de la trayectoria de la energía luminosa (b) expresada en centímetros. No debe confundirse con los términos extinción específica o con el coeficiente de extinción. En otro medio distinto al vacío la velocidad de propagación es menor y la relación de la velocidad de propagación en el vacío a la velocidad en cualquier otro medio,  $v_i$ , es lo que se conoce como *índice de refracción*: (Manfred, 1999).

$$\eta_i = c/v_i$$

### 2.4.11.1.3. LONGITUD DE ONDA

La distancia entre dos puntos consecutivos de una onda que tienen el mismo estado de vibración. La longitud de onda representa un concepto fundamental en la resolución de cualquier tipo de movimiento ondulatorio, y puede variar de valores muy grandes por ejemplo, cientos de metros para radio ondas largas a valores muy pequeños por ejemplo, de millonésimas de millón ( $10^{-12}$ ) para los rayos gamma. Las

crestas y los valles son aquellos lugares en los que el movimiento transversal es máximo. La longitud de onda es la distancia entre dos compresiones o enrarecimientos consecutivos.

Las longitudes de onda más cortas del espectro visible corresponden a la luz violeta y las más largas a la luz roja y entre estos extremos se encuentran todos los colores del arco iris.

**Longitud de onda:** Se escoge mediante el registro y/o la observación de la curva espectral o espectro de la sustancia que indicará si es adecuado tomar la longitud de onda de máxima absorción u otra banda característica de la sustancia como longitud de onda para realizar las medidas, la longitud de onda escogida se conoce como longitud de onda analítica. (Manfred *et al.*, 1999).

#### **2.4.11.1.4. CURVA ESPECTRAL**

Absorción de dicha sustancia con relación a la longitud de onda. En muchas ocasiones la curva espectral se presenta como Absorbancia vs longitud de onda y el espectro se denomina espectro de absorción, o en función de la transmitancia, denominándose el espectro, espectro de transmisión. (Manfred *et al.*, 1999).

Resulta de la retención de cantidades discretas de energía radiante por la capa de material interpuesta en la trayectoria de la radiación, aunque la energía absorbida corresponde a una misma longitud de onda se observa una banda de absorción y no líneas, así la curva del espectro está constituida por las lecturas que realiza el aparato para reproducir un gráfico en función de una longitud de onda específica, con el fin de apreciar los trazos que capta el espectrofotómetro. Así La determinación cuantitativa de una especie, con base en observaciones que dependan de la cantidad de radiación absorbida dependen de la comparación entre el valor de la absorción de un patrón de referencia y la absorción de la muestra. (Manfred *et al.*, 1999).

## **2.5. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

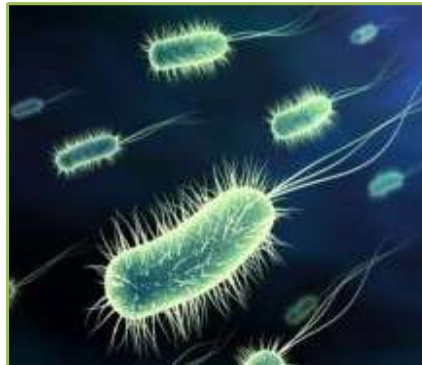
El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad o antibiograma, cuyo principal objetivo es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traduciendo, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia.

El panorama actual de las resistencias de los microorganismos a los antimicrobianos hace ineludible su determinación, incluso en aquellos casos en los que la sensibilidad se considera universal y no se han descrito, por el momento, mecanismos de resistencia.

Los ensayos de sensibilidad han de estar convenientemente normalizados y sujetos a procesos de control que aseguren su reproducibilidad. Por el momento no existe un método universal que reproduzca las condiciones en las que se encuentra un microorganismo produciendo una infección y, por tanto, la situación ideal en las que deben desarrollarse las pruebas de sensibilidad.

## 2.5.1. CEPAS DE ESTUDIO

### 2.5.1.1. *Escherichia coli*



**FIGURA N° 16: *Escherichia coli***  
(Fuente: <http://www.clinicabiblica.com/images/noticias/coli.jpg>)

#### 2.5.1.1.1. DESCRIPCIÓN

*Escherichia coli* es una de las especies bacterianas más estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole. (Neidhardt, 1999).

Forma parte de la familia Enterobacteriaceae. Ella está integrada por bacilos Gram negativos no esporulados, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, aerobios-anaerobios facultativos, capaces de crecer en agar MacConkey y en medios simples

con o sin agregado de NaCl, fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos, catalasa positivos, oxidasa negativos, y reductores de nitratos a nitritos. Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales. (Ewing, 1985).

Hoy en día, *Escherichia coli* es el indicador de contaminación fecal más utilizado, pero la presencia de *Escherichia coli* en un producto no constituye una connotación directa de la presencia de algún patógeno, sino que implica únicamente un cierto riesgo de que pudiera estar presente.

#### 2.5.1.1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

TAXONOMÍA	
Reino:	<i>Bacteria</i>
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gammaproteobacteria
Orden:	Enterobacteriales
Familia:	Enterobacteriaceae
Género:	<i>Escherichia</i>
Especie:	<i>E. coli</i> .

**TABLA N° 4: Clasificación Taxonómica de *Escherichia coli*.**  
(Escherich, T. (1885) «Die darmbakterien des neugeborenen und säuglings». *Fortschritte der Medizin*, 3: 515-522, 547-554)

#### 2.5.1.1.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

*Escherichia coli* es un bacilo entérico Gram negativo no esporulado móvil por flagelación peritrica, mide 0.5  $\mu$  de ancho por 3  $\mu$  de largo, aerobio facultativo, oxidasa negativo, Catalasa positivo con requerimientos nutritivos muy sencillos, fermentadores de azúcares que puede crecer como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos. (Madigan, 1999).

#### 2.5.1.1.4. CLASIFICACIÓN

Las cepas de *Escherichia coli* implicadas en enfermedades pueden clasificarse en 6 grupos basados en su virulencia y serología:

- ❖ *Escheria coli* Enteropatógena (ECEP): Son enteropatógenas, porque no producen enterotoxinas, aunque pueden producir diarrea grave puesto que son capaces de invadir células epiteliales. Las personas son un reservorio importante.
- ❖ *Escheria coli* Enterotoxigénica (ECET): Cepas que son enterotoxigénicas, son la causa principal de la diarrea infantil en los países en desarrollo y son los agentes más típicos de la diarrea del viajero.
- ❖ *Escheria coli* Enteroinvasiva (ECEI): Enteroinvasoras, porque no producen toxinas, pero invaden y se multiplican en el interior de las células epiteliales del colon.
- ❖ *Escheria coli* Enterohemorrágica (ECEH): Enterohemorrágicas, producen toxinas y factores citotóxicos que causan colitis hemorrágica. Destaca la cepa *Escherichia coli* 0157:H7, produce una toxina denominada verotoxina, esta se identifica como causa de colitis hemorrágica.
- ❖ *Escheria coli* Enteroagresiva (ECEA): Solo encontrada en humanos, producen hemolisina y una enterotoxina ST similar a la de las enterotoxigénicas, se le asocian dos toxinas: toxina termoestable enteroagregante (EEAST); toxina codificada por plásmidos (PET).
- ❖ *Escheria coli* Adherencia Difusa (ECAD): Se adhiere a la totalidad de la superficie de las células epiteliales y habitualmente causa enfermedad en niños inmunológicamente no desarrollados o malnutridos.

Existen cepas de *Escherichia coli* de referencia en métodos para determinar sensibilidad aconsejadas por el NCCLS:

- ❖ *Escherichia coli* ATCC 25922: Control de antimicrobianos usados frente a bacterias Gram negativas.
- ❖ *Escherichia coli* ATCC 35218: Control para las combinaciones de beta-lactámicos con inhibidores de betalactamasas.

#### **2.5.1.1.5. PRESENCIA EN ALIMENTOS**

La no detección de *Escherichia coli* no garantiza la presencia de patógenos entéricos. Se destruye a temperatura de Pasteurización y también durante su almacenamiento en frío, por eso, la presencia de *Escherichia coli* en un producto alimenticio tratado por calor, significa que o bien ha ocurrido un fallo en el proceso o más frecuentemente ha ocurrido una contaminación después del tratamiento térmico, a partir del equipo, empleados o de producto no procesados (malas prácticas de fabricación). (Neidhardt, 1999).



### 2.5.1.2. *Salmonella sp.*



FIGURA N° 17: *Salmonella Sp.*

<http://www.foodpoisonjournal.com/files/2015/08/illustration-of-structure-of-salmonella-b-john-bavosi-300x211.jpg>

#### 2.5.1.2.1. DESCRIPCIÓN

Salmonella pertenece a un grupo de bacterias que están presentes en el intestino de personas y animales sanos, de forma que las heces son el principal foco de contaminación a los alimentos y al agua. Cuando llega a los alimentos frescos, tiene la habilidad de multiplicarse muy rápidamente, y cuando una persona ingiere dicho alimento contaminado, el gran número de bacterias provoca “salmonelosis”, infección gastrointestinal provocada por dicha bacteria. (López y Díaz, 2005).

#### 2.5.1.2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

TAXONOMÍA	
Reino:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gammaproteobacteria
Orden:	Enterobacteriales
Familia:	Enterobacteriaceae
Género:	<i>Salmonella</i>

TABLA N° 5: Clasificación Taxonómica de salmonella Sp.  
([https://es.wikipedia.org/wiki/Salmonella#cite\\_note-1](https://es.wikipedia.org/wiki/Salmonella#cite_note-1))

#### 2.5.1.2.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Los miembros del género *Salmonella* son bacilos Gram-negativos, de 0,7-1,5 x 2,0-5µm, no fermentadores de lactosa, anaerobios facultativos, no esporulados generalmente móviles por flagelos peritricos con la excepción de *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum*, responsables de la tifoidea aviar y pullorosis

respectivamente. Poseen metabolismo fermentativo y oxidativo; fermentan glucosa con producción de ácido y gas (excepto *S. typhi*), también fermentan L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D- manosa, L-ramnosa, Dsorbitol, trehalosa, D-xilosa y D-dulcitol.

Son oxidasa negativo, catalasa positivo, indol y Voges- Proskauer (VP) negativo, rojo de metilo y citrato de Simmons positivo, producen H<sub>2</sub>S, son urea negativo, lisina ornitina y descarboxilasa positivo. Entre otras características bioquímicas se encuentran la reducción de nitratos a nitritos, no desaminan la fenilalanina y son tetracionato reductas.

Las salmonelas se multiplican bien en medios ordinarios, las colonias post incubación por 18 a 24 horas a 32 °C son de 2 a 3 mm de diámetro salvo algunos serotipos que producen colonias pequeñas; con algunas excepciones no presentan cápsula.

Los miembros del género *Salmonella* crecen en un amplio rango de temperaturas (35 a 37 °C), el rango de pH ideal para su crecimiento es entre 6,6 y 8,2; son incapaces de tolerar altas concentraciones de sal y sobreviven en agua congelada durante periodos prolongados.

Los criterios para la identificación bioquímica de *Salmonella sp.* son relativamente estándar, sin embargo puede haber variaciones en los medios de cultivo y algunas pruebas bioquímicas, por lo cual como alternativa se están introduciendo cada vez más los métodos moleculares que permiten un diagnóstico más rápido y pueden ser más simples de realizar, pero tienen como desventaja que son de costo elevado. (López y Díaz, 2005).

#### **2.5.1.2.4. CLASIFICACIÓN**

Actualmente el género *Salmonella* está dividido en 2 especies, con numerosos serotipos. Las dos especies son *S. choleraesuis* (*S. enterica*) y *S. bongori*. En la especie *S. choleraesuis* se encuentran todas las salmonellas patógenas para el hombre. Con antisueros específicos frente a sus Ag O y H se pueden diferenciar más de 2500 serotipos De acuerdo con el sistema de nomenclatura actual, se asimila el serotipo a la especie y así la *Salmonella enterica* serotipo *typhimurium*, se viene a denominar *Salmonella typhimurium* y lo mismo con todos los serotipos.

Un gran número de serotipos tienen su hábitat en el sistema digestivo de aves y mamíferos, que al alcanzar al hombre le causan enteritis, por ello se les denomina serotipos gastroentéricos. Otros como *S. typhi* y *paratyphi* están estrictamente adaptados al hombre y producen las fiebres tifoparatíficas. (Algorta *et al.*, 1996).

#### **2.5.1.2.5. PRESENCIA EN ALIMENTOS**

Debido a que la *Salmonella* es un microorganismo sensible a los tratamientos térmicos, se asocia con el consumo de alimentos crudos o poco cocinados. El huevo contaminado, crudo o poco cocinado, y los ovoproductos y preparados a base de huevo son la principal fuente de infección de *Salmonella*, especialmente aquellos que contienen huevo crudo como la mayonesa, salsas, helados, cremas, masas de pastelería.

También, la carne de ave, de cerdo y de vacuno insuficientemente cocinada y carnes fermentadas, leche no pasteurizada y productos derivados pueden estar contaminadas con *Salmonella*. Las frutas y verduras regadas con agua contaminada, también pueden ser transmisoras de la bacteria. Asimismo, el pescado y los moluscos pueden estar infectados si el agua en el que se encuentran está contaminada con *Salmonella*.

Las infecciones entéricas pueden estar causadas por diferentes bacterias pero por lo general manifiestan alguno de los síntomas principales, como diarreas sin fiebres o fiebres entéricas con dolor abdominal y gastroenteritis invasiva con diarrea inflamatoria, fiebre y presencia de numerosos leucocitos, principalmente neutrófilos. Los patógenos tienen un sistema de secreción que les permite secretar e inyectar proteínas de patogenicidad, lo que las convierte en altamente invasivas. *Salmonella* es uno de los géneros más complejos que existen hoy en día y a pesar de su gran conocimiento sobre su actuación y poder patógeno, continúa siendo una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en adultos y niños en el mundo y uno de los productores de toxiinfecciones alimentarias de origen bacteriano más importantes en España y otros países. (Echeita *et al.*, 2011).

#### **2.5.2. ENSAYOS ANTIMICROBIANOS**

Esta actividad consiste en la determinación de la capacidad bactericida de las muestras a estudiar, y su determinación ha sido una de las más representativas a nivel científico y tecnológico, muchos extractos de plantas de las más diversas

familias muestran este tipo de actividad, las cuales se han atribuido a gran cantidad de sustancias, entre ellas, alcaloides, aceites, taninos, saponinas y flavonoides. (Ramirez y Diaz, 2007).

### **2.5.2.1. MÉTODO DE DIFUSION EN DISCO**

La sensibilidad *in vitro* de las bacterias a agentes antimicrobianos expresada como CMI, se puede ensayar mediante varios métodos. Uno de ellos es conocido como test de Kirby – Bauer, ese método fue estandarizado por Bauer en 1996. Este es el ensayo más usado en la separación de plantas con actividad antimicrobiana en la práctica clínica y está recomendado por la Clinical and Laboratory Institute (CLSI). Básicamente, consiste en colocar un reservorio impregnado con la muestra en contacto con un medio de cultivo inoculado y, al final del periodo de incubación, medir el diámetro de la zona clara (zona de inhibición de crecimiento) alrededor del reservorio. La medida del diámetro es un buen indicador de la actividad antimicrobiana. (Gamazo *et al.*, 2005).

Antes de incubar el sistema inoculado, puede ser mantenido a temperaturas más bajas por algunas horas con el objetivo de facilitar la difusión de la muestra y, consecuentemente, aumentar el diámetro de inhibición, mejorando el límite de detección. Algunos estudios consideran suficiente mantener las placas a 4°C durante 1 a 2 horas. (Taroco *et al.*, 2008).

No existe ningún valor patrón que determina que la muestra es activa o no. Es frecuente expresar los resultados como un criterio para determinar el grado de susceptibilidad o sensibilidad y la resistencia. En estos casos, son creadas escalas basadas en el tamaño de las zonas de inhibición. Cuanto mayor sea el halo, más sensible es el microorganismo. (Gamazo *et al.*, 2005).

Algunos autores solo consideran una muestra activa si la razón del halo de la muestra por el halo del control fuera mayor que cero; o sea, el halo de la muestra es igual o mayor que el del control. (Gamazo *et al.*, 2005).

### **2.5.2.2. MÉTODO DE MACRODILUCIÓN**

Las pruebas de dilución han sido utilizadas durante años. Los procedimientos iniciales serán realizados en tubos de ensayo grandes (13 por 100 mm) con volúmenes de caldo de por lo menos 1 ml. Este método fue estandarizado en la década de los años 70 por el Estudio Cooperativo Internacional y luego la NCCLS publicó un estándar del método. Este método es llamado macrodilución en caldo. A

partir de los años 60 se comenzaron a utilizar dispositivos serológicos para dispensar y diluir. Esta miniaturización simple de la técnica se conoció como macrodilución en caldo. (Taroco *et al.*, 2008).

En el método de macrodilución se emplea por cada combinación de microorganismo con antimicrobiano, un juego de tubos. Habitualmente se prepara el juego de tubos con 1ml de caldo MH (Muller Hinton) suplementado con  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  estéril sin antimicrobiano. (Taroco *et al.*, 2008).

Para un pequeño número de pruebas se preparan diluciones al doble directamente en los tubos, del modo siguiente. Se colocan 2 ml de solución de antibiótico en el primer tubo de la serie de diluciones. En cada uno de los tubos restantes se añade 1 ml de caldo MH. Con una pipeta estéril se transfiere 1 ml del primer tubo al segundo. Después de mezclar el contenido del segundo tubo, se transfiere 1 ml con una pipeta diferente (en esta transferencia y en todas las sucesivas) al tercer tubo. (Taroco *et al.*, 2008).

El proceso continúa hasta el penúltimo tubo, al que se le quita 1 ml, que se descarta. El último tubo no recibe solución de antibiótico y sirve de control de crecimiento. Las concentraciones finales de antibióticos en esta prueba son iguales a la mitad de la serie inicial de dilución, debido al agregado de una concentración igual de inóculo < en el caldo. Se prepara un inóculo bacteriano que contenga  $10^8$  a  $10^6$  UFC/ml ajustando la turbidez de un caldo de cultivo al estándar y diluyendo luego a 1:200 en caldo. Añadir a cada tubo 1ml del inóculo ajustado. Incubar los tubos a  $35^{\circ}\text{C}$  entre 16 y 20 horas. (Taroco *et al.*, 2008).

## CAPITULO III: MATERIALES Y METODOS

El presente estudio se realizó en los Laboratorios: de Ingeniería de Alimentos y de Microbiología de Alimentos, de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, en la ciudad de Iquitos, provincia de Maynas, región Loreto.

### **HOJAS DE *Coriandrum sativum* (CULANTRO DEL PAÍS), Y *Eryngium foetidum* (SACHACULANTRO).**

Las hojas de *Coriandrum sativum* (culantro del país), y *Eryngium foetidum* (sachaculantro), fueron obtenidos de la localidad de Llanchama, con ubicación geodésica de: Latitud: -3.857833; Longitud: -73.409389. Distrito de San Juan, Provincia de Maynas, Región Loreto. En donde manifiestan que estos productos son. Luego se procedió a llevar al lugar donde fue ejecutado el proyecto para ser lavadas en agua potable e hipoclorito de sodio, enjuagadas con agua tratada, posteriormente las hojas fueron transferidas al laboratorio para ser procesados y analizados.

### **3.1. EQUIPOS**

Los equipos utilizados son:

- ❖ **Rotavapor.** Marca Büchi, de fabricación alemana, consta de un condensador diagonal, controlador electrónico que a su vez tiene un motor que revela constantemente un esfuerzo de rotación de 5 a 240 rpm, el cual tiene alrededor un baño de agua digital que lleva a una temperatura de 100°C en incremento de 10°C. también consta de un balón de un litro que está protegida de una capa plástica donde se receptiona el solvente recuperado.
- ❖ **Bomba al vacío.** De marca Thermo Scientific, modelo 420-1902, de fabricación alemana.
- ❖ **Espectrofotómetro.** De marca Thermospectronic, modelo génesis 6, 100-240v, 50/60 Hz. Diseño óptico de doble detector con un ancho de banda espectral de 1.8 nm, utilizando como fuente luminosa el xenón, con longitud de rango de 190-1100nm  $\pm$  1.0 nm, la lectura es en absorbancia, transmitancia y concentración, con intervalos de medición de 0.1, 0.2, 1.0, 2.0, 5.0 nm y con portaceldas automático de 6 posiciones.

- ❖ **Autoclave.** De marca Gemmy, Autoclave de mesa con capacidad de 16.6LTS, modelo SA-232X, Cámara de acero inoxidable de calidad, posee válvula de protección, válvula de escape de emergencia, y válvula de liberación, switch de control de presión, mango de seguridad en la puerta.
- ❖ **Balanza analítica Max.=320g.** De marca Sartorius. Modelo CP324S. de fabricación Alemana.
- ❖ **Vortex.** De marca MCR. Modelo VM – 1000. De fabricación Alemana.
- ❖ **Campana extractora.** De marca C4. Modelo CEX 180. De fabricación Colombiana.
- ❖ **Estufa de aire caliente.** De marca HOT AIR OVEN. De modelo DSO-500D. fabricado en Taiwan.
- ❖ **Cámara de bioseguridad.** De marca Nuair.
- ❖ **Incubadora.** De marca Memmert. De fabricación Alemana.
- ❖ **Regla vernier.** De marca PretuL.

### 3.2. MATERIALES

Los materiales utilizados en el presente trabajo de investigación se muestran en la Tabla N° 06

**TABLA N° 6: Materiales utilizados en el trabajo de investigación**

MATERIALES DE VIDRIO				
N°	MATERIALES	MARCA	MODELO	PROCEDENCIA
1	PROBETAS 10 ML, 100 ML, 250 ML	BRAND	-	ALEMANA
2	PIPETA VOLUMETRICAS 1 ML	MC	-	ALEMANA
3	EMBUDOS	KIMAX	-	USA
4	MATRAZ ERLLENMEYER	NORMAX	-	PORTUGAL
5	FIOLAS 10 ML COLOR AMBAR	KYNTEL	-	ALEMANA
6	PLACAS PETRI	-	-	ALEMANA
7	TUBOS DE ENSAYO DE 5 Y 10 ML	KIMAX	-	USA
8	VASOS PRECIPITADOS DE 5, 10, 50 Y 100 ML	MARIENFELD	-	ALEMANA
9	ESPATULAS DE DRIGALSKY	-	-	-

<b>MATERIALES DE PLASTICO Y METAL</b>				
<b>N°</b>	<b>MATERIALES</b>	<b>MARCA</b>	<b>MODELO</b>	<b>PROCEDENCIA</b>
10	MICROTUBOS DE 1,5 ML	ISOLAB	-	ALEMANA
11	TIPS PARA MICROPIPETAS DE 100 Y 500 µl	-	-	-
12	MICROPIPETAS 100, 500 Y 1000 µl	DragonLab	11120618	EEUU
13	CUBETA DE CUARZO UV-VISIBLE 1,5 ml	LOT .	-	ALEMANA
14	BURETAS CON AGUA DESTILADA	-	-	-
15	GRADILLAS PARA MICROTUBOS	-	-	-
16	GRADILLA METALICA	-	-	-
17	PINZA ESTERIL	-	-	-
18	CUCHILLO MEDIANO	-	-	-
19	ASA DE KOLLE	-	-	-

<b>MATERIALES DE BIOSEGURIDAD</b>				
<b>N°</b>	<b>MATERIALES</b>	<b>MARCA</b>	<b>MODELO</b>	<b>PROCEDENCIA</b>
20	MANDILES MEDIC	MECID		PERÙ
21	MASCARILLA N° 78	FAMILY DOCTOR	-	-
22	LENTE DE PROTECCION	-	-	-
23	GUANTES QUIRURGICOS ESTERILES DESCARTABLES	IQ MEDIC	-	MALASIA
<b>OTROS MATERIALES</b>				
24	ESCOBILLA LAVA TUBOS	-	-	-
25	ALGODÓN	COPPON	-	PERÙ
26	DETERGENTE	MAGIA BLANCA	-	PERÙ
27	LEGIA	SAPOLIO	-	PERÙ
28	GUANTES PARA LAVAR	-	-	-
29	PAPEL ALUMINIO	DIAMOND	-	CHINA
30	PAPEL DE DESPACHO	-	-	-
31	PAPEL TOALLA	ELITE	-	PERÙ
32	PARAFILM	LABORY FILM	-	-
33	PLUMON MARCADOR	FABER-CASTELL	-	PERÙ



### 3.3. REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Los reactivos y medios de cultivos utilizados se muestran en la Tabla N° 07

**TABLA N° 7: Reactivos y medios de cultivos usados en el proyecto de tesis**

N°	REACTIVO/MEDIO DE CULTIVO	PUREZA	MARCA
01	HIDRÓXIDO DE SODIO A.C.S.	97	SPECTRUM
02	NITRATO DE ALUMINIO	-	SPECTRUM
03	ÁCIDO FORMICO	95-97	MERCK
04	FOLIN CIOCALTEU	-	MERCK
05	ACIDO GALICO	99.9	MERCK
06	VAINILLINA	99	SIGMA ®
07	CARBONATO DE SODIO ANHIDRO A.C.S.	99.87	QUIMICA MEYER ®
08	ETANOL AR	99.7 – 100	LOBACHEMIE
09	METANOL ABSOLUTO	≥ 99.7	MERCK
10	ACIDO FORMICO	98-100	MERCK
11	ACIDO CLORHIDRICO	37	SIGMA ®
12	CLORURO DE POTASIO	99.5	SIGMA ®
13	ACETATO DE SODIO	99.5	MERCK
14	ACETATO DE POTASIO	99	LOBACHEMIE
15	DPPH	93	MERCK
16	CLORURO DE SODIO	0.9%	-
17	ACIDO SULFURICO	0.2M	-
18	MC FARLAND	-	-
19	GENTAMICINA (DISCOS DE 10 µm)	-	-
20	AGAR MULLER HINTON	-	MERCK
21	AGAR NUTRITIVO	-	MERCK
22	AGAR TRIPTACASA DE SOYA TSA	-	
23	CALDO MULLER HINTON MH	-	OXOID
24	CALDO NUTRITIVO	-	MERCK

### **3.4. TIPO Y DISEÑO MUESTRAL PARA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIBACTERIANA**

El método de la investigación fue el método descriptivo, experimental, y longitudinal.

**Experimental:** Porque se evaluó un fenómeno dado introduciendo elementos que pueden modificar el comportamiento de las variables en estudio, los que fueron medidos en determinados momentos.

**Longitudinal:** Porque nos permitió realizar la recolección sistemática de las variables involucradas en función del tiempo.

#### **ANTIOXIDANTE**

**F1 = Tipo de extracción.**

A = Etanol.

**F2 = Metabolito secundario.**

1 = Fenoles totales.

2 = Taninos.

3 = Antocianinas.

4 = Flavonoides.

Por lo tanto se tendrá lo siguiente:

4 x 1 = 4 tratamientos

4 x 3 = 12 experimentos por cada muestra (Culantro del País y Sachaculantro).

#### **ANTIBACTERIANA**

**F1 = Tipo de extracción.**

A = Etanol.

**F2 = Actividad antibacteriana.**

1 = Difusión en disco

2 = Macrodilución

Por lo tanto se tendrá lo siguiente:

2 x 1 = 2 tratamientos

2 x 3 = 6 experimentos por cada muestra y por cada bacteria (Culantro del País y Sachaculantro).

### **3.5. DISEÑO MUESTRAL**

La investigación estuvo definida en las siguientes etapas:

- a) Recolección de muestra e identificación de la misma.
- b) Obtención del extracto.
- c) Evaluación de la actividad antioxidante.
- d) Evaluación de la actividad antibacteriana frente a sepas de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*
- e) Análisis de los resultados.

### **3.6. POBLACIÓN Y MUESTRA**

#### **3.6.1. POBLACIÓN**

##### **3.6.1.1. POBLACIÓN VEGETAL**

Hojas de *Coriandrum sativum* (culantro del país), y *Eryngium foetidum* (sachaculantro); obtenidos de la localidad de Llanchama, con ubicación geodésica de: Latitud: -3.857833; Longitud: -73.409389. Distrito de San Juan, Provincia de Maynas, Región Loreto.

##### **3.6.1.2. POBLACIÓN MICROBOLÓGICA**

Las muestras microbiológicas estarán constituidas por las bacterias: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella Sp.*, proporcionadas por el INS.

#### **3.6.2. MUESTRA**

Las muestras que se utilizaron en el presente trabajo de investigación, se tomaron de la localidad de Llanchama, con ubicación geodésica de: Latitud: -3.857833; Longitud: -73.409389. Distrito de San Juan, Provincia de Maynas, Región Loreto.

### 3.7. PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

La Figura 21, muestra el flujograma para la obtención de los extractos y posterior análisis:

**Materia prima.** La materia prima fue comprada en el mercado artesanal de Iquitos. Para actividad antioxidante la muestra fue de 2110 g de hoja de Culantro del país y 2375.67 g de hoja de Sachaculantro. Para actividad antibacteriana la muestra fue de 1383.79 g de Culantro del país y 825.15 g de Sachaculantro, fueron seleccionados y eliminando aquellas que no tenían las condiciones para el análisis. Las hojas eliminadas fueron aquellas que se encontraban marchitas y de color marrón o amarillas.

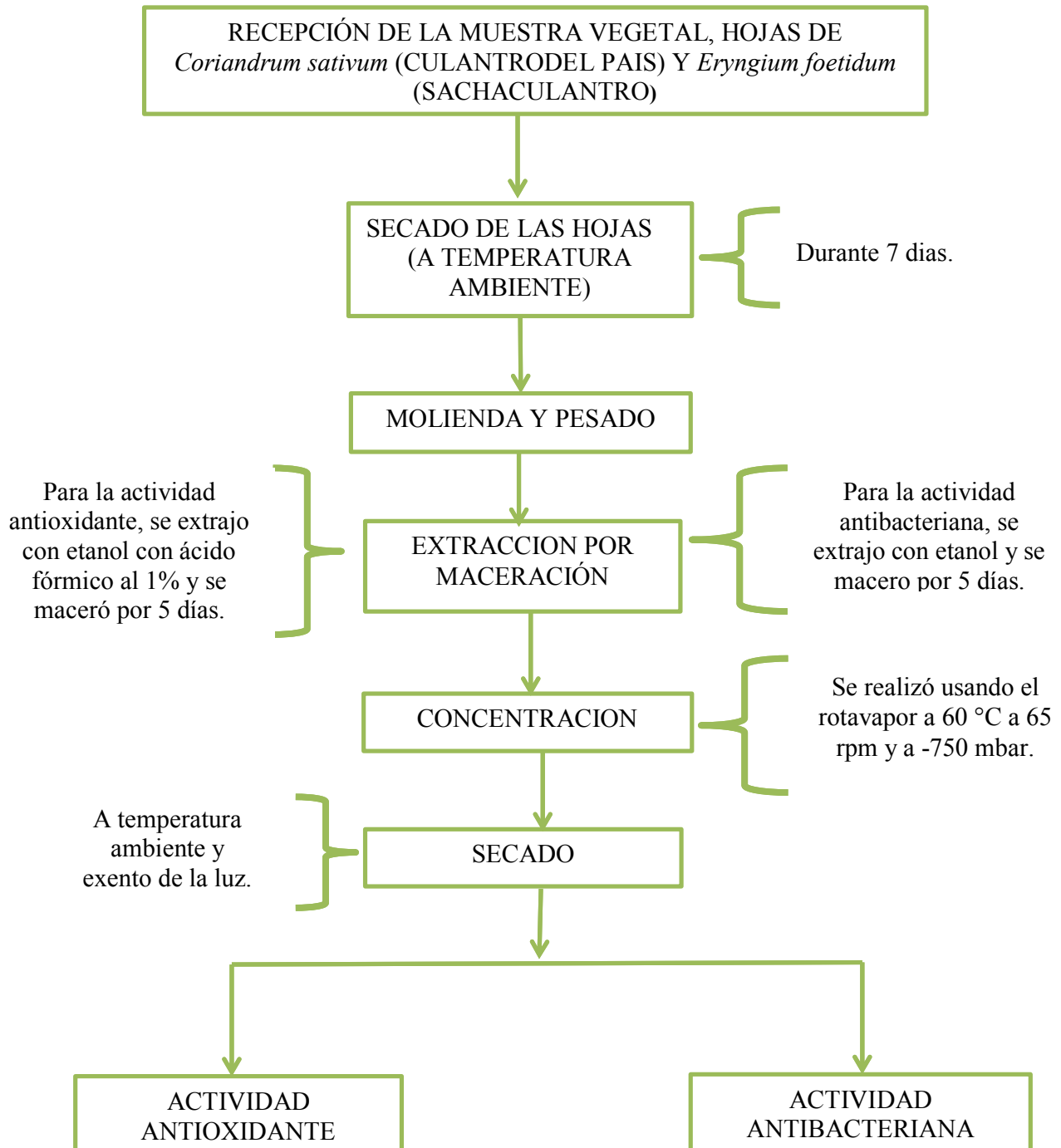
**Pesado.** Se realizó el pesado para actividad antioxidante de la hoja seca de Culantro del país (136 g) y de la hoja seca de Sachaculantro (51.50 g) y para actividad antibacteriana de la hoja seca de Culantro del país (147g) y de la hoja de Sachaculantro (134g), para obtener datos exactos de rendimiento.

**Maceración.** Para actividad antioxidante a la hoja pulverizada de Culantro y de Sachaculantro se le adiciono etanol absoluto (99.7°) con 1% ácido fórmico hasta enrazar en un recipiente de vidrio, dejando macerar por 4 días protegido de luz, para evitar la descomposición de los antioxidantes presentes por acción radical de los electrones libres presentes en la luz. Para actividad antibacteriana a la hoja pulverizada de Culantro y Sachaculantro se le adiciono alcohol puro (96°) hasta enrazar en un recipiente de vidrio, dejando macerar por 5 días.

**Concentración.** El disolvente fue removido a 60°C, -750 mbar de presión reducida en un rotavapor a 65 rpm, tanto para actividad antioxidante como antibacteriana se completó la eliminación del disolvente residual secado a temperatura ambiente y exenta de luz.

**Envasado.** El extracto seco obtenido para actividad antioxidante fue de 5.72g (hoja de culantro del país) y 2.98g (hoja de sachaculantro), que fue colocado en envases de vidrio con tapa hermética y recubiertas con papel metálico para evitar el contacto con la luz y para actividad antibacteriana fue de 19.10g (hoja de culantro del país) y 6.43g (hoja de sachaculantro), se colocó en envases de vidrio con tapa hermética.

**Análisis:** Posteriormente los extractos obtenidos fueron utilizados para el respectivo análisis de la Actividad Antibacteriana, Antioxidante y la presencia de fenoles totales, taninos, antocianinas, flavonoides.



**FIGURA N° 18: PROCESO DE OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DEL *Coriandrum sativum* (CULANTRO DEL PAIS), Y *Eryngium foetidum* (SACHACULANTRO).**

### 3.8. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

#### 3.8.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL (DPPH)

La determinación de Actividad Antioxidante (AA) fue siguiendo el método de (Brand-Williams *et al*, 1995):

Preparación de la muestra: 50 g del extracto etanólico seco, se diluyo y aforo a 10 ml con metanol consiguiendo una concentración de 5mg/ml, constituyéndose la solución patrón, a partir de esta dilución se prepararon concentraciones a 0.5; 0.25; 0.05 y 0.01 mg/ml, tomando alícuotas de 1ml (0.5 mg/ml); 0.5 ml (0.25 mg/ml); 0.1 ml (0.05 mg/ml); 0.02 ml (0.01mg/ml) y aforando a 10 ml con metanol, dejar reposar durante 30 minutos protegido de la luz.

Preparación de la solución de DPPH: Se preparó la solución stock de 1mMol de DPPH en metanol al 95%, a partir de esta se preparó la solución de trabajo de 0.1 mMoles de DPPH (también usado como blanco). Se agregó a una cubeta de poliestireno de 1 ml 0.025  $\mu$ l de cada una de las diferentes concentraciones del extracto etanólico y se agregó 0.975  $\mu$ l de 0.1 mMol de DPPH. Posteriormente fueron realizadas las lecturas de las absorbancias en el espectrofotómetro UV/Vis a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 517 nm, leídas a intervalos de 30 segundos durante 5 minutos y realizadas por triplicado.

La inhibición del secuestro del radical DPPH por soluciones crecientes de los extractos, fue determinada por la expresión siguiente.

$$\text{Inhibición de DPPH, \%} = [(\mathbf{Ac} - \mathbf{Am}) / \mathbf{Ac}] \times 100$$

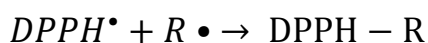
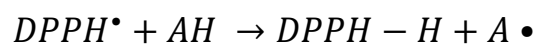
Dónde: **Ac**, es la absorbancia del control 0.1 mM de DPPH), y **Am**, es la absorbancia de la muestra (solución creciente de los extractos) en tiempo n.

### 3.8.2. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO

El extracto etanólico se reconstituyó con metanol absoluto al 50% acidificado al 1% con ácido fórmico, para las respectivas diluciones y los ensayos subsiguientes.

### 3.8.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE CON EL MÉTODO DEL DPPH

Se acondicionó el espectrofotómetro UV-Vis para determinar la actividad antioxidante por el ensayo DPPH<sup>+</sup>, el rango de longitudes de onda varía entre los 515 y 540 nm (Murillo *et al.*, 2007); para la determinación se midió a 517 nm donde presenta su máxima absorción. La solución de DPPH<sup>+</sup> se preparaba minutos antes de realizar el análisis ya que tiende a degradarse rápidamente por efectos de la luz y la temperatura (Molyneux, 2004), La reducción del DPPH se muestra en la siguiente reacción: (Brand-Williams *et al.*, 1995; Brand-Williams y Berset, 1997)



### 3.8.4. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

La metodología empleada fue de Singleton y Rossi (1965), modificada por Vela y Cuzcano (2015), para la cual se preparó una solución patrón de 0.1 mg/ml de ácido gálico. Se prepararon las diluciones para obtener la curva patrón (0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mg/ml).

A 200 µl del extracto etanólico (p/v) reconstituido de la hoja de Culantro y Sachaculantro por triplicado, se le agregaron 1.5 ml de agua destilada, 100 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu, después de 5 minutos se agregaron 200 µl de solución de carbonato de sodio al 20%, se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. El blanco se prepara simultáneamente del mismo modo pero sustituyendo la solución del extracto etanólico por metanol acidificado.

Posteriormente se midió la absorbancia a  $\lambda = 765$  nm. La concentración de fenoles se calcula con base en la curva de calibración y se expresó como mg equivalentes de ácido gálico/ml.

### **3.8.5. DETERMINACIÓN TANINOS**

La metodología empleada fue la de Valls *et al.*, (2000), mezclar 1 ml del extracto con 5 ml de mezcla de vainillina (50 ml de 1 g de vainillina en 100 ml de metanol y 50 ml de ácido fórmico 8 % en MeOH). El blanco se prepara simultáneamente del mismo modo, pero sustituyendo el extracto por ácido fórmico 8 % en MeOH. Se efectúa la lectura de absorbancia a  $\lambda=500$  nm, homogenizar y dejar en reposo 30 minutos protegidos de la luz. El calibrado se realiza con soluciones de (+)-catequina (20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{g/ml}$ ).

### **3.8.6. DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS, POR EL MÉTODO pH-DIFERENCIAL**

La metodología empleada fue la de Sotero y García (2009): La antocianina experimenta una transformación reversible con los cambios de pH manifestado por un llamativo cambio en la absorbancia. La forma oxonium predomina a pH 1 y el hemiacetal a pH 4.5. El pH diferencial es un método basado en la presencia de pigmentos degradables polimerizados y de otros compuestos interferentes.

#### **3.8.6.1. PROCEDIMIENTO**

Se prepararon dos diluciones de las muestras, una con el Buffer de cloruro de potasio pH 1 y otra con el Buffer de acetato de sodio pH 4.5, llevándolas a un volumen de 3 ml, se esperó 15 minutos a que las diluciones se equilibraran y se realizó un barrido en el espectrofotómetro de  $\lambda = 400$  a 700 nm, esperando una absorbancia de la muestra entre 0.1 y 1.2 y utilizando como blanco agua destilada.

Para la obtención de la concentración de antocianina se utiliza la fórmula de pH diferencial:

$$A = (A_{\lambda \text{ vis-máx.}} - A_{\lambda 700})_{\text{pH 1}} - (A_{\lambda \text{ vis-máx.}} - A_{\lambda 700})_{\text{pH 4.5}}$$



En donde  $A_{\lambda \text{ vis-máx.}}$  es la lectura del pico más alto a pH 1 y pH 4.5, y  $A_{\lambda 700}$ , es la lectura a  $\lambda = 700 \text{ nm}$ , tanto para pH 1 como pH 4.5 para calcular la concentración en la muestra original se sigue la siguiente formula:

$$\text{Antocianina monomérica (mg/ 100 g)} = (A * PM * FD * 100) / (\epsilon * L)$$

Donde:

**A** = absorbancia

**PM** = Peso molecular, 449.2 g/mol

**FD** = Factor de dilución

$\epsilon$  = Coeficiente de extinción molar, 26900 g/mol\*cm

**L** = Longitud de la celda.

### 3.8.7. DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES

La metodología empleada fue la de Sotero y García (2009) con algunas modificaciones, realizándose mediante la lectura de la absorbancia a  $\lambda = 374 \text{ nm}$ , del extracto etanólico reconstituido. A 3 ml del extracto etanólico, por triplicado, y utilizando agua destilada como blanco. Para realizar los cálculos del contenido de flavonoides totales, se utiliza el coeficiente de extinción molar de la quercetina como patrón ( $\epsilon = 78,66 \text{ g/mol*cm}$ ).

$$\text{Flavonoides totales (mg/ 100 g)} = (\text{Abs} * FD * 100) / (\epsilon * W)$$

**Abs** = absorbancia

**FD** = Factor de dilución

$\epsilon$  = coeficiente de extinción molar

**W** = Peso de la muestra

En algunos casos la presencia de flavonoides es tan alta que se mide en g/100 g de muestra.

### 3.8.8. DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES

La metodología empleada fue la de Gutiérrez *et al.*, (2000), Se le agrego 100 µl del extracto etanólico, 200 µl del acetato de potasio 1M, 200 µl de nitrato de aluminio al 10%, completar el volumen con metanol acidificado con ácido fórmico al 1%, dejar reposar 30 minutos en temperatura ambiente protegiendo de la luz; se realizó la lectura de la absorbancia a  $\lambda=415$  nm y utilizando como blanco metanol acidificado con ácido fórmico al 1%.

### 3.8.9. DETERMINACIÓN DE CAROTENOS Y RETINOL

La metodología empleada fue la de Sotero y Gracia (2009), Pesar 10 gr de muestra en un matraz y añadir 50 ml de alcohol n-butílico saturado con agua destilada. Tápar y agítar durante 2 min y dejar en reposo por espacio de 20 min. Filtrar a través de un papel de filtro. Llenar una cubeta de 1 cc con el extracto de la muestra y la otra con solvente (alcohol n-butílico saturado con agua). Leer la absorbancia a 450 nm, efectuar tres lecturas.

$$\beta - \text{carotenos mg/100 gr de muestra} = \frac{(A - B) \times 1,57}{W}$$

- ❖ Para la determinación del Retinol, se procede igual que para la determinación de B – caroteno, con la única diferencia de que las lecturas de la absorbancia tienen que ser a una longitud de onda de 470 nm, efectuar tres lecturas.

$$\text{Retinol mg/100 gr de muestra} = \frac{(A - B) \times 10,90}{W}$$

Donde:

**A** = Lectura de la absorbancia de la muestra.

**B** = Lectura de la absorbancia del solvente.

**D** = Longitud de onda.

**W** = Peso tomado de la muestra.

### **3.8.10. ANALISIS DE LOS DATOS**

Los espectrogramas y los datos obtenidos de los UV-Vis, fueron interpretados de acuerdo a la teoría de la actividad antioxidante, fenoles totales, taninos (catequinas y proantocianidoles), antocianinas, flavonoides y carotenos; los datos numéricos fueron procesados en la hoja de cálculo Excel 2010.

## **3.9. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA POR EL MÉTODO DE DIFUSION EN DISCO Y MACRODILUSION**

### **3.9.1. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO**

#### **3.9.1.1. DISOLUSIÓN DE LOS EXTRACTOS**

- ❖ Se pesó 360 mg de cada extracto en microtubos de tipo Sppendorf estériles, diluidos en 0.6 ml de DMSO (dimetil sulfóxido) estéril para alcanzar una concentración de prueba de 600 mg/ml (concentración A) en la separación inicial. Los extractos diluidos fueron homogenizados en el vórtex hasta la disolución completa. Los extractos que no se disolvieron por agitación se pusieron por varios minutos a baño maría (temperatura de 40°C) y colocados nuevamente en el vórtex. Para preparar la concentración B, se tomó 0,2 mL de la Conc. A y se disolvió en 0,2 mL de una mezcla Etanol/Agua estéril (1:1) para alcanzar una concentración de 300 mg/ml (Concentración B).
- ❖ Se procedió a impregnar cada disco de papel whatman con 20 µL de cada concentración, obteniendo discos impregnados de 12 y 6 mg. (INS, 2002).

#### **3.9.1.2. DE LOS CONTROLES**

El control positivo empleado en la prueba fue el antibiótico GENTAMICINA, se utilizó discos comerciales a una concentración de 10 ug/ml de esa solución. Como control negativo se empleó el DMSO 100% ESTÉRIL. (INS, 2002).

#### **3.9.1.3. CULTIVOS EN AGAR**

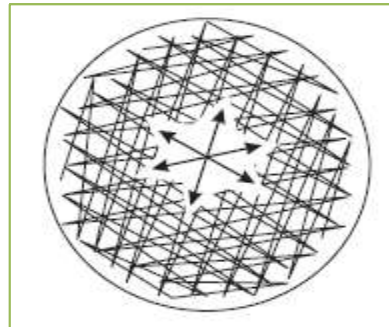
Con un asa de siembra estéril, se procedió a activar las cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella sp*, y se tomó una asada para sembrar en dos tubos de caldo nutritivo. Se Incubó a 35 – 37°C durante 18 – 24 h, después de la incubación, antes de utilizar las

bacterias activadas se realizó previamente otro subcultivos de colonias aisladas. Pasado el proceso de activación de las cepas y preparar los subcultivos se pasos a aislar los tubos de caldo nutritivo en placas Petri con Agar Müller Hinton. (INS, 2002).

#### 3.9.1.4. PREPARACIÓN DEL INOCULO

Seleccionamos de cuatro a cinco colonias bien aisladas, del mismo tipo morfológico, de un cultivo en placa de Agar Müller Hinton. Se tocó la superficie de cada colonia con un asa de siembra y se transfirió a un tubo que contiene de 4 a 5 mL de Cloruro de sodio 0.9%. Se Incubó el caldo a una temperatura entre 35°C a 37°C, hasta que alcance o exceda la turbidez del estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland (por lo general de 2 a 6 horas), por comparación visual con el estándar. La suspensión preparada contendrá aproximadamente 1 a 2 x 10<sup>8</sup> UFC/mL de *Escherichia coli* y *Salmonella Sp.* (INS, 2002).

#### 3.9.1.5. INOCULACIÓN DE LAS PLACAS



**FIGURA N° 19: Direcciones en el sembrado del inóculo sobre la superficie del agar**

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, sumergir un hisopo estéril en la suspensión, rotar el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo. Inocular la superficie seca de la placa de Agar Mueller Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Antes de colocar los discos dejar secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido. En este caso no se pudo utilizar hisopo, utilizamos micropipetas graduadas, inoculando 100 micras del inóculo y esparcimos toda la placa con ayuda de una espátula de drigalsky. (INS, 2002).

### **3.9.1.6. APLICACIÓN DE LOS DISCOS**

Se colocó los discos individuales o multidiscos sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar. Distribuimos los discos uniformemente, de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm uno del otro (el diámetro de los discos según las normas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) debe ser de 6 mm). No deben colocarse más de 12 discos en una placa de 150 mm, ni más de 6 en una placa de 100 mm de diámetro interno, para evitar la superposición de las zonas de inhibición. Un disco no debe ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar debido a que algunos antibióticos se difunden rápidamente. (INS, 2002).

### **3.9.1.7. INCUBACION**

Incubamos las placas en posición invertida a 35°C por 18-24 horas, después de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos. Después del tiempo recomendado de incubación examinar cada placa y medir los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco. (INS, 2002).

### **3.9.1.8. LECTURA DE LAS PLACAS E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS**

Medimos los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando una regla o calibrador. Se debe mantener iluminada la parte posterior a la placa Petri con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre fondo negro. Tener la precaución de observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto del paralelismo. (INS, 2002).

### **3.9.1.9. VALORES CRITICOS PARA LA MEDIDA DE SENSIBILIDAD EN DISCO**

Los valores de las concentraciones y de los diámetros críticos que delimitan las categorías sensible, intermedio y resistente (S, I, R), son el resultado de la integración de un conjunto de elementos: la distribución de las CIM para diversas poblaciones de cepas sensibles y resistentes, las concentraciones séricas y tisulares de los antibióticos, la confrontación de los resultados *in vitro* y de los resultados clínicos, así como la variabilidad estadística de los métodos utilizados. (INS, 2002).

### **3.9.2. MÉTODO DE MACRODILUSIÓN**

#### **3.9.2.1. PREPARACIÓN DEL INÓCULO Y DE LAS DILUCIONES**

El inóculo estándar, para macrodilución en caldo, lo obtuvimos por suspensión directa de colonias, en tubos de NaCl 0,9%, hasta alcanzar una turbidez comparable al 0,5 de Mc Farland. Una vez obtenido el inóculo de turbidez comparable al 0,5 de Mc Farland, diluimos en caldo para ajustar el inóculo de manera tal, que luego de colocado, cada tubo contenga aproximadamente  $1 \text{ a } 2 \times 10^8$  UFC/mL. La inoculación con la suspensión estandarizada debe hacerse dentro de los 15 minutos de preparada la misma, para evitar que el número de microorganismos aumente por duplicación. La concentración del inóculo ajustado puede variar dependiendo del método de inoculación utilizado y del microorganismo en estudio, por lo tanto se debe calcular para cada situación. Para realizar este cálculo se debe decidir el volumen exacto en el cual se va a realizar la inoculación. (Taroco *et al.*, 2008).

- ❖ Se pesarán 320 mg del extracto en viales tipo Spondorff estériles, diluidos en 0.5 ml de agua estéril para alcanzar una concentración de prueba de 360 mg/ml (solución madre o Stock).
- ❖ De la solución madre se sacarán 0.2 ml y será añadido al tubo N° 01 que contendrá 1.8 ml de caldo Mueller Hinton.
- ❖ Del tubo N° 01 se sacará 1 ml para ser añadido al Tubo N° 02 y así sucesivamente hasta llegar al tubo N°08.
- ❖ Del tubo N° 08 se sacará 1 ml que será desechado.
- ❖ Después de este proceso se añadió a todos los tubos 0.100 ml de la suspensión bacteriana.
- ❖ El volumen final mínimo, en cada tubo, será de 2 ml.
- ❖ Las concentraciones estarán comprendidas entre los rangos de 32 mg/ml a 0.25 mg/ml.
- ❖ Los extractos que no se disolvieron por agitación fueron mantenidos por algunos minutos en baño maría (temperatura de 40°C) y colocados nuevamente en el vórtex.

#### **3.9.2.2. PREPARACION DE CONTROLES**

El control positivo empleado en la prueba será el antibiótico gentamicina (160 mg/2ml), del cual se utilizará 0.64 ml y se enrasará hasta 5 ml en un tubo estéril para

obtener una solución madre o stock de 10240 ug/ml. De la solución madre se sacarán 0.2 ml y será añadido al tubo N° 01 que contendrá 1.8 ml de caldo Mueller Hinton. Del tubo N° 01 se sacará 1 ml para ser añadido al Tubo N° 02 y así sucesivamente hasta llegar al tubo N° 09. Del tubo N° 09 se sacará 1 ml que será desechado. Después de este proceso se añadirá a todos los tubos 1 ml de la suspensión bacteriana. Las concentraciones estarán comprendidas entre los rangos de 512ug/ml a 25 ug/ml.

### **3.9.2.3. INCUBACIÓN**

El tiempo de incubación para la mayoría de los microorganismos es de 16 a 20 horas, para la técnica de macrodilución.

### **3.9.2.4. LECTURA E INTERPRETACIÓN DEL CIM**

La CIM corresponde a la mínima concentración de antibiótico en donde no se observa desarrollo bacteriano (turbidez). La CIM se expresa en µg/ml.

## CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, FENOLES TOTALES, TANINOS, ANTOCIANINAS, FLAVONOIDES, CAROTENOS Y RETINOL DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS DE *Coriandrum sativum* (CULANTRO DEL PAIS).

#### 4.1.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DEL DPPH EN LAS HOJAS DE *Coriandrum sativum* (CULANTRO DEL PAIS).

En la Tabla N° 08 se muestran los promedios de las lecturas a diferentes concentraciones del extracto de las hojas de *Coriandrum sativum* L. (culantro del pais) y obtenidas de 30 lecturas por cada concentración (ver Anexo N° 01, 02 y 03), en la Tabla N° 09 se encuentra el porcentaje de inhibición con las debidas concentraciones de la muestra, se considera una actividad antioxidante cuando es superior al 25% (Tovar, 2013), dado que estamos usando como referencia; se encontró actividad antioxidante en todas las concentraciones.

Tovar (2013), determinó la actividad antioxidante de la parte aérea de 30 plantas que pertenecen a 8 familias en Colombia, en ella considera como extracto activo a aquel que muestra un porcentaje de actividad antioxidante superior al 25%; valor que se usó como referencia considerando que equivale a la mitad de la actividad antioxidante presentada por la hidroquinona, ya que utilizó a este como control positivo, similar a nuestro trabajo.

**TABLA N° 8: Promedios de las repeticiones y lecturas realizadas a las hojas de *Coriandrum sativum* (Culantro del País).**

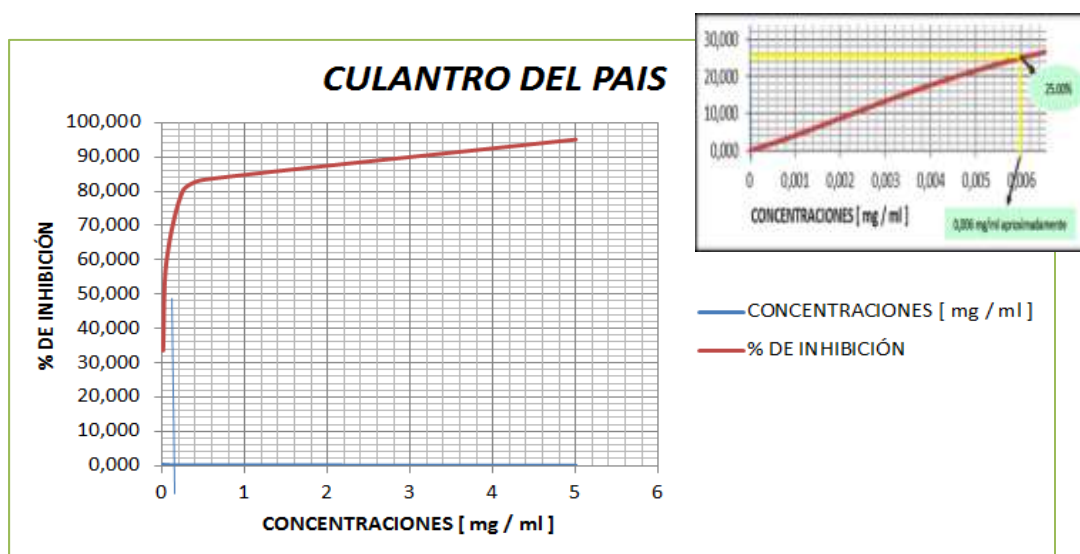
Número de Lecturas	Promedio Solución DPPH (1mM)	Extracto etanolico CULANTRO DEL PAIS (muestra-seca)				
		Concentraciones				
		5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.05 mg/ml	0.01 mg/ml
1	0,504	0,030	0,135	0,153	0,245	0,334
2	0,505	0,025	0,102	0,123	0,234	0,334
3	0,505	0,026	0,099	0,116	0,222	0,336
4	0,505	0,025	0,095	0,108	0,220	0,335
5	0,505	0,023	0,092	0,106	0,198	0,336
6	0,505	0,024	0,081	0,101	0,189	0,336
7	0,505	0,025	0,071	0,095	0,185	0,336
8	0,505	0,024	0,065	0,079	0,181	0,336
9	0,505	0,023	0,042	0,063	0,182	0,336
10	0,505	0,023	0,058	0,053	0,183	0,336
Promedio	0,505	0,025	0,084	0,100	0,204	0,335
Porcentaje de Inhibición %		<b>95,10</b>	<b>83,38</b>	<b>80,23</b>	<b>59,63</b>	<b>33,57</b>



**TABLA N° 9: Porcentaje de inhibición de las hojas de *Coriandrum sativum* (Culantro del País).**

MUESTRA <i>Coriandrum sativum</i> L .					
CONCENTRACIONES [ mg / ml ]	5	0,5	0,25	0,05	0,01
PROMEDIO DE ABSORVANCIA [A°]	0,025	0,084	0,100	0,204	0,335
% DE INHIBICIÓN	95,10	83,38	80,23	59,63	33,57

En la Figura N° 22, se puede observar el comportamiento de la actividad antioxidante de la hoja de culantro del país, en ella se puede determinar que la concentración inhibitoria minima está en todas las concentraciones, siendo minima a 0.01 mg/ml y la máxima concentración es a 5 mg/ml con un porcentaje de actividad de 95,10%. La capacidad antioxidante mínima de concentración al 25% es al 0.006 mg aproximadamente.



**FIGURA N° 20: Porcentaje de inhibición a las diferentes concentraciones de las hojas de *Coriandrum sativum* L. (Culantro del País).**

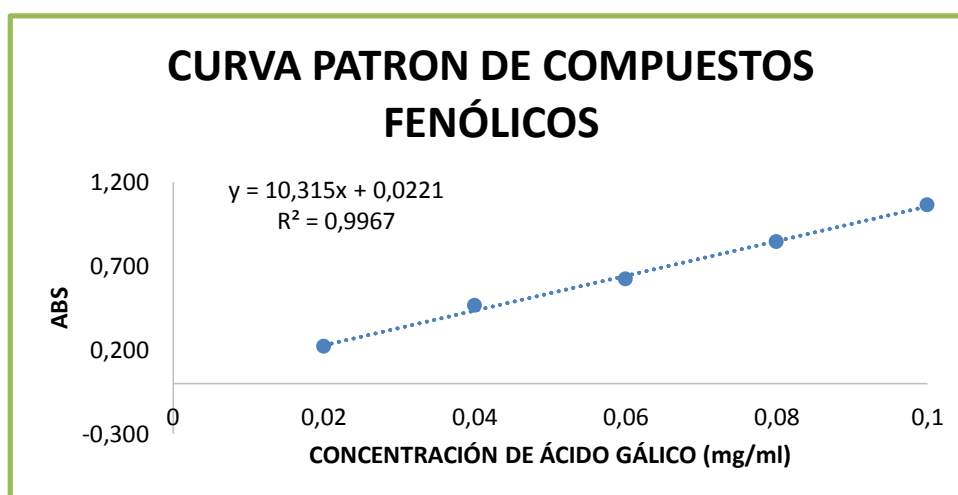
Ceballos y Giraldo (2015), determinaron que la actividad antioxidante en el extracto de las hojas es mayor que en el extracto de tallos de cilantro, con concentraciones de  $0.6345 \pm 0.0511$  y  $0.2155 \pm 0.0280$  meqTrolox/gms respectivamente.

Mercado – Mercado *et al.*, (2013), compara la actividad antioxidante de las especias mexicanas, mediante el método DPPH: Achiote (*Bixa orellana*) 14.91-16%, Ajonjolí (*Sesamum indicum*) 0.08-0.04mM/100g PS, Azafrán (*Crocus sativus*) 0.22-0.35mmol ET/p.b 15.69%, Comino (*Cuminum cyminum*) 27.5%, Jengibre (*Zingiber officinale*) 0.2-0.7mmol ET/100 PS 10.90-56.36%, Laurel (*Laurus nobilis* L.) 1.401-2.0mM

EAA/100g 53-75.6%, Orégano (*Origanum vulgare L.*) 20.910 mg EAA/100g, Perejil (*Petroselinum sativum*) 25.9-80.21mM EC, Romero (*Rosmarinus officinalis*) 0.0513mM ET/100g PS, Tomillo (*Thymus vulgaris L.*) 0.29mM ET/100g PS.

#### 4.1.2. DETERMINACION DE FENOLES TOTALES EN LAS HOJAS DE *Coriandrum sativum* (CULANTRO DEL PAIS).

Los fenoles totales de las hojas de culantro y sachaculantro fueron cuantificados mediante la ecuación de la curva patrón del ácido gálico obtenido en las mismas condiciones que se obtuvieron de las muestras tal como se observa en la Figura N° 24, donde la concentración del ácido gálico que va a concentraciones de 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1 mg/ml ( $y = 10.315x + 0.0221$ ;  $R^2 = 0.9967$ ) y la absorbancia respectiva medida a una  $\lambda = 765$  nm.



**FIGURA N° 21: Curva patrón de ácido gálico para cálculo de fenoles totales**

En la Tabla N° 10 se muestra la forma de calcular y el contenido de fenoles totales en las hojas de culantro, en ella se puede observar el valor  $29.35 \pm 0.05$  mg EAG/100 g muestra original, siendo un promedio de las mediciones.

Según Harsha y Anilakumar (2012), determinaron que los fenoles totales en hoja de culantro son de  $133.7 \mu\text{g/g}$  siendo mayores a nuestros resultados obtenidos.

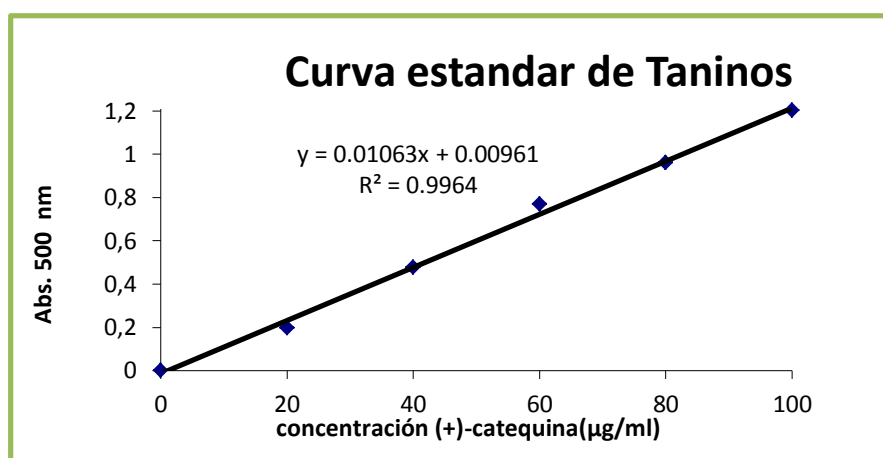
Ceballos Y Giraldo (2015); encontraron valores de polifenoles totales en hoja y tallo de cilantro obteniendo  $4.0992 \pm 0.0054$  y  $4.041 \pm 0.0583$  mg ácido gálico/g ms respectivamente.

**TABLA N° 10: Contenido de fenoles totales de las hojas de *Coriandrum sativum* (Culantro del País).**

Tipo de muestra	Código repetición	Alicota de extracto seco	Alicota de extracto seco	Volumen Acentado 1	Volumen Acentado 2		Alicota en el tubo	lectura en el espectrofotómetro	concentración FT	concentración FT	concentración FT	concentración FT	MEDIA FT	DS	
		(g)	(mg)	(ml)	Alicota (ml)	Acentado 2 (ml)	Factor de dilución	Abs.765nm	mgGAE/mL	mgGAE	mgGAE/mg Alicota extracto seco	mgGAE/100g muestra original	mgGAE/100g muestra original		
		a	b= a*1000	c	d	e	f=a/g	h	i= h	j= f*c	k= j/a	l= j/a			
CULANTRO DEL PAIS 1	1	91	0,1000	100,00	20,00	1,000	1,000	1,000	0,200	0,381	0,035	0,696	6,959	29,268	0,047
		92	0,1000	100,00	20,00	1,000	1,000	1,000	0,200	0,381	0,035	0,696	6,959	29,268	
		93	0,1000	100,00	20,00	1,000	1,000	1,000	0,200	0,382	0,035	0,698	6,978	29,349	
CULANTRO DEL PAIS 2	2	91	0,1000	100,00	20,00	1,000	1,000	1,000	0,200	0,382	0,035	0,698	6,978	29,349	0,047
		92	0,1000	100,00	20,00	1,000	1,000	1,000	0,200	0,382	0,035	0,698	6,978	29,349	
		93	0,1000	100,00	20,00	1,000	1,000	1,000	0,200	0,383	0,035	0,700	6,998	29,431	
CULANTRO DEL PAIS 3	3	91	0,1000	100,00	20,00	1,000	1,000	1,000	0,200	0,382	0,035	0,698	6,978	29,349	0,047
		92	0,1000	100,00	20,00	1,000	1,000	1,000	0,200	0,382	0,035	0,698	6,978	29,349	
		93	0,1000	100,00	20,00	1,000	1,000	1,000	0,200	0,383	0,035	0,700	6,998	29,431	
Promedio Total												29,349	0,047		

#### 4.1.3. DETERMINACION DE TANINOS EN LAS HOJAS DE *Coriandrum sativum* (CULANTRO DEL PAIS).

Las catequinas y proantocianidoles también conocidos como taninos condensados, fueron cuantificados mediante la ecuación de la curva estándar de taninos obtenido en las mismas condiciones que se obtuvieron de las muestras tal como se observa en la Figura N° 19, donde las concentraciones de 20, 40, 60, 80, 100 µg/ml ( $y = 0.01063x + 0.00961$ ;  $R^2 = 0.9964$ ) y la absorbancia respectiva medida a una  $\lambda = 500$  nm, esta curva fue empleada para la determinación de taninos en las hojas de Culantro y Sachaculantro.



**FIGURA N° 22: Curva estándar de taninos para cálculo de Taninos**

La determinación de la presencia de taninos en culantro del país se muestra en el Tabla N° 11 con un valor de  $21.60 \pm 0.05$  mg (+)-catequina/100g de muestra original, confirmando la regular cantidad de los taninos en hojas de *Coriandrum sativum*.

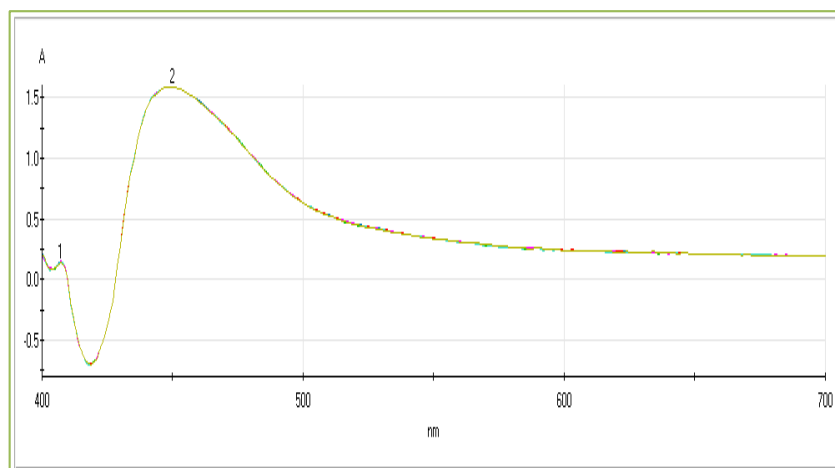
Garg *et al.*, (2012), menciona que la concentración de taninos en culantro fue de  $270 \mu\text{g/g}$  y Yanza (2014) obtuvo una concentración de taninos en culantro de  $114 \mu\text{g/g}$ , este bajo rendimiento de metabolito podría deberse a las variedades de culantro analizados.

**TABLA N° 11: Contenido de Catequinas y proantocianidoles (Taninos) de las hojas de *Coriandrum sativum* (Culantro del País).**

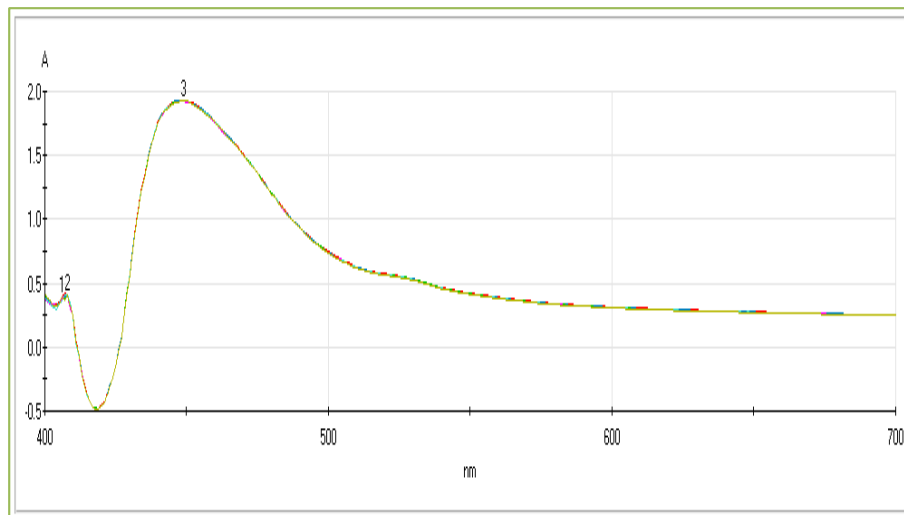
Tipo de muestra	Código	repetición	Alicota del extracto seco	Alicota del extracto seco	Volumen Ajustado 1	Alicota en el tubo	lectura en el Espectro	concentración taninos	concentración taninos	concentración taninos	concentración taninos	concentración taninos	MEDIA concentración taninos	DS
			g/l	(mg)	(ml)	(mL)	Abs.500 nm	$\mu\text{g}(+)\text{-Catequina/ml}$	$\text{mg}(+)\text{-Catequina/ml}$	$\text{mg}(+)\text{-Catequina}$	$\text{mg}(+)\text{-catequina/g alicota extracto seco}$	$\text{mg}(+)\text{-catequina/100 g muestra original}$	$\text{mg}(+)\text{-catequina/100 g muestra original}$	
			a	b = a*1000	c	e	f	g = f/a	g = f/a	h = g*c	i = h/b	j = h/b		
CULANTRO DEL PAIS	1	R1	0,1000	100,00	20,00	0,200	0,283	25,719	0,026	0,514	5,144	21,634	21,634	
		R2	0,1000	100,00	20,00	0,200	0,283	25,719	0,026	0,514	5,144	21,634		
		R3	0,1000	100,00	20,00	0,200	0,283	25,719	0,026	0,514	5,144	21,634		
CULANTRO DEL PAIS	1	R1	0,1000	100,00	20,00	0,200	0,283	25,719	0,026	0,514	5,144	21,634	21,581	0,046
		R2	0,1000	100,00	20,00	0,200	0,282	25,625	0,026	0,512	5,125	21,555		
		R3	0,1000	100,00	20,00	0,200	0,282	25,625	0,026	0,512	5,125	21,555		
CULANTRO DEL PAIS	1	R1	0,1000	100,00	20,00	0,200	0,283	25,719	0,026	0,514	5,144	21,634	21,581	0,046
		R2	0,1000	100,00	20,00	0,200	0,282	25,625	0,026	0,512	5,125	21,555		
		R3	0,1000	100,00	20,00	0,200	0,282	25,625	0,026	0,512	5,125	21,555		
Promedio Total												21,599	0,030	

#### 4.1.4. DETERMINACION DE ANTOCIANINAS EN LAS HOJAS DE *Coriandrum sativum* (CULANTRO DEL PAIS).

En las Figuras N° 23 y N° 24, se muestra el espectro de absorción a pH 4.5 y pH 1 del extracto etanólico de las hojas de culantro hecho por un barrido de absorción a  $\lambda$  de 400 a 700 nm.



**FIGURA N° 23: Absorción del extracto etanólico de la hoja de *Coriandrum sativum* L. (Culantro del país) de 400 a 700 nm a pH 4.5 para la determinación de antocianinas**



**FIGURA N° 24: Absorción del extracto etanólico de la hoja de *Coriandrum sativum* L. (Culantro del país) de 400 a 700 nm a pH 1 para la determinación**

En la Tabla N° 12, se muestra las absorbancias de pequeños picos más representativos obtenidos entre 400 a 700 nm que aparecen en la Figura 18 por triplicado (Ver anexo N° 10) de hoja de *Coriandrum sativum* L. (culantro del país) a pH 1 y pH 4.5 y valores fijos a 700 nm, la cantidad promedio obtenido de antocianinas aplicando la fórmula descrita en la metodología fue de  $38,37 \pm 3.64$  mg de cianidina-3-glucosido/100 g de muestra original.

**TABLA N° 12: Absorciones y cálculo de antocianinas presentes en las hojas de *Coriandrum sativum* (Culantro del País).**

Tipo de muestra	Código	repetición	ABS = $\lambda$ Vis-máx pH 1	ABS = $\lambda$ Vis-máx nm pH 4.5	ABS = 700 nm pH 1	ABS = 700 nm pH 4.5	$A = (a-c) - (b-d)$	PM	FD	$\epsilon$	$l$	Concentración de Antocianinas	Media Antocianinas	SD
			(a)	(b)	(c)	(d)		g/mol		L/cm <sup>2</sup> mol	cm	mgCianidina-3-glucosido/100 g muestra original	mgCianidina-3-glucosido/100 g muestra original	
CULANTRO DEL PAIS	extracto 1	R1	1,8700	1,5450	0,244	0,199	0,2800	448,2	3,0	26.900,0	1,0	35,3977	34,7656	0,5793
		R2	1,8550	1,5340	0,244	0,194	0,2730	448,2	3,0	26.900,0	1,0	34,2599		
		R3	1,8130	1,4900	0,244	0,195	0,2740	448,2	3,0	26.900,0	1,0	34,6392		
CULANTRO DEL PAIS	extracto 1	R4	1,7640	1,4350	0,244	0,195	0,2800	448,2	3,0	26.900,0	1,0	35,3977	41,9716	6,7039
		R5	1,7900	1,3560	0,244	0,196	0,3860	448,2	3,0	26.900,0	1,0	40,7963		
		R6	1,7170	1,3400	0,244	0,197	0,3300	448,2	3,0	26.900,0	1,0	41,7187		
Promedio Total												38,3686	3,6416	

#### 4.1.5. DETERMINACION DE FLAVONOIDES EN LAS HOJAS DE *Coriandrum sativum* (CULANTRO DE PAIS).

Los flavonoides presentes en las hojas de Culantro, fue determinado por absorción a  $\lambda=374$  nm y se consignan los datos en la Tabla N° 13, obteniendo el valor de  $30.45 \pm 0.09$  g quercetina/100g muestra original.

Garg *et al.*, (2012), obtuvo valores de flavonoides en culantro de  $1000 \mu\text{g/g}$ , estos valores tienen similitud con el obtenido en el estudio según Yanza (2014), donde los valores de flavonoides en culantro fue de  $805 \mu\text{g/g}$ . El rendimiento menor de flavonoides pudo ser causado por la variación en la concentración del extracto.

Según investigaciones del Departamento de Fisiología de la Universidad de León y del Hospital de León, la contribución de los flavonoides al potencial antioxidante de la dieta humana es importante. Aunque los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, el valor medio de ingesta de flavonoides se estima en unos 23 miligramos al día, teniendo en cuenta que el consumo medio de sustancias antioxidantes tan valoradas como la vitamina C es de entre 70-100 miligramos al día y el de la vitamina E, de entre 7-10 miligramos diarios, se puede considerar como relevante la contribución de los flavonoides como antioxidantes a la dieta.

**TABLA N° 13: Determinación de flavonoides de las hojas de *Coriandrum sativum* (Culantro del País).**

Tipo de muestra	Código	repetición	ABSORBANCIA	PM	FD	$\epsilon$	L	Concentración de Flavonoides	Media Flavonoides	SD
				g/mol		L/cm <sup>2</sup> mol	cm	g quercetina/100 g muestra original	g quercetina/100 g muestra original	
CULANTRO DEL PAIS	extracto 1	R1	0,935	302,236	10,00	78,66	1,00	30,22	30,41	0,17
		R2	0,944	302,236	10,00	78,66	1,00	30,51		
		R3	0,944	302,236	10,00	78,66	1,00	30,51		
CULANTRO DEL PAIS	extracto 1	R4	0,943	302,236	10,00	78,66	1,00	30,48	30,47	0,05
		R5	0,944	302,236	10,00	78,66	1,00	30,51		
		R6	0,941	302,236	10,00	78,66	1,00	30,41		
CULANTRO DEL PAIS	extracto 1	R7	0,943	302,236	10,00	78,66	1,00	30,48	30,47	0,05
		R8	0,944	302,236	10,00	78,66	1,00	30,51		
		R9	0,941	302,236	10,00	78,66	1,00	30,41		
Promedio Total								30,45	0,09	

4.1.6. **DETERMINACION DE CAROTENOS Y RETINOL EN LAS HOJAS DE *Coriandrum sativum* (CULANTRO DEL PAIS).**

Los Carotenos presentes en las hojas de Culantro, fue determinado por absorción a  $\lambda = 450$  nm y se consignan los datos en la Tabla N° 14, obteniendo un promedio de 0,443 mg/100 g de muestra. El Retinol presente en las hojas de Culantro, fue determinado por absorción a  $\lambda = 470$  nm y se consignan los datos en la Tabla N° 15, obteniendo un promedio de 2.344 mg/100 g de muestra.

**TABLA N° 14: Lecturas realizadas a las hojas de *Coriandrum sativum* (CULANTRO DEL PAIS) para determinar  $\beta$ -CAROTENO**

$\beta$ - Caroteno			
Repeticiones	Control	Muestra	Fórmula
1	0,172	2,996	0,443368
2	0,172	2,994	0,443054
3	0,172	2,993	0,442897
4	0,172	2,994	0,443054
5	0,172	2,992	0,44274
6	0,172	2,994	0,443054
7	0,172	2,993	0,442897
8	0,172	2,995	0,443211
<b>PROMEDIO (mg/100g de muestra)</b>			<b>0,4430344</b>

**TABLA N° 15: lecturas realizadas a las hojas DE *Coriandrum sativum* (CULANTRO DEL PAIS) para determinar retinol**

Retinol			
Repeticiones	Control	Muestra	Fórmula
1	0,796	2,948	2,34568
2	0,796	2,947	2,34459
3	0,796	2,948	2,34568
4	0,796	2,95	2,34786
5	0,796	2,941	2,33805
6	0,796	2,944	2,34132
7	0,796	2,948	2,34568
8	0,796	2,948	2,34568
<b>PROMEDIO (mg/100g de muestra)</b>			<b>2,3443175</b>

**4.2. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, FENOLES TOTALES, TANINOS, ANTOCIANINAS, FLAVONOIDES, CAROTENOS Y RETINOL DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS DE *Eryngium foetidum* (SACHACULANTRO).**

**4.2.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DEL DPPH EN LAS HOJAS DE *Eryngium foetidum* (SACHACULANTRO).**

En la Tabla N° 16 se muestran los promedios de las lecturas a diferentes concentraciones del extracto de las hojas de sachaculantro y obtenidas de 30 lecturas por cada concentración (ver anexo N° 04, 05 y 06), en la Tabla N° 17 se encuentra el porcentaje de inhibición con las debidas concentraciones de la muestra, se considera una actividad antioxidante cuando es superior al 25% (Tovar, 2013), dado que estamos usando como referencia; se encontró actividad antioxidante en todas las concentraciones.

**TABLA N° 16: Promedios de las repeticiones y lecturas realizadas a las hojas de *Eryngium foetidum* (sachaculantro).**

Número de Lecturas	Promedio Solución DPPH (1mM)	Extracto etanolico SACHACULANTRO (muestra-seca)				
		Concentraciones				
		5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.05 mg/ml	0.01 mg/ml
<b>1</b>	0,881	0,431	0,296	0,789	0,871	0,881
<b>2</b>	0,881	0,423	0,236	0,786	0,870	0,880
<b>3</b>	0,881	0,394	0,196	0,775	0,870	0,880
<b>4</b>	0,881	0,354	0,172	0,765	0,869	0,879
<b>5</b>	0,881	0,300	0,151	0,760	0,868	0,879
<b>6</b>	0,881	0,287	0,136	0,758	0,868	0,879
<b>7</b>	0,881	0,273	0,137	0,755	0,868	0,878
<b>8</b>	0,881	0,275	0,140	0,751	0,867	0,877
<b>9</b>	0,881	0,273	0,135	0,748	0,867	0,876
<b>10</b>	0,881	0,264	0,130	0,744	0,866	0,876
Promedio	0,881	0,327	0,173	0,763	0,868	0,878
Porcentaje de Inhibición %		<b>62,83</b>	<b>80,37</b>	<b>13,38</b>	<b>1,43</b>	<b>0,29</b>

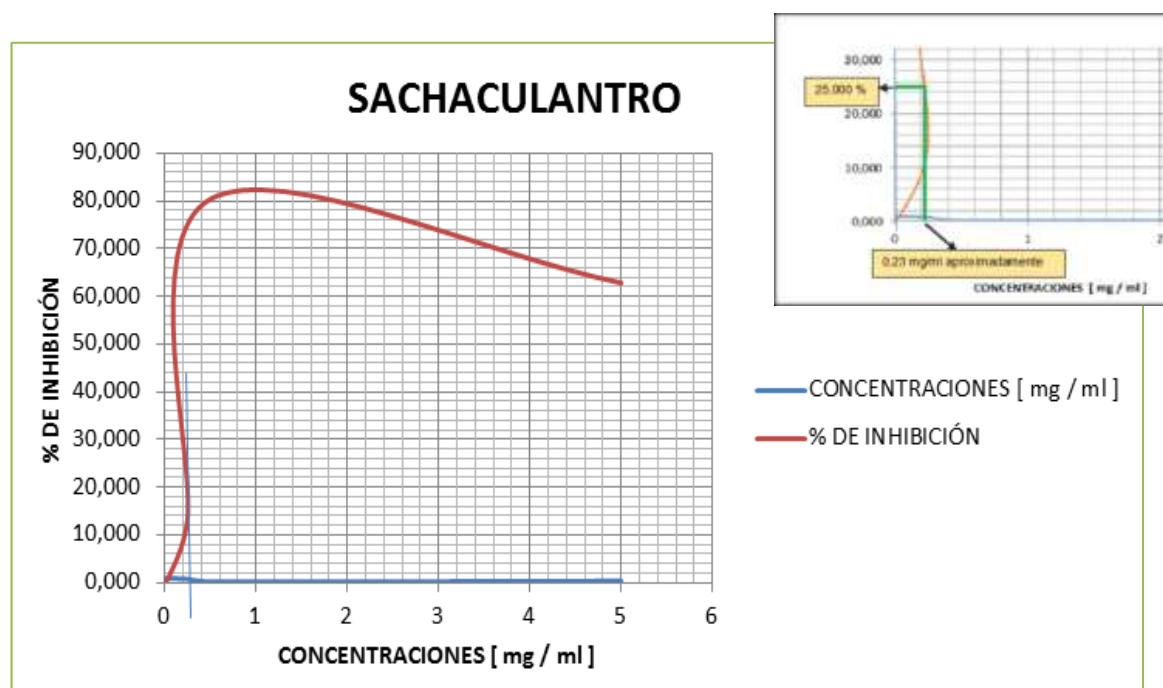


**TABLA N° 17: Porcentaje de inhibición de las hojas de *Eryngium foetidum* (sachaculantro).**

<b>MUESTRA <i>Eryngium foetidum</i></b>					
<b>CONCENTRACIONES [ mg / ml ]</b>	5	0,5	0,25	0,05	0,01
<b>PROMEDIO DE ABSORCION [A°]</b>	0,327	0,173	0,763	0,868	0,878
<b>% DE INHIBICIÓN</b>	62,83	80,37	13,38	1,43	0,29

En la Figura N° 25, se puede observar el comportamiento de la actividad antioxidante de las hojas de Sachaculantro, en ella se pudo determinar que la concentración inhibitoria mínima está en todas las concentraciones, siendo mínima a 0.01 mg/ml y la máxima concentración es a 0.5 mg/ml con un porcentaje de actividad de 80.37%, la capacidad antioxidante mínima de concentración al 25% es al 0.23 mg aproximadamente.

**FIGURA N° 25: Porcentaje de inhibición a las diferentes concentraciones de *Eryngium foetidum* (sachaculantro)**



Rodriguez (2014), evaluó la actividad antioxidante del aceite esencial de *Eryngium foetidum* L. "siuca culantro", determinada con el modelo del radical 2,2-difenilpicrilhidrazil y comparado con el trolox, presenta un efecto de captación del radical DPPH, expresado en porcentaje de captación de 70% equivalente a 150mg/mL. En la determinación de la actividad antioxidante entre la concentración y

el efecto de captación del radical DPPH, se corrobora que a mayor concentración mayor es el efecto antioxidante del aceite esencial.

Jaramillo *et al.* (2011), determino en el aceite esencial de las hojas de *E. foetidum* la actividad antioxidante que se expresó como porcentaje de inhibición del radical DPPH (89,39%).

Montoya *et al.* (2003), evaluó la capacidad antioxidante de varias plantas por el grado de decoloración del DPPH: Saúco (*Sambucus niga L.*) 75.24%, Mejorana (*Origanum majorana L.*) 65.05%, Salvia (*Salvia officinalis L.*) 52.03, Albahaca (*Ocimum basilicum L.*) 11.46%, Ajenjo (*Artemisia absinthium L.*) 8.33%.

#### 4.2.2. DETERMINACION DE FENOLES TOTALES DE LAS HOJAS DE *Eryngium foetidum* (SACHACULANTRO).

Siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente se procedio al cálculo de la determinación de fenoles totales.

En La Tabla N° 18 se muestra la forma del cálculo de la presencia del contenido de fenoles totales en la hoja con un valor  $192,42 \pm 0,10$  mg EAG/100 g muestra original obtenido del valor promedio de las mediciones.

Singh *et al.*, (2012) obtuvo de las hojas de *E. foetidum* los valores de Fenoles Totales: 223.7mg/100g, siendo mayor que nuestros resultados obtenidos en fenoles totales.

**TABLA N° 18: Contenido de fenoles totales de la hoja de *Eryngium foetidum* (sachaculantro).**

Tipo de muestra	Código	repetición	Alicota de	Alicota de	Volumen	Volumen	Alicota en el	lectura en el	concentración FT	concentración	concentración	concentración FT	MEDIA FT	DS		
			extrato seco	extrato seco	Acertado 1	Acertado 2	factor de	tubo	Equipo	FT	FT	FT	FT			
			(g)	(mg)	(ml)	(ml)	(mL)	Abs.765 nm	mgGAE/ml	mgGAE	mgGAE/mg	mgGAE/100g	mgGAE/100g			
			a	b=x*1000	c	d	e	f=g/d	h	i=f*1	j=i/a	k=j/a	l=k/a			
SACHACULANTRO 1	1	R1	0,1000	100,00	30,00	1,000	1,000	1,000	0,200	1,165	0,111	3,324	33,240	192,340	192,396	0,097
		R2	0,1000	100,00	30,00	1,000	1,000	1,000	0,200	1,166	0,111	3,327	33,269	192,508		
		R3	0,1000	100,00	30,00	1,000	1,000	1,000	0,200	1,165	0,111	3,324	33,240	192,340		
SACHACULANTRO 2	2	R1	0,1000	100,00	30,00	1,000	1,000	1,000	0,200	1,166	0,111	3,327	33,269	192,508	192,452	0,097
		R2	0,1000	100,00	30,00	1,000	1,000	1,000	0,200	1,165	0,111	3,324	33,240	192,340		
		R3	0,1000	100,00	30,00	1,000	1,000	1,000	0,200	1,166	0,111	3,327	33,269	192,508		
SACHACULANTRO 3	3	R1	0,1000	100,00	30,00	1,000	1,000	1,000	0,200	1,165	0,111	3,324	33,240	192,340	192,396	0,097
		R2	0,1000	100,00	30,00	1,000	1,000	1,000	0,200	1,166	0,111	3,327	33,269	192,508		
		R3	0,1000	100,00	30,00	1,000	1,000	1,000	0,200	1,165	0,111	3,324	33,240	192,340		
Promedio Total													192,415	0,097		

#### 4.2.3. DETERMINACION DE TANINOS EN LAS HOJAS DE *Eryngium foetidum* (SACHACULANTRO).

La determinación de taninos fue siguiendo el procedimiento descrito anteriormente:

La determinación de la presencia de taninos se muestra en el Tabla N° 19 con un valor de  $-5.86 \pm 0,02$  mg (+)-catequina/100g de muestra original, confirmando la nula concentración de los taninos en las hojas de Sachaculantro.

Singh *et al.*, (2012) obtuvo de las hojas de *E. foetidum* en metanol como resultado de taninos: 84.8mg/100g. Siendo mayor a nuestros resultados obtenidos en taninos, este bajo rendimiento en los resultados puede ser por las variedades de sachaculantro utilizado para los análisis, así mismo la calidad del suelo.

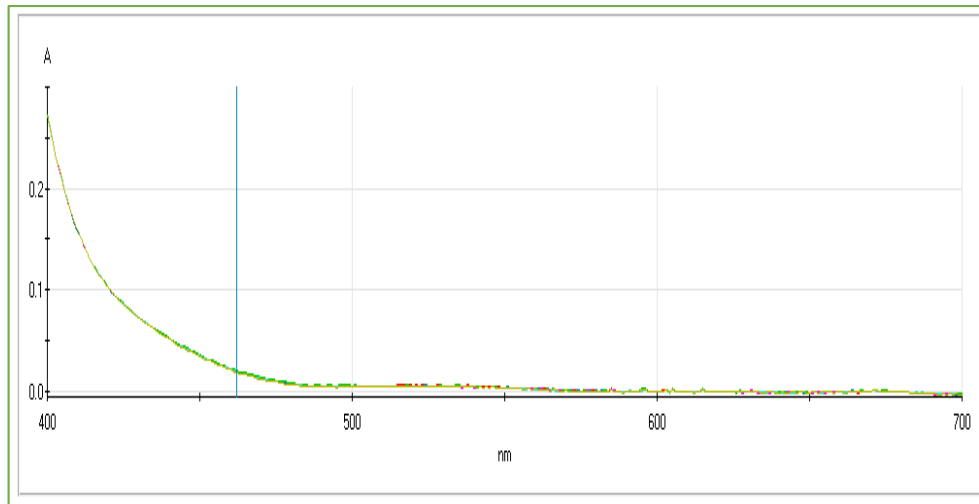
Al-Jaber *et al.*, (2011), reporta que las proantocianidinas tienen gran interés en la nutrición y la medicina por su capacidad antioxidante y posibles efectos protectores en la salud humana.

**TABLA N° 19: Contenido de Catequinas y proantocianidoles (Taninos) de la hoja de *Eryngium foetidum* (sachaculantro).**

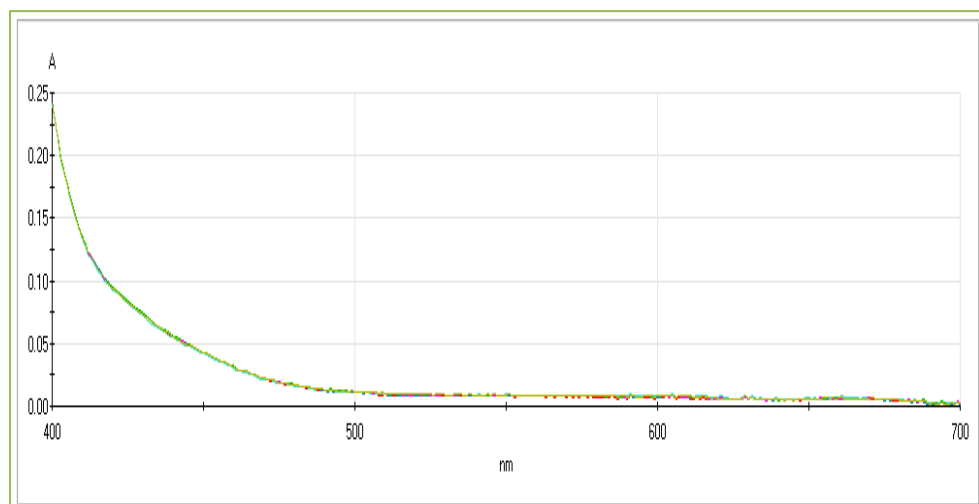
Tipo de muestra	Código	repetición	Alicuota del	Alicuota del	Volumen	Alicuota en	lectura en el	concentración	concentración	concentración	concentración	concentración	MEDIA	DS
			extrato seco	extrato seco	Acertado l.	en el tubo	en el Equipo	taninos	taninos	taninos	taninos	taninos	concentración	
			(g)	(mg)	(ml)	(ml)	Abs.500 nm	µg(+)-Catequina/ml	mg(+)-Catequina/ml	mg(+)-Catequina	mg(+)-catequina/g alicuota extrato seco	mg(+)-catequina/100 g muestra original	mg(+)-catequina/100 g muestra original	
			a	b=a*2000	c	e	f	g=@	g=@	b=g*c	i=b/a	j=b/a		
SACHACULANTRO	1	R1	0,1000	100,00	20,00	0,200	-0,045	5,137	0,005	0,103	1,027	5,945	5,945	-
		R2	0,1000	100,00	20,00	0,200	-0,045	5,137	0,005	0,103	1,027	5,945		
		R3	0,1000	100,00	20,00	0,200	-0,045	5,137	0,005	0,103	1,027	5,945		
SACHACULANTRO	1	R1	0,1000	100,00	20,00	0,200	-0,044	5,043	0,005	0,101	1,009	5,836	5,836	-
		R2	0,1000	100,00	20,00	0,200	-0,044	5,043	0,005	0,101	1,009	5,836		
		R3	0,1000	100,00	20,00	0,200	-0,044	5,043	0,005	0,101	1,009	5,836		
SACHACULANTRO	1	R1	0,1000	100,00	20,00	0,200	-0,045	5,137	0,005	0,103	1,027	5,945	5,873	0,063
		R2	0,1000	100,00	20,00	0,200	-0,044	5,043	0,005	0,101	1,009	5,836		
		R3	0,1000	100,00	20,00	0,200	-0,044	5,043	0,005	0,101	1,009	5,836		
Promedio Total-												5,885	0,021	

#### 4.2.4. DETERMINACION DE ANTOCIANINAS EN LAS HOJAS DE *Eryngium foetidum* (SACHACULANTRO).

En las Figuras N° 26 y N° 27, se muestra el espectro de absorción a pH 4.5 y pH 1.0 del extracto etanólico de las hojas de Sachaculantro hecho por un barrido de 400 a 700 nm, en ella se puede observar pequeños picos, pero siguiendo una forma decreciente.



**FIGURA N° 26:** Absorción del extracto etanólico de la hoja de *Eryngium foetidum* (sachaculantro) de 400 a 700 nm a pH 4.5 para la determinación de antocianinas.



**FIGURA N° 27:** Absorción del extracto etanólico de la hoja de *Eryngium foetidum* (sachaculantro) de 400 a 700 nm a pH 1 para la determinación de antocianinas.

En la Tabla N° 20, se observan las absorbancias por triplicado de pequeños picos más representativos obtenidos entre 400 a 700 nm (Ver anexo N° 15) de la hoja de Sachaculantro a pH 1 y pH 4.5 y valores fijos a 700 nm, el promedio obtenido de antocianinas aplicando la formula descrita en la metodología fue de 15.62±5.01 mg de cianidina-3-glucosido/100g de muestra original, este valor refleja claramente la mínima cantidad de antocianinas en la hoja de Sachaculantro, corroborando el comportamiento en la figuras anteriores.

Singh *et al.*, (2012) obtuvo la cantidad de 52.8 mg/100g en antocianinas en las hojas de *E. foetidum*. Siendo mayor que nuestros resultados.

**TABLA N° 20: Absorciones y cálculo de antocianinas presentes en la hoja del *Eryngium foetidum* (sachaculantro).**

Tipo de muestra	Código	Repetición	ABS = λ Vis-náx	ABS = λ Vis-náx nm	ABS = 700 nm	ABS = 700 nm	A = (a-c)/(b-d)	PM	FD	ε	L	Concentración de Antocianinas	Medio Antocianinas	SD
			pH 1	pH 4.5	pH 1	pH 4.5	g/mol							
			(a)	(b)	(c)	(d)								
SACHACULANTRO	extracto I	71	0,5630	0,2880	0,201	0,018	0,6620	448,2	3,0	26.900,0	1,0	10,7835	10,8995	2,7847
		72	0,4780	0,2480	0,201	0,018	0,6470	448,2	3,0	26.900,0	1,0	8,1746		
		73	0,4650	0,2040	0,2	0,018	0,6790	448,2	3,0	26.900,0	1,0	13,7403		
SACHACULANTRO	extracto I	74	0,4480	0,1730	0,201	0,018	0,6930	448,2	3,0	26.900,0	1,0	16,0014	20,3496	7,2321
		75	0,4220	0,1450	0,201	0,018	0,6940	448,2	3,0	26.900,0	1,0	16,3452		
		76	0,4140	0,0650	0,201	0,017	0,6660	448,2	3,0	26.900,0	1,0	28,6901		
Promedio Total												15,6245	5,0084	

#### 4.2.5. DETERMINACION DE FLAVONOIDES EN LAS HOJAS DE *Eryngium foetidum* (SACHACULANTRO).

Los flavonoides presentes en las hojas de Sachaculantro fueron determinadas por absorción a  $\lambda = 374$  nm y calculado mediante la aplicación de la fórmula mostrada en la metodología, en la tabla N° 20 consignan los datos obtenidos, en la cual encontramos  $10.34 \pm 0.0$  g quercetina/100g muestra original (600 mg quercetina/100g muestra original).

Singh *et al.*, (2012) obtuvo en sus resultados de flavonoides en las hojas de *E. foetidum* la cantidad de 174.6mg/100g. Siendo mayor que nuestros resultados, esto puede deberse a las diferentes variedades de sachaculantro utilizada en los análisis.

Los flavonoides por acción de la captura del radical libre ejercen un efecto protector en los daños del tejido esquémico por perfusión, y por acción como antioxidante exhibiendo varios efectos benéficos como antiinflamatorios, antialérgicos, antivirales y con actividad anticancerígena. También se ha sugerido un rol protector en enfermedades del hígado, cataratas y enfermedades cardiovasculares. (Lin *et al.*, 2008).

**TABLA N° 21: Determinación de flavonoides de las hojas de *Eryngium foetidum* (sachaculantro).**

Tipo de muestra	Código	repetición	ABSORBANCIA	PM	FD	E	L	Concentración de Flavonoides	Media Flavonoides	SD
				g/mol		L/cm <sup>2</sup> mol	cm	g quercetina/100 g muestra original	g quercetina/100 g muestra original	
SACHACULANTRO	extrato 1	R1	0,155	302,236	10,00	78,66	1,00	10,34	10,34	-
		R2	0,155	302,236	10,00	78,66	1,00	10,34		
		R3	0,155	302,236	10,00	78,66	1,00	10,34		
SACHACULANTRO	extrato 1	R4	0,155	302,236	10,00	78,66	1,00	10,34	10,34	-
		R5	0,155	302,236	10,00	78,66	1,00	10,34		
		R6	0,155	302,236	10,00	78,66	1,00	10,34		
SACHACULANTRO	extrato 1	R7	0,155	302,236	10,00	78,66	1,00	10,34	10,34	-
		R8	0,155	302,236	10,00	78,66	1,00	10,34		
		R9	0,155	302,236	10,00	78,66	1,00	10,34		
<b>Promedio Total</b>								<b>10,34</b>	<b>-</b>	

#### 4.2.6. DETERMINACION DE CAROTENOS Y RETINOL EN LAS HOJAS *Eryngium foetidum* (SACHACULANTRO).

Los Carotenos presentes en las hojas de Sachaculanro, fue determinado por absorción a  $\lambda = 450$  nm y se consignan los datos en la Tabla N° 22, obteniendo un promedio de 0.166 mg/100 g de muestra. El Retinol presente en las hojas de Sachaculanro, fue determinado por absorción a  $\lambda = 470$  nm y se consignan los datos en la Tabla N° 22, obteniendo un promedio de 0.243 mg/100 g de muestra.

**TABLA N° 22: LECTURAS REALIZADAS A LAS HOJAS DE SACHACULANTRO PARA DETERMINAR  $\beta$ -CAROTENO**

<b><math>\beta</math>- Caroteno</b>			
Repeticiones	Control	Muestra	Fórmula
1	0,172	1,234	0,166734
2	0,172	1,234	0,166734
3	0,172	1,234	0,166734
4	0,172	1,234	0,166734
5	0,172	1,234	0,166734
6	0,172	1,234	0,166734
7	0,172	1,234	0,166734
8	0,172	1,234	0,166734
<b>PROMEDIO (mg/100g de muestra)</b>			<b>0,166734</b>

**TABLA N° 23: LECTURAS REALIZADAS A LAS HOJAS DE SACHACULANTRO PARA DETERMINAR RETINOL**

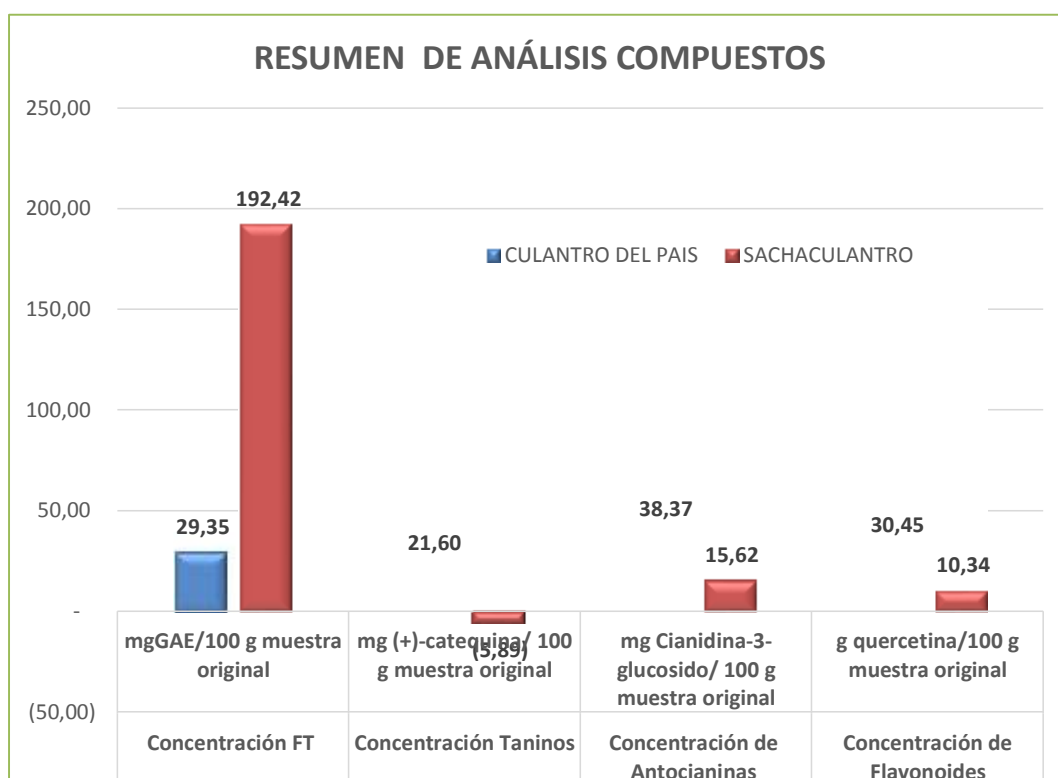
<b>Retinol</b>			
Repeticiones	Control	Muestra	Fórmula
1	0,796	1,019	0,24307
2	0,796	1,019	0,24307
3	0,796	1,019	0,24307
4	0,796	1,019	0,24307
5	0,796	1,019	0,24307
6	0,796	1,019	0,24307
7	0,796	1,019	0,24307
8	0,796	1,019	0,24307
<b>PROMEDIO (mg/100g de muestra)</b>			<b>0,24307</b>

#### 4.2.7. RESUMEN ENTRE LAS HOJAS DE CULANTRO Y SACHACULANTRO

En la Tabla N° 24 y Figura N° 28, se compara la Actividad Antioxidante (AA) y la presencia de compuestos de fenoles totales, taninos, antocianinas y flavonoides de las hojas de *Coriandrum sativum* (culantro del país) y *Eryngium foetidum* (sachaculantro).

**TABLA N° 24: Comparación de la actividad antioxidante y/o compuestos presentes.**

MUESTRA	AA al 25% (mg/ml)	Concentración FT		Concentración Taninos		Concentración de Antocianinas		Concentración de Flavonoides	
		mgGAE/100 g amostra original	±	mg (+)-catequina/ 100 g Amostra original	±	mg Cianidina-3-glucosido/ 100 g amostra original	±	g quercetina/100 g amostra original	±
CULANTRO DEL PAIS	95.10	29.35	0.05	21.60	-	38.37	6.70	30.45	0.05
SACHACULANTRO	80.37	192.42	0.10	-5.89	-	15.62	7.23	10.34	-



**FIGURA N° 28: Cuadro comparativo de compuestos fenólicos presentes en la hojas de *Coriandrum sativum* (culantro del país) y hoja de *Eryngium foetidum* (sachaculantro).**



La presencia de fenoles totales en Sachaculantro es mayor que en Culantro del país, siendo lo contrario en antocianinas donde los niveles en Culantro del país son mayores que en Sachaculantro, y en taninos la concentración es negativa para Sachaculantro; además encontramos que los niveles de concentración en quercetina fueron mayores: 30.45 g para Culantro del país y 10,34 g para Sachaculantro.

De acuerdo a lo mostrado en la Figura N° 28, los posibles responsables de la Actividad Antioxidantes en culantro es la presencia de flavonoides en grandes proporciones y en menor cantidad la presencia de antocianinas, fenoles totales y taninos.

Por otro lado, en el sachaculantro, los posibles responsables serían los flavonoides, fenoles totales y antocianinas, no encontramos la presencia de taninos.

Shahidi *et al.*, (2015), reportan que hay un creciente interés tanto en la industria y en la investigación científica de hierbas y especias aromáticas debido a sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas, fuertes propiedades que superan a antioxidantes naturales y sintéticos utilizados actualmente. Estas propiedades se deben a muchas sustancias, incluyendo algunas vitaminas, flavonoides, terpenoides, carotenoides, fitoestrogenos y minerales, entre otros, que hacen que las especias y algunas hierbas sus componentes antioxidantes como agentes conservantes en los alimentos. Fracciones importantes de las especias son sus aceites volátiles y oleorresinas.

Muchas hierbas y especias por lo general se usan para condimentar platos, son una excelente fuente de compuestos fenólicos que han sido reportados para mostrar una buena actividad antioxidante. La eficacia antioxidante de especias se informo como: clavo de olor, salvia, romero, oregano, tomillo, jengibre. Además, algunas hierbas como el romero y la salvia se utilizan para producir drogas clasificadas como fitofármacos, que representa una parte significativa del mercado farmacéutico mundial.

Un problema que se encuentra frecuentemente cuando se utiliza especias y hierbas es que por lo general tienen un olor característico, sabor y color, un hecho que hace que su uso sea sistemático en los alimentos. Además, las plantas muestran variaciones estacionales y topográficas, dando lugar a

diferencias en su actividad antioxidante, mientras que la seguridad de los extractos es un tema de discusión actual.

#### 4.3. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS DEL *Coriandrum sativum* (CULANTRO DEL PAIS), Y *Eryngium foetidum* (SACHACULANTRO)

##### 4.3.1. MÉTODO DIFUSIÓN EN DISCO DE LAS HOJAS DE *Coriandrum sativum* (CULANTRO DEL PAIS)

En las Tablas 25, 26 se observa los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana, evidenciando que en las pruebas realizadas con el extracto etanólico del *Coriandrum sativum* (culantro del país) no se presenció halo de inhibición, es decir, las cepas bacterianas utilizadas en el estudio son resistentes al extracto etanólico. El control positivo mostró halos de inhibición de 23.3 mm y 20.7 mm frente a *Escherichia coli* y *Salmonella sp*, categorizando las bacterias como sensibles a este antibiótico.

Ratha (2012). Evaluaron la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Coriandrum sativum*, mostrando mayor actividad frente a *Staphylococcus aureus* con un halo de inhibición de 12,17 mm  $\pm$  0,29 y *Klebsiella spp.* con un halo de inhibición de 12,17  $\pm$  0,15, el extracto metanólico de *Coriandrum sativum* mostró actividad frente a *Candida albicans* halo de inhibición de 14,20  $\pm$  0,20 y *Aspergillus niger* con halo de inhibición de 10,1  $\pm$  0,10.

**TABLA N° 25: Media de los halos de inhibición (mm) del extracto de *Coriandrum sativum* (CULANTRO DEL PAIS) diferentes concentraciones frente a *Escherichia coli*.**

<b><i>Coriandrum sativum</i> (CULANTRO DEL PAIS)</b>					
<b><i>Escherichia coli</i></b>	<b>DIFUSION EN DISCO DE AGAR (mm)</b>				
<b>PLACAS PETRI N°</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>X</b>	<b>D.S.</b>
<b>12mg</b>	-	-	-	-	-
<b>6mg</b>	-	-	-	-	-
<b>CONTROL (+)</b>	<b>25</b>	<b>20</b>	<b>25</b>	<b>23.3</b>	<b>2.4</b>
<b>CONTROL (-)</b>	-	-	-	-	-

**TABLA N° 26: Media de los halos de inhibición (mm) del extracto de *Coriandrum sativum* (CULANTRO DEL PAIS) diferentes concentraciones frente a *Salmonella sp.***

<b><i>Coriandrum sativum</i> (CULANTRO DEL PAIS)</b>					
<b><i>Salmonella sp</i></b>	<b>DIFUSION EN DISCO DE AGAR (mm)</b>				
<b>PLACAS PETRI N°</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>X</b>	<b>D.S.</b>
<b>12mg</b>	-	-	-	-	-
<b>6mg</b>	-	-	-	-	-
<b>CONTROL (+)</b>	<b>20</b>	<b>22</b>	<b>20</b>	<b>20.7</b>	<b>0.9</b>
<b>CONTROL (-)</b>	-	-	-	-	-

#### **4.3.2. METODO DE MACRODILUCIÓN DE LAS HOJAS DE *Coriandrum sativum* (CULANTRO DEL PAIS)**

En las Tablas 27, 28, 29 y 30 se observa los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana, evidenciando que en las pruebas realizadas con el extracto etanólico del *Coriandrum sativum* (culantro del país) no se observó inhibición de crecimiento (cambio de turbidez), es decir, las cepas bacterianas utilizadas en el estudio son resistentes al extracto etanólico. Al contrario el control positivo empleado mostro una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 2 µg/MI, categorizando las bacterias como sensibles a este antibiótico (GENTAMICINA).

Xin-Zhi *et al.*, (2012). Evaluaron la actividad antibacteriana del *Coriandrum sativum* indicando que sólo el extracto acuoso presenta actividad y la concentración de inhibición mínima (CMI) fue de 10% (100 mg/mL) de extracto original frente a *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *P. ericillinm*.

Filomena *et al.*, (2011). Evaluaron la actividad antibacteriana del culantro mostrando que tiene una actividad antimicrobiana eficaz contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Mostrando una CMI y un CBM de 0.2 % (v/v) frente a *Escherichia coli* y una CMI y un CBM de 0.4 y 0.8 % (v/v) respectivamente frente a *Salmonella sp.*

**TABLA N° 27: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de las hojas de *Coriandrum sativum* (Culantro el País) frente a *Escherichia coli*.**

<i>Coriandrum sativum</i> (CULANTRO DEL PAIS)									
<i>Escherichia coli</i>	MACRODILUCION								
MICROTUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CONCENTRACION	32 mg/mL	16 mg/mL	8 mg/mL	4 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/MI	0,5 mg/mL	0,25 mg/mL	0 mg/mL
CMI	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CMB	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**TABLA N° 28: Concentración Mínima Inhibitoria del control positivo frente a *Escherichia coli*.**

<i>Coriandrum sativum</i> (CULANTRO DEL PAIS)										
<i>Escherichia coli</i>	MACRODILUCION									
MICROTUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GENTAMICINA	512 µg/mL	256 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	0 µg/mL
CONTROL (+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

**TABLA N° 29: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de las hojas de *Coriandrum sativum* (Culantro del País) frente a *Salmonella sp.***

<i>Coriandrum sativum</i> (CULANTRO DEL PAIS)									
<i>Salmonella sp</i>	MACRODILUCION								
MICROTUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CONCENTRACION	32 mg/mL	16 mg/mL	8 mg/mL	4 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,25 mg/mL	0 mg/mL
CMI	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CMB	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**TABLA N° 30: Concentración Mínima Inhibitoria del control positivo frente a *Salmonella Sp.***

<i>Coriandrum sativum</i> (CULANTRO DEL PAIS)										
<i>Salmonella sp</i>	MACRODILUCION									
MICROTUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GENTAMICINA	512 µg/mL	256 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	0 µg/mL
CONTROL (+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

#### 4.3.3. MÉTODO DIFUSIÓN EN DISCO DE LAS HOJAS DE *Eryngium foetidum* (SACHACULANTRO)

En las Tablas 31, 32 se observa los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana, evidenciando que en las pruebas realizadas con el extracto etanólico del *Eryngium foetidum* (sachaculantro) no se presenciaron halos de inhibición, es decir, las cepas bacterianas utilizadas en el estudio son resistentes al extracto etanólico. El control positivo mostró halos de inhibición de 23.3 mm y 25 mm frente a *Escherichia coli* y *Salmonella sp*, categorizando las bacterias como sensibles a este antibiótico.

Lingaraju *et al.*, (2015). El extracto de acetato de etilo de *E. foetidum* mostró la actividad antimicrobiana más fuerte entre los cinco extractos contra las cuatro cepas bacterianas y *C. albicans*. Esto también se reveló que la inhibición de extracto de acetato de etilo contra *P. aeruginosa* (28 mm) y *C. albicans* (18 mm) fue comparativamente mayor a la del estándar de Gentamicina (18 mm) y nistatina (14 mm), respectivamente.

Rajagopal *et al.*, (2015). Determinaron las propiedades antibacterianas del extracto metanólico de *E. foetidum* frente a ocho agentes patógenos humanos: dos Gram-positivas (*Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*) y seis Gram negativos (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella boydii* y *Vibrio cholerae*) y se encontró que el extracto tiene una acción antibacteriana frente a todos los organismos evaluados con un promedio de halos de inhibición de 18-20 mm.

Homer *et al.*, (2007) determinaron la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *E. foetidum* frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, concluyendo que el extracto no presenta actividad frente a *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*.

**TABLA N° 31: Media de los halos de inhibición (mm) del extracto de *Eryngium foetidum* (SACHACULANTRO) a diferentes concentraciones frente a *Escherichia coli*.**

<b><i>Eryngium foetidum</i> (SACHACULANTRO)</b>					
<b><i>Escherichia coli</i></b>	<b>DIFUSION EN DISCO DE AGAR (mm)</b>				
<b>PLACAS PETRI N°</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>X</b>	<b>D.S.</b>
<b>12mg</b>	-	-	-	-	-
<b>6mg</b>	-	-	-	-	-
<b>CONTROL (+)</b>	<b>25</b>	<b>20</b>	<b>25</b>	<b>23.3</b>	<b>2.4</b>
<b>CONTROL (-)</b>	-	-	-	-	-

**TABLA N° 32: Media de los halos de inhibición (mm) del extracto de *Eryngium foetidum* (SACHACULANTRO) a diferentes concentraciones frente a *Salmonella sp.***

<b><i>Eryngium foetidum</i> (SACHACULANTRO)</b>					
<b><i>Salmonella sp</i></b>	<b>DIFUSION EN DISCO DE AGAR (mm)</b>				
<b>PLACAS PETRI N°</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>X</b>	<b>D.S.</b>
<b>12mg</b>	-	-	-	-	-
<b>6mg</b>	-	-	-	-	-
<b>CONTROL (+)</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>25.0</b>	<b>0.0</b>
<b>CONTROL (-)</b>	-	-	-	-	-

#### **4.3.4. METODO DE MACRODILUCIÓN DE LAS HOJAS DE *Eryngium foetidum* (SACHACULANTRO)**

En las Tablas 33, 34, 35 y 36 se observa los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana, evidenciando que en las pruebas realizadas con el extracto etanólico del *Eryngium foetidum* (Sachaculantro) no se observó inhibición de crecimiento (cambio de turbidez), es decir, las cepas bacterianas utilizadas en el estudio son resistentes al extracto etanólico. Al contrario el control positivo empleado mostro una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 2 µg/MI, categorizando las bacterias como sensibles a este antibiótico (GENTAMICINA).

Mirjana *et al.*, (2014) determinaron la composición química, actividad antimicrobiana y antioxidante de *Eryngium foetidum*; demostraron la presencia de apigenina flavonoides apigenina, ácido clorogénico, ácido gálico, epicatequina, ácido rosmarínico ácido octanoico, tetradecanol y dodecanol; los extractos de metanol y cloroformo de hojas y raíces ejercieron un efecto significativo frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas

(*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*).

Homer *et al.*, (2007) determinaron la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *E. foetidum* frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Salmonella tiphimurium*, concluyendo que el extracto no presenta actividad frente a *Escherichia coli* y *Salmonella tiphimurium*.

**TABLA N° 33: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de *Eryngium foetidum* frente a *Escherichia coli*.**

<i>Eryngium foetidum</i> (SACHACULANTRO)									
<i>Escherichia coli</i>	MACRODILUCION								
MICROTUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CONCENTRACION	32 mg/mL	16 mg/mL	8 mg/mL	4 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,25 mg/mL	0 mg/mL
CMI	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CMB	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**TABLA N° 34: Concentración Mínima Inhibitoria del control positivo frente a *Escherichia coli***

<i>Eryngium foetidum</i> (SACHACULANTRO)										
<i>Escherichia coli</i>	MACRODILUCION									
MICROTUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GENTAMICINA	512 µg/mL	256 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	0 µg/mL
CONTROL (+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

**TABLA N° 35: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de *Eryngium foetidum* frente a *Salmonella sp.***

<i>Eryngium foetidum</i> (SACHACULANTRO)									
<i>Salmonella sp</i>	MACRODILUCION								
MICROTUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CONCENTRACION	32 mg/mL	16 mg/mL	8 mg/mL	4 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,25 mg/mL	0 mg/mL
CMI	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CMB	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**TABLA N° 36: Concentración Mínima Inhibitoria del control positivo frente a *Salmonella sp.***

<i>Eryngium foetidum</i> (SACHACULANTRO)										
<i>Salmonella sp</i>	MACRODILUCION									
MICROTUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GENTAMICINA	512 µg/mL	256 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	0 µg/mL
CONTROL (+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-



## CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. CONCLUSIONES

- ❖ Las hojas de *Coriandrum sativum* (culantro del país) y las hojas de *Eryngium foetidum* (Sachaculantro) presentan Actividad Antioxidante, encontrándose mayor presencia de flavonoides, antocianinas y fenoles totales para *Coriandrum sativum* (culantro del país) y para *Eryngium foetidum* (sachaculantro) flavonoides, fenoles totales y antocianinas, así mismo se determinó la presencia de  $\beta$ -caroteno y retinol.
- ❖ Se determinó la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos obtenidos de las hojas de *Coriandrum sativum* (culantro del país) y *Eryngium foetidum* (sachaculantro), por el método de difusión en disco en agar, evidenciándose ningún halo de inhibición, afirmando de esta manera que las cepas bacterianas *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* utilizadas en el estudio son resistentes al extracto etanólico.
- ❖ Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico obtenido de las hojas de *Coriandrum sativum* (culantro del país) y *Eryngium foetidum* (sachaculantro), por el método de macrodilución frente a *Escherichia coli* y *Salmonella sp.*, no se observó inhibición de crecimiento (presencia de turbidez), es decir, las cepas bacterianas utilizadas en el estudio son resistentes al extracto etanólico. Es decir, Los extractos de las hojas de *Coriandrum sativum* (culantro del país) y de *Eryngium foetidum* (sachaculantro) no presentan Actividad Antibacteriana.

## 5.2. RECOMENDACIONES

- ❖ Realizar investigaciones sobre actividad antioxidante y actividad antimicrobiana en el extracto acuoso y en el aceite esencial de las hojas de culantro del país y sachaculantro. Si existe actividad antibacteriana, es importante realizar estudios complementarios para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), y realizar los fraccionamientos para la búsqueda del metabolito responsable de esta actividad.
  
- ❖ Respecto a la actividad antioxidante, realizar estudios *in vivo* para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (IC50) y realizar estudios de toxicidad para indicar la cantidad apropiada para su consumo directo, tanto del extracto de culantro del país como del sachaculantro.
  
- ❖ Continuar con la investigación en el fraccionamiento de los compuestos fenólicos encontrados en los extractos para determinar el agente activo responsable de la actividad antioxidante de las hojas de culantro del país y sachaculantro.
  
- ❖ Continuar realizando investigaciones sobre nuestra variada biodiversidad de productos amazónicos, ya que existe poca información.

## CAPITULO VI: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS Y BIBLIOGRAFIA

### 6.1. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AL-Jaber N. A., Awaad A. S., Moses J. E., 2011. Review on some antioxidant plants growing in arab world. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15, 293-307.
- Ardila Q. Martha I., Vargas A. Andrés F., Pérez C. Jorge E., Mejía Luis F., 2009. *Biosalud*, volumen 8; Pag. 53.
- Brand-Williams B., Berset W., 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH•free radical method. *LWT - Food Science and Technology*; 30: 609-615.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. and Berset C., 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technology*. 28. 25-30.
- Ceballos Adela M. y Giraldo Gloria I., 2015. El cilantro (*Coriandrum sativum* L.) como fuente potencial de antioxidantes naturales. Colombia.
- Garg D. Muleya, Khare N., Marar T. Comparative analysis of phytochemical profile and antioxidant activity of some indian culinary. *Herbs.Rev. R.J.P.B.C.S.* 2012, 3(3): 845-853. Disponible en: [http://www.rjpbcs.com/pdf/2012\\_3\(3\)/\[88\].pdf](http://www.rjpbcs.com/pdf/2012_3(3)/[88].pdf).
- Gutiérrez Gaitén Y. I., Miranda Martínez M., Varona Torres N., Rodríguez A. P., 2000. Validación de 2 métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en *Psidium guajaba*, L. *Revista Cubana de Farmacia*, v. 34, n. 1, p. 50-55.
- Harsha S., Anilakumar K., Effects of *Coriandrum sativum* extract on exploratory behaviour pattern and locomotor activity in mice: An experimental study. *IJGP*. 2012, 6(2): 157-162. Disponible en: <http://www.geenpharmacy.info/article.asp?issn=09738258;year=2012;volume=6;issue=2;spage=157;epage=162;aulast=Harsha>.
- Homer S., Baccus T., Akingbala J., 2007. Antibacterial efficacy of *Eryngium foetidum* (Culantro) against select food-borne pathogens. No 122908, 2007. West Indies Agricultural Economics Conference, July 2007, Belize City, Belize from Caribbean Agro-Economic Society. Disponible en: <http://purl.umn.edu/122908>.
- Instituto Nacional De Salud (INS). 2002. Ministerio de Salud del Perú. "Manual de Procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión serie de normas técnicas n° 30" pag 1:67. Lima – Perú.
- Jaramillo Beatriz E., Duarte Edisson, Martelo Irina, 2011. Composición química volátil del aceite esencial de *Eryngium foetidum* L. colombiano y determinación de su actividad antioxidante.
- Lin, Yong, Shi, Ranxin, Wang, Xia, Shen, Han-Ming. 2008. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* 8, 634–646.
- Lingaraju D.P., Sudarshana M.S., Mahendra C., Poornachandra Rao K.. 2015. Phytochemical screening and antimicrobial activity of leaf extracts of *Eryngium foetidum*. (APIACEAE). *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*.
- Mercado-Mercado Gilberto, De La Rosa Carrillo Laura, Wall-Medrano Abraham, López Díaz José Alberto y Álvarez-Parrilla Emilio 2013.

Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México.

- Mirjana M., Petrović Silvana, Marjan N. Marina M., 2014. Composition, antimicrobial and antioxidant activity of the extracts of *Eryngium palmatum* Pančić and Vis. (Apiaceae). Open Life Sciences. Volume 9, Issue 2, Pages 149–155, ISSN 2391-5412.
- Molyneux P. 2004. The use of stable free radical diphenylpicrilhidrazil (DPPH) for stimating antioxidant activity. Journal of science and technology; 26: 211-219.
- Montoya Beatriz H., Lemeshko Victor, Lopez Juan B., Pareja Andres, Urrego Rodrigo y Torres Ricardo, 2003. Actividad antioxidante de algunos extractos vegetales.
- Morales-Payán J. P., Brunner B., Flores L. y Martínez S., 2011. Hoja informativa, Proyecto de agricultura orgánica, cilantrillo.
- Pérez S.Frank. 2012. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas frescas de *Eryngium foetidum* L “siuca culantro” Tesis Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima-Perú.
- Rajagopal P.L., Premaletha K., Preetha M.K., Sreejith K.R., Madhusoodanan V.V., Sudhir Nambiar C., 2015. Antioxidant, antibacterial and antiinflammatory potential of *Eryngium foetidum* (L.). International Journal of Multidisciplinary Research and Development 2015; 2(1): 290-293.
- Ratha bai V., and Kanimozhi D., 2012. Evaluation of anti microbial activity of *Coriandrum sativum*. IJSRR 2012, 1(3), 01-10. ISSN: 2279–0543.
- Rodriguez Lichtenheldl Jose E., 2014. Estructura química y actividad antioxidante in vitro del aceite esencial de *Eryngium foetidum* L. “Siuca culantro”.
- Shahidi Fereidoon, Ambigaipalam Priyatharini, 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects – A review.
- Shrawan Singh, Singh D.R., Shajeeda Banu, Salim K.M., 2012. Determination of bioactives and antioxidant activity in *Eryngium foetidum* L., a traditional culinary and medicinal herb.
- Silva Filomena, Ferreira Susana, Queiroz Joao A., Domingues Fernanda C., 2011. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. Journal of Medical Microbiology (2011), 60, 1479–1486.
- Singleton V.L., Rossi J.A., 1965. “Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdc-phosphotungstic acid reagents”. American Journal of Enology and Viticulture 16, 144–158.
- Sotero S.V.E., Garcia de Sotero D.E., 2009. Manual de análisis químico de alimentos, 1° Edición. Edit. Concytec. Iquitos-Perú.
- Swain T., Goldstein J.L., 1964. Methods in polyphenol chemistry. Pergamon press, Oxford, 131-146.
- Taroco R., Seija V., Vignoli R., 2008. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica; pag.669-670.
- Tovar J., 2013. Determinacion de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregion cafetera. Trabajo de Gado. Facultad de Tecnologia - Universidad Tecnologica de Pereira. P 150. Colombia.
- Trevejo C. Elmer, Alva A. Alenguer, Garcia G. Gimaldo, Perestelo R. Fernando, 2001. Extraccion, caracterizacion y posibilidades de industrializacion de aceite esencial a partir de sachá culantro (*Eryngium foetidum* L). Rev. Conocimiento. 7 (1), pag. 69 – 80.

- Valls J., Lampreave M., Nadal M., Arola L., 2000. Importancia de los compuestos fenólicos en la calidad de los vinos tintos de crianza. *Alimentación equipos y tecnología*, v. 19, n. 2, p. 119-124.
- Vela P.R.S., Cuzcano P.J.M., 2015. Evaluación bromatológica y de antioxidantes fenólicos presentes en la pulpa de *Euterpe precatoria* Mart. y *Euterpe oleracea* Mart. (Huasaí). Tesis de graduación sin publicar, Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Pág. 47-48. Iquitos-Perú.
- Xin-Zhi Cao, Jian-Ming You, Shen-Xin Li, You-Liang Zhang. 2012. Antimicrobial activity of the extracts from *Coriandrum sativum*. *International Journal of Food Nutrition and Safety*, 2012, 1(2): 54-59.
- Yanza Armijos Frank R., 2014. Evaluación del contenido de alcaloides, taninos, flavonoides y aceites esenciales de dos variedades de culantro (*Coriandrum sativum* L.) cultivadas en dos tipos de suelos. Ecuador.

## 6.2. BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Aal E.S., y Hucl P., 2003. Composition and stability of anthocyanins in blue-gained wheat. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 51:2174-2180.
- Abdel-Aal E.S., Young C., y Rabalski I., 2006. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple and red cereal gains. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 54:4696- 4704.
- Aherne S.A., y O'Brien N.M., 2002. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18:75-81.
- Algorta G., Gazzo N., Bello de Moreira N., Montano A., 1996. Origen y distribución de serotipos de Salmonella. 1989 – 1995. 3er. Encuentro Nacional de Microbiólogos. Montevideo.
- Allende Martínez Luis Miguel. 1997. Efectos del retinol (vitamina A) en la activación de linfocitos T humanos y sus Implicaciones Terapéuticas. Madrid.
- Anónimo. 1999. La costa del Golfo, umbral de la historia mexicana (II). En el Mundo Huasteco y Totonaco. <http://mexicodesconocido.com/mx/indigena/huas11.htm>.
- Arai S., 2000. Functional food science in Japan. *Biofactors*; 12: 13-6.
- Aruoma O.I., Halliwell B., Williamson G., 1997. In vitro methods for characterizing potential prooxidant and antioxidant actions of nonnutritive substances in plant foods. In *Antioxidant Methodology*; Aruoma O.I., Cuppett, S.I., Eds.
- Badui D.S., 2006. Química de los alimentos. Editorial Pearson Educación, México.
- Benzie iris and Szeto Y.T., 1999. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing antioxidant power assay. *J. Agic. Food Chem.* Vol. 47, 633-636.
- Berdonces J., Preciado I., Ródenas P., Sanés A., Uriarte X., 1995. Las plantas medicinales hoy día. *Natura medicatrix* 34:37-38.
- Bernal Jose, Cruz Xenia y Saenz Moises. 2002. Determinación de la bioactividad de extractos de 25 especies vegetales mediante interaccion con and por cromatografía líquida de alta resolución. Tesis Químico Farmaceutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica. US.

- Biesalski H., Aggett P., Anton R., 2010. Scientific substantiation of health claims: Evidence-based nutrition. 26th Honhenhein Consensus Conference.
- Blois M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical nature, v. 181. P 1199- 1200.
- Bocco A., Cuvelier E., Richard H. y Berset C.,1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. J. Agric. Food Chem. Vol. 46, 2123-2129.
- Borowska E. J. y Mazur B., 2008. Changes in selected componentes and antioxidant propieties of cowberry during processing to puree. Bromatologia i chemia toksykologiczna. Poznan, v. 41, p. 303-307.
- Bors W., Heller W., Christa M. y cols. 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radicals cavenging efficiencies. Methods Enzymol, 186:343-355.
- Brack E., 1995. El Oro Verde del Perú – Plantas Naturales. 3(14): p.246 – 248.
- Brat P., 2006. Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. En: The Journal of nutrition. September. Vol. 136. p. 2368-2373.
- Brouillard R., 1982. Chemical structure of anthocyanins. En anthocyanins as food colors. P. Markakis (ed.), p 1-38. Academic Press.
- Castaneda O.A., Pacheco H.L., Paez H.E., Rodríguez J. A. y Galán V.C.A. 2009. Chemical studies of anthocyanins: a review. Food Chemistry, 113:859-871.
- Cevallos Casals B.A., Cisneros Zeballos L., 2004. Stability of anthocyanin based aqueous extract of Andean purple corn and red fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. Food Chem. 86:69-77.
- Cheesman K.H., Slater T.F., 1998. Free radicals in medicine. Br Med Bull; 49:118-21.
- Chithra V. y Leelamma S., 2004. Hypolipidemic effect of coriander seeds (*Coriandrum sativum*): Mechanism of action. Plant foods for human nutrition 51:167-172.
- Cicco N., Lanorte M.T., Paraggio M., Viggiano M., Lattanzio V. 2009. A reproducible, rapid and inexpensive Folin Ciocalteu micromethod in determining phenolics of plant methanol extracts. Microchemical Journal; 91: 107– 110.
- Collazos C., 1993. Composición química de alimentos de mayor consumo en el Perú. 6ª edición. Lima: MINSA; p. 34.
- Collazos C., White R.L., White H.S., 2013. La composición de los alimentos peruanos. Instituto de Nutrición. Ministerio de Salud. Lima-Perú.
- Costa C.T., Horton D. y Margolis S.A., 2000. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatogafy, Liquid chromatogafy mass spectrometry and capillary electrophoresis. Journal chromatogafy, 881:403-410.
- Criado Dabrowska C., Moya Mir M.S., 2009. Vitaminas y antioxidantes. Actualizaciones del Médico, Grupo Saned.
- Corburn B, Grassl S, Finlay B. 2007. Salmonella the host and disease: A brief review. *Cell Biol.*; 85: 112-118.
- De Pascual Teresa S. y Sánchez Ballesta M.T., 2008. Anthocyanins: from plant to health. Phytochemical Review, 7:281-299.
- Delgado Vargas F., Paredes López O., 2003. Colorantes naturales para la alimentación y usos nutracéuticos. u.s.a.
- Deng J., Cheng W., Yang G., 2011. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. Food Chemistry; 125: 1430–1435.

- Durán R., Valenzuela A., 2010. La experiencia japonesa con los alimentos FOSHU ¿Los verdaderos alimentos funcionales? *Rev Chil Nutr.*; 37: 224-33.
- Echeita M., Herrera S., Simón C., 2011. Gastroenteritis invasivas, ¿algo nuevo?. Editorial Elsevier, Vol. 29, Supl. 3, p. 55-60. Disponible en: <<https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/ccs-2009-bacteriologia4.pdf>>.
- Escarpa A., Gonzalez M.C., 2001. An overview of analytical chemistry of.
- Escribano Bailon M.T., Beulga Santos C. y Rivas Gonzalo J.C., 2004. Anthocyanins in Cereals. *Journal Chromatography*, 1054:129-141.
- Evans W., 1984, *Farmacognosia*. 13ª Impresión. Editorial Continental, S.A. de C.V. México D.F. págs. 410-412.
- Ewing W.H., 1985. Identification of Enterobacteriaceae. 4th. Edition, Elsevier.
- Filgueira F.A.R., 2000. Novo Manual de Olericultura: Agotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa, Brasil. P 402.
- Folin O., Ciocalteu V., 1927. On tyrosine and tryptophan determinations in proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 73, 627–650.
- Friedli G., 2003. Friedli Enterprises. Disponible en <<http://www.friedli.com/herbs/phytochem/flavonoids.html>>.
- Gamazo Lopez Goñi y Diaz R., 2005. Manual práctico de Microbiología. Barcelona: Editorial Masson S.A.
- García R., Chávez J., Mejía A., Durán C., 2002. Microbiological determinations of some vegetables from the Xochimilco zone in Mexico City. Mexico. *Rev Latinoam Microbiol*; 44(1): 24-30.
- Garzón G.A, Wrolstad R.E., 2001. The stability of pelargonidin based anthocyanins at varying water activity. *Food Chem.* 75:185-96.
- Garzón G.A, Wrolstad R.E., 2002. Comparison of the stability of pelargonidin based anthocyanins in strawberry juice and concentrate. *J Food Sci.* 67(4):1288-1299.
- Geleijnse J.M., Launer L.J., Van der Kuip D.A., Hofman A. y Witteman J.C., 2002. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam study. *Am J Clin Nutr*, 75:880-886.
- Gow-Chin Yen And Hui-Yin Chen. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 43, 27-32.
- Guerra Recinos L., 1999. Manejo poscosecha de culantro coyote (*Eryngium foetidum* L.). Tesis de Lic. Ing. Agric. Escuela de Agricultura de la Región Tropical Húmeda (EARTH), Guácimo, Limón, Costa Rica.
- Gutiérrez Salinas J., Morales González J.A., 2004. Producción de radicales libres derivados del oxígeno y el daño al hepatocito. *Rev. Medicina Interna de México*, Volumen 20, Núm. 4, julio-agosto.
- Gutteridge J.M., Halliwell B., 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899: p. 136-147.
- Hagerman A., Riedl K., Alexander Jones G., Sovik K., Ritchard N., Hartzfeld P. and Riechel T., 1998. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 46, 1887-1892.
- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., 1999. Free radicals in biology and medicine. Tercera edición. Oxford University Press. Nueva York. págs. 617-783.
- Hernández Ángel M., Prieto González E. A., 1999. Plantas que contienen polifenoles, antioxidantes dentro del estilo de vida. *Rev Cubana Invest Biomed.*

- Hertog M.G.L., Hollman P.C.H. y Putte van de B., 1996. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea, infusions, wines, and fruit juices. *J Agric Food Chem*, 41:1242-1246.
- Hertog M.G.L., Holloman P.C.H., Katan M.B., 1997. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v. 40, p. 2379-2383.
- Horbowicz M., Kosson R., Gziesiuk A. y Debski H., 2008. Anthocyanins of fruits and vegetables their occurrence, analysis and role in human nutrition. *Vegetables Crops Research Bulletin*, 68:5-22.
- Hoshino T., Matsumoto U., Goto T., Harada N., 1982. Evidence for the self association of anthocyanins in neutral aqueous solution. *Tetrahedron Lett.* 23:433.
- Humphrey T. 2004. *Salmonella*, stress responses and food safety. *Nature Reviews.*; 2: 504-509.
- Hutchings J.H., 1999. Food color and appearance. 2nd ed. Gaithersburg Md.: Aspen Publishers, Inc.
- Jang M., Cai L., Udeani G.O. y cols. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol a natural product derived from grapes. *Science*, 275:218-221.
- Jovanovic S.V., Steenken S., Simic M.G. y Hara Y., 1998. Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals.
- Jurd L., 1972. Some advances in the chemistry of anthocyanin type pigments. In: Chichester C.O., Editor. *The Chemistry of Plant Pigments*. New York: Academic Press, p. 123-142.
- Kähkönen Marja, Copia Anu I. and Heinonen Marina. 2001. Berry fenolics and their Antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 49, 4076 – 4082.
- Kang H.J., Chawla S.P., Kwon J.O.C., Byun J.H., 2006. Studies on the development of functional powder from citrus peel, *Bioresource Technology* 97: 614-620.
- Konczack I. y Zhang W., 2004. Anthocyanins more than Nature's Colours. *Journal Biomedical and Biotechnology*, 5:239-240.
- Kühnau J., 1976. The Flavonoids: a class of semi essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet*, 24:117-190.
- Kuskoski E.A., Asuero A. G., Morales M.T., Fett R., 2006. Frutos tropicais silvestres e polpa de frutas congeladas: activedade, polifenóis e antocianinas. *Ciencia Rural*, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1285-1286.
- Letan A., 1966. The relation of structure to antioxidant activity of quercitin and some of its derivates. *J Food Sci*, 31:518- 523.
- Lini Huo, Rumei Lu, Peiyuan Li, Yanfang Liao, Rui Chen, Chaocheng Deng, Chengsheng Lu, Xiangyong Weia and Yaohua Lia. 2011. Antioxidant activity, total phenolic, and total flavonoid of extracts from the stems of *jasminum nervosum* lour. *Grasas y aceites*, 62 (2). p 149-154.
- Lock O., 1994. Investigación fotoquímica métodos en el estudio de productos naturales. 2a Ed. Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima- Perú.
- López G. y Díaz R., 2005. Manual practico de Microbiologia. Barcelona: Editorial MASSON S.A.
- Macheix J., Fleuriet A. and Billiot J.1990. Fruit phenolics.CRC press, Inc. Boca Raton, Fl. EUA.
- Madigan M., Martinko, J., y Parker, J., (1999) *Block biología de los Microorganismos* Madrid: Prentice Hall Iberia.
- Magalhães L.M., Santos F., Segundo M.A., Reis S., Lima J., 2010. Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin Ciocalteu reducing capacity. *Talanta*; 83: 441–447.



- Manfred H., Herbert M., Bernd Z., 1999. Métodos espectroscópicos en química orgánica. 2ª Ed. Madrid-España. Editorial Síntesis S.A. p 369.
- Martínez Martínez Alejandro 2003. Carotenoides. Universidad de Antioquia, Medellín.
- Martínez-Valverde I., Periago M.J., ROS G., 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Arch. Latinoamer. Nutr. 50, 5-18.
- Marwah R.G., Fatope M.O., Mahrooqi R.A., Varma G.B., Abadi H.A., Khamis S., Burtamani-Al. 2007. Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. Food chemistry; 101:465-470.
- Melo E.A., Maciel M.I.S., Lima V.L.A.G., Nascimento R.J., 2008. Capacidade antioxidante de frutas. Revista Brasileira de ciências Farmacêuticas, Sao Paulo, v 44, n 2, p. 193-201.
- Messina M., 2003. A healthy look at sweet cherries, Nutrition Matters, Inc. Disponible en < <http://www.nwcherries.com/metaV.html> >.
- Miller D., 2003. Química de los alimentos: Manual de Laboratorio. 1a Ed. Editorial Limusa Wiley, S.A. pp. 157-158. México
- Mohammad Abu Zaid, Farrukh Afaq, Deeba N. Syed, Mark Dreher and Hasan Mukhtar. 2007. Inhibition of UVB mediated oxidative stress and markers of photoaging in immortalized HaCaT keratinocytes by pomegranate polyphenol extract POMx. Photochemistry and Photobiology, 83, 882–888.
- Morales J.P., 1995. FDA, Fundación de Desarrollo Agropecuario, Inc. Cultivo de cilantro, cilantro ancho y perejil. Boletín técnico N° 25. República Dominicana. Consultado 15 de diciembre 2009.
- Neidhardt F.C., 1999. Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular Biology. 2nd edition. ASM Press, Washington.
- Nieto G., Huvaere K., Skibsted L.H., 2011. Antioxidant activity of rosemary and thyme by products and synergism with added antioxidant in a liposome system. Eur. Food. Res. Technol. 233: 11-18.
- Ojha H., Mishra K., Chaudhury N.K., 2012. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. Food Chemistry; 130: 1036–1043.
- Olaya C.M., Castaño M.P., Garzón G.A., 2008. Effect of temperature and water activity on the stability of microencapsulated anthocyanins extracted from Andes Berry (*Rubus glaucus*) and Tamarillo (*Solanum betaceum*). Observations not published.
- Parra Patricia A., y Justo Alicia M., 2003. Balance entre ingesta recomendada y consumo estimado de hortalizas. P 2.
- Paul J.H.A., Seaforth C.E. y Tikasingh T. 2011. *Eryngium foetidum*, a review. Fitoterapia 82:302-308.
- Pecket R.C. y Small C.J., 1980. Occurrence, Location and Development of Anthocyanoplasts. Phytochemistry, 19:2571- 2576.
- Pellegini N., Serafin M., Salvatore S., Del Rio D., Bianchi M., Brighenti F., 2007. Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, must, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different in vitro assay. Molecular Nutrition and Food Research, Weinheim, v. 50, n. 11, p. 1030- 1038.
- Peres W., 1994. Radicais Livres em níveis biológicos. Ed. Universidade Católica de Pelotas, Brasil, 49-81.
- Peterson J. y Dwyer J., 2000. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. Tektran, United States Department of Agriculture. Disponible en <<http://www.nal.usda.gov/ttic/tektran/data/000011/50/0000115068.html>>.
- Phenolic compounds in food. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 31, 57–139.

- Poei-langston M.S. y Wrolstad R.E., 1981. Color Degadation in an ascorbic acid anthocyanin flavanol model system. *J. Food Sci.* 46(4):1218-1222, 1236.
- Prior R.L., Wu X., Schaich K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.*; 53(10):4290-302.
- Proestos C., Chorianopoulos N., Nychas G.J.E. and Komaitis M., 2005. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. investigation of their antioxi- dant capacity and antimicrobial activity. *J. agric. food chem.* vol. 53,1190-1195.
- Ramirez L.S. y Diaz H.E., 2007. Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). "Revista Scientia et Technica". Universidad Tecnológica de Pereira. 33: p. 397-400.
- Raymond D., 1982. Cultivo práctico de hortalizas. Editorial CECSA. México, p 144.
- Reed D., 1993. General horticulture laboratory manual. Ed. Alpha Editions. Department of Horticultural Sciences, Texas A & M University. College Station, Texas.
- Ricchelle M., Isabelle Tavazzi and Elizabeth Offord. 2001. Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (Coffee, Cocoa and Tea) prepared per cup serving. *J agric. food chem.* Vol. 49, 3438 – 3442.
- Rice-evans C.A., Miller N.J., Papaganda G., 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.*, 20, 933-956.
- Robbins R., 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 51, 2866-2887.
- Robertfroid M., 2002. Global view on functional foods: European perspectives. *Br J Nutr.* 88: S133-8.
- Rodale J.L., 1991. How to growth vegetables and fruits by the organic method. p 876-877.
- Rodríguez J.L., Valdés O., y Alemán A., 2006, Evaluación de la actividad antioxidante de cinco hierbas aromáticas, Instituto de investigaciones para la industria alimenticia. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, vol. 16, no. 1.
- Roedig-Penman A. and Gordon M.H., 1997. Antioxidant properties of catequins and green tea extracts in model food emulsions. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 45, 4267-4270.
- Romero Alvira D., Bueno Gómez J., 1998. Radicales libres del oxígeno y antioxidantes en medicina (Editorial). *Rev Clin Española*; 184 (7):345-6.
- Saenz-Lopez R., Fernandez Zurbano P. y Tena M.T., 2003. Develop mentand validation of acapillary zone electrophoresis method for the quantitative determination of anthocyanin in wine. *Journal of Chromatography*, 990:247-258.
- Saito M., 2007. Role of FOSHU (Food for Specified Health Uses) for healthier life. *Yakugaku Zasshi.* 127: 407-416.
- Sardi B., 2004. High dose vitamin C and iron overload. *Ann Intern Med.*;140:846-7.
- Satué Garcia M.T., Heinomen M., Frankel E.N., 1997. Anthocyanin as antioxidants on human low density lipoprotein and lecithin liposome systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Easton, v. 45, n. 9, p. 3362-3367.
- Schieber A., Stintzing F.C., CARLE R., 2001. By products of plant food processing as a source of functional compounds recent developments. *Tends in Food Science & Technology.* p. 401-413.

- Schwarz K., Bertelsen G., Nissen L.R., Gardner P.T., Heinonem M.I., Hopia A., Huynhba Y., Lambelet P., Macphail D., Skibsted L.H., Tijburg L., 2001. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. *European Food Research and Technology*. Berlin, v. 212, n. 3, p. 319-328.
- Sellappan S., Akoh C.C., Krewer G., 2002. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia Gown blueberries and blackberries. *J. Agric. Food Chem.*, 50.
- Shahidi F., Naczk M., 1995. Food phenolics: Sources, chemistry, effects and Applications. Technomic publishing. Inc p. 247-260. <sup>B</sup>
- Shahidi F., Naczk M., 1995. Phenolic compounds in fruits and vegetables. In: *Food Phenolics, Sources, Chemistry*. Technomic Publishing Co. Inc.: Lancaster, PA. p. 75-107. <sup>A</sup>
- Singleton V.L., 1981. Flavonoids. En: Childester CO, Mrak EM, Stewart Gf (eds.): *Advances in Food Research*. New York: Academic Press, 149-242.
- Singleton V.L., Orthofer R.O., Lamuela Raventos R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*; 299: p 152-178.
- Sloan E., 1996. The top 10 trends to watch and work on. *Food Technol.* 50(7): p. 55-71.
- Stahl W., Ale Agha N. y Polidori M.C., 2002. Non antioxidant properties of carotenoids. *Biol Chem*, 383:553-558.
- Stintzing F.C., Stintzing A.S., Carle R., Frei B., Wrolstad R.E., 2002. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *J Agric Food Chem.* 50:6172-81.
- Stoclet J.C., Chataigneau T., Ndiaye M., Oak M.H., El Bedoui J., Chataigneau M., Shini-Kerth V.B., 2004. Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology*, Amsterdam, v. 500, p. 299-313.
- Suja K.P., Jayalekshmy A., Arumughan C., 2004. Free radical Scavenging behavior of Antioxidant Compounds of Sesame (*Sesamum indicum* L.) in DPPH• System. *Journal of agricultural and food chemistry*; 52: 912-915.
- Tomasik P.J., 2003. Probiotics and prebiotics. *Cereal Chem.* 80(2), p. 113-117.
- Velioglu Y.S., Mazza G., Gao L. and Oomah B.D., 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 46, 4113-4117.
- Villano D., Fernández Pachón M.S., Moyá M.L., Troncoso A.M., Garcia Padilla M.C., 2007. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, New York, v. 71, n. 1, p. 230-235.
- Vinson J.A., Yousef A. Dabbag, Mamdouh M. Sherry and Jinhee Jang. 1995. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 43, No11, 2800-2802.
- Wagner G.J., 1982. Cellular and Subcellular Location in Plant Metabolism. In: CREASY L, HRAZDINA G. editors. *Recent advances in Phytochemistry*. New York: Plenum Press; p. 1-45.
- Wang H., Cao G., Prior R.L., 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Easton, v. 44, n. 3, p. 701-705.
- When food meets medicine. 1991. *Food Manuf.* 66, p. 26.
- Wong D., 1995. *Química de los Alimentos: mecanismos y teoría*. Editorial Acirbia, S. A. España.

- Molyneux P. 2004. The use of stable free radical diphenylpicrilhidrazil (DPPH) for stimating antioxidant activity. *Journal of science and technology*; 26: 211-219.
- Yagüe Gil A., 1969. *Los Taninos Vegetales*, Instituto Forestal de Investigación y Experiencias, Madrid, p.48.
- Yamada K., Sato-Mito N., Nagata J., 2008. Health claim evidence requirements in Japan. *J Nutr.*; 138:1192S-8S.
- Yang K., Lamprecht S.A., Liu Y. y cols. 2000. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxy methan etreated mouse colon. *Carcinogenesis*, 21:1655-1660.
- Zambrano L., Rojas N. y Ramírez B., 2003. Ecological significance of pigment variations in mistletoes. Departamento de Biología, Universidad del Cauca, Colombia. Disponible en <http://www.science.siu.edu/parasiticplants/Meetings/ParPapers.other.html>.

# **ANEXO**

**ANEXO N° 1: Absorbancias del extracto de las hojas de *Coriandrum sativum* L. (Culantro del país) con el método DPPH, primera lectura**

Número de lecturas	Solución DPPH (1 mM)	Extracto etanolico CULANTRO DEL PAIS (muestra-seca) primera lectura				
		Concentraciones				
		5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.05 mg/ml	0.01 mg/ml
<b>1</b>	0,505	0,033	0,137	0,155	0,245	0,334
<b>2</b>	0,504	0,025	0,102	0,124	0,234	0,334
<b>3</b>	0,505	0,026	0,099	0,119	0,221	0,336
<b>4</b>	0,505	0,026	0,096	0,111	0,224	0,335
<b>5</b>	0,505	0,023	0,093	0,106	0,216	0,336
<b>6</b>	0,505	0,024	0,090	0,102	0,189	0,336
<b>7</b>	0,505	0,025	0,075	0,101	0,186	0,336
<b>8</b>	0,505	0,023	0,067	0,086	0,180	0,336
<b>9</b>	0,505	0,024	0,006	0,069	0,182	0,336
<b>10</b>	0,505	0,024	0,059	0,053	0,183	0,336
Promedio	0,505	0,025	0,082	0,103	0,206	0,336
Porcentaje de Inhibición, %		<b>94,99</b>	<b>83,68</b>	<b>79,68</b>	<b>59,20</b>	<b>33,55</b>

**ANEXO N° 2: Absorbancias del extracto de las hojas de *Coriandrum sativum* L. (Culantro del país) con el método DPPH, segunda lectura.**

Número de lecturas	Solución DPPH (100uM)	Extracto etanolico CULANTRO DEL PAIS (muestra-seca) segunda lectura				
		Concentraciones				
		5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.05 mg/ml	0.01 mg/ml
<b>1</b>	0,504	0,028	0,135	0,153	0,245	0,334
<b>2</b>	0,505	0,025	0,102	0,122	0,234	0,334
<b>3</b>	0,505	0,027	0,099	0,115	0,223	0,336
<b>4</b>	0,505	0,024	0,095	0,107	0,218	0,335
<b>5</b>	0,505	0,023	0,092	0,107	0,189	0,336
<b>6</b>	0,505	0,024	0,077	0,101	0,189	0,336
<b>7</b>	0,505	0,025	0,070	0,099	0,187	0,336
<b>8</b>	0,505	0,023	0,066	0,082	0,180	0,336
<b>9</b>	0,505	0,022	0,060	0,069	0,182	0,336
<b>10</b>	0,506	0,024	0,058	0,053	0,183	0,336
Promedio	0,505	0,025	0,085	0,101	0,203	0,336
Porcentaje de Inhibición, %		<b>95,15</b>	<b>83,09</b>	<b>80,04</b>	<b>59,80</b>	<b>33,56</b>

**ANEXO N° 3: Absorbancias del extracto de las hojas de *Coriandrum sativum* L. (Culantro del país) con el método DPPH, tercera lectura**

Número de lecturas	Solución DPPH (100 uM)	Extracto etanolico CULANTRO DEL PAIS (muestra-seca) tercera lectura				
		Concentraciones				
		5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.05 mg/ml	0.01 mg/ml
1	0,504	0,029	0,134	0,152	0,244	0,334
2	0,505	0,025	0,101	0,123	0,234	0,334
3	0,505	0,026	0,098	0,114	0,221	0,336
4	0,505	0,024	0,094	0,107	0,217	0,335
5	0,505	0,023	0,091	0,104	0,190	0,335
6	0,505	0,025	0,076	0,101	0,190	0,336
7	0,505	0,024	0,067	0,085	0,181	0,336
8	0,505	0,025	0,061	0,070	0,182	0,335
9	0,505	0,022	0,060	0,052	0,183	0,336
10	0,505	0,022	0,057	0,053	0,183	0,336
Promedio	0,505	0,025	0,084	0,096	0,203	0,335
Porcentaje de Inhibición, %		<b>95,15</b>	<b>83,38</b>	<b>80,97</b>	<b>59,89</b>	<b>33,59</b>

**ANEXO N° 4: Absorbancias del extracto de las hojas de *Eryngium foetidum* (Sachaculantro) con el método DPPH, primera lectura.**

Número de lecturas	Solución DPPH (1 mM)	Extracto etanolico SACHACULANTRO (muestra-seca) primera lectura				
		Concentraciones				
		5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.05 mg/ml	0.01 mg/ml
1	0,881	0,432	0,299	0,790	0,871	0,881
2	0,881	0,423	0,238	0,787	0,871	0,880
3	0,881	0,394	0,198	0,772	0,870	0,880
4	0,881	0,377	0,193	0,771	0,869	0,879
5	0,881	0,321	0,159	0,761	0,869	0,879
6	0,881	0,290	0,136	0,760	0,868	0,879
7	0,881	0,278	0,137	0,756	0,868	0,879
8	0,881	0,272	0,142	0,753	0,867	0,877
9	0,881	0,277	0,137	0,749	0,867	0,876
10	0,881	0,264	0,130	0,745	0,866	0,876
Promedio	0,881	0,333	0,177	0,764	0,869	0,879
Porcentaje de Inhibición %		<b>62,22</b>	<b>79,92</b>	<b>13,23</b>	<b>1,41</b>	<b>0,27</b>

**ANEXO N° 6: Absorbancias del extracto de las hojas de *Eryngium foetidum* (Sachaculantro) con el método DPPH, segunda lectura.**

Número de lecturas	Solución DPPH (100uM)	Extracto etanolico SACHACULANTRO (muestra-seca) segunda lectura				
		Concentraciones				
		5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.05 mg/ml	0.01 mg/ml
<b>1</b>	0,881	0,431	0,296	0,789	0,870	0,881
<b>2</b>	0,881	0,423	0,236	0,785	0,870	0,880
<b>3</b>	0,881	0,395	0,196	0,783	0,870	0,880
<b>4</b>	0,881	0,352	0,161	0,762	0,869	0,879
<b>5</b>	0,881	0,289	0,152	0,760	0,868	0,879
<b>6</b>	0,881	0,288	0,135	0,757	0,868	0,879
<b>7</b>	0,881	0,273	0,135	0,755	0,868	0,878
<b>8</b>	0,881	0,274	0,139	0,753	0,867	0,876
<b>9</b>	0,881	0,276	0,135	0,749	0,867	0,876
<b>10</b>	0,881	0,263	0,130	0,744	0,866	0,876
Promedio	0,881	0,326	0,172	0,764	0,868	0,878
<b>Porcentaje de Inhibición %</b>		<b>62,95</b>	<b>80,53</b>	<b>13,31</b>	<b>1,44</b>	<b>0,30</b>

**ANEXO N° 5: Absorbancias del extracto de las hojas de *Eryngium foetidum* (Sachaculantro) con el método DPPH, tercera lectura.**

Número de lecturas	Solución DPPH (100 uM)	Extracto etanolico SACHACULANTRO (muestra-seca) tercera lectura				
		Concentraciones				
		5 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.05 mg/ml	0.01 mg/ml
<b>1</b>	0,881	0,430	0,293	0,788	0,871	0,881
<b>2</b>	0,881	0,422	0,234	0,785	0,870	0,880
<b>3</b>	0,881	0,393	0,195	0,771	0,870	0,880
<b>4</b>	0,881	0,333	0,161	0,761	0,869	0,879
<b>5</b>	0,881	0,291	0,142	0,760	0,868	0,879
<b>6</b>	0,881	0,284	0,138	0,756	0,868	0,879
<b>7</b>	0,881	0,269	0,140	0,753	0,867	0,877
<b>8</b>	0,881	0,279	0,138	0,748	0,867	0,877
<b>9</b>	0,881	0,265	0,132	0,746	0,866	0,876
<b>10</b>	0,881	0,265	0,131	0,744	0,866	0,876
Promedio	0,881	0,323	0,170	0,761	0,868	0,878
<b>Porcentaje de Inhibición %</b>		<b>63,33</b>	<b>80,66</b>	<b>13,60</b>	<b>1,45</b>	<b>0,30</b>



**ANEXO N° 7: Determinación de fenoles totales de las hojas de *Coriandrum sativum L.* (Culantro del país).**

Tipo de muestra	Código repetición	Alicota de extracto seco	Alicota de extracto seco	Volumen Acertado 1	Volumen Acertado 2		Alicota en el tubo	lectura en el espectrofotometro	concentración FT	concentración FT	concentración FT	concentración FT	MEDIA FT	DS	
		(g)	(mg)	(ml)	Alicota (ml)	(ml)	factor de dilución	(ml)	Abs.765 nm	mgGAE/mL	mgGAE	mgGAE/mg Alicuota extrato seco	mgGAE/100 g muestra original		mgGAE/100 g muestra original
		a	b=a*1000	c	d	e	f=e/d	g	h	i=@	j=i*f*c	k=j/a	l=j/h/a		
CULANTRO DEL PAIS 1	R1	0,1000	100,00	20,00	1,000	1,000	1,000	0,200	0,381	0,035	0,696	6,959	29,268	29,295	0,047
	R2	0,1000	100,00	20,00	1,000	1,000	1,000	0,200	0,381	0,035	0,696	6,959	29,268		
	R3	0,1000	100,00	20,00	1,000	1,000	1,000	0,200	0,382	0,035	0,698	6,978	29,349		
CULANTRO DEL PAIS 2	R1	0,1000	100,00	20,00	1,000	1,000	1,000	0,200	0,382	0,035	0,698	6,978	29,349	29,377	0,047
	R2	0,1000	100,00	20,00	1,000	1,000	1,000	0,200	0,382	0,035	0,698	6,978	29,349		
	R3	0,1000	100,00	20,00	1,000	1,000	1,000	0,200	0,383	0,035	0,700	6,998	29,431		
CULANTRO DEL PAIS 3	R1	0,1000	100,00	20,00	1,000	1,000	1,000	0,200	0,382	0,035	0,698	6,978	29,349	29,377	0,047
	R2	0,1000	100,00	20,00	1,000	1,000	1,000	0,200	0,382	0,035	0,698	6,978	29,349		
	R3	0,1000	100,00	20,00	1,000	1,000	1,000	0,200	0,383	0,035	0,700	6,998	29,431		
Promedio Total													29,349	0,047	

**ANEXO N° 8: Determinación de Catequinas y Proantocianidoles (Taninos) de las hojas de *Coriandrum sativum L.* (Culantro del país).**

Tipo de muestra	Código repetición	Alicota del extracto seco	Alicota del extracto seco	Volumen Acertado 1	Alicota en el tubo	lectura en el Equipo	concentración taninos	concentración taninos	concentración taninos	concentración taninos	concentración taninos	MEDIA concentración taninos	DS
		(g)	(mg)	(ml)	(ml)	Abs.500 nm	µg(+)-Catequina/mL	mg(+)-Catequina/mL	mg(+)-Catequina	mg (+)-catequina/g alicuota extrato seco	mg (+)-catequina/ 100 g muestra original	mg (+)-catequina/ 100 g muestra original	
		a	b=a*1000	c	e	f	g=@	g=@	h=g*c	i=h/b	j=h/a		
CULANTRO DEL PAIS	R1	0,1000	100,00	20,00	0,200	0,283	25,719	0,026	0,514	5,144	21,634	21,634	-
	R2	0,1000	100,00	20,00	0,200	0,283	25,719	0,026	0,514	5,144	21,634		
	R3	0,1000	100,00	20,00	0,200	0,283	25,719	0,026	0,514	5,144	21,634		
CULANTRO DEL PAIS	R1	0,1000	100,00	20,00	0,200	0,283	25,719	0,026	0,514	5,144	21,634	21,581	0,046
	R2	0,1000	100,00	20,00	0,200	0,282	25,625	0,026	0,512	5,125	21,555		
	R3	0,1000	100,00	20,00	0,200	0,282	25,625	0,026	0,512	5,125	21,555		
CULANTRO DEL PAIS	R1	0,1000	100,00	20,00	0,200	0,283	25,719	0,026	0,514	5,144	21,634	21,581	0,046
	R2	0,1000	100,00	20,00	0,200	0,282	25,625	0,026	0,512	5,125	21,555		
	R3	0,1000	100,00	20,00	0,200	0,282	25,625	0,026	0,512	5,125	21,555		
Promedio Total												21,599	0,030

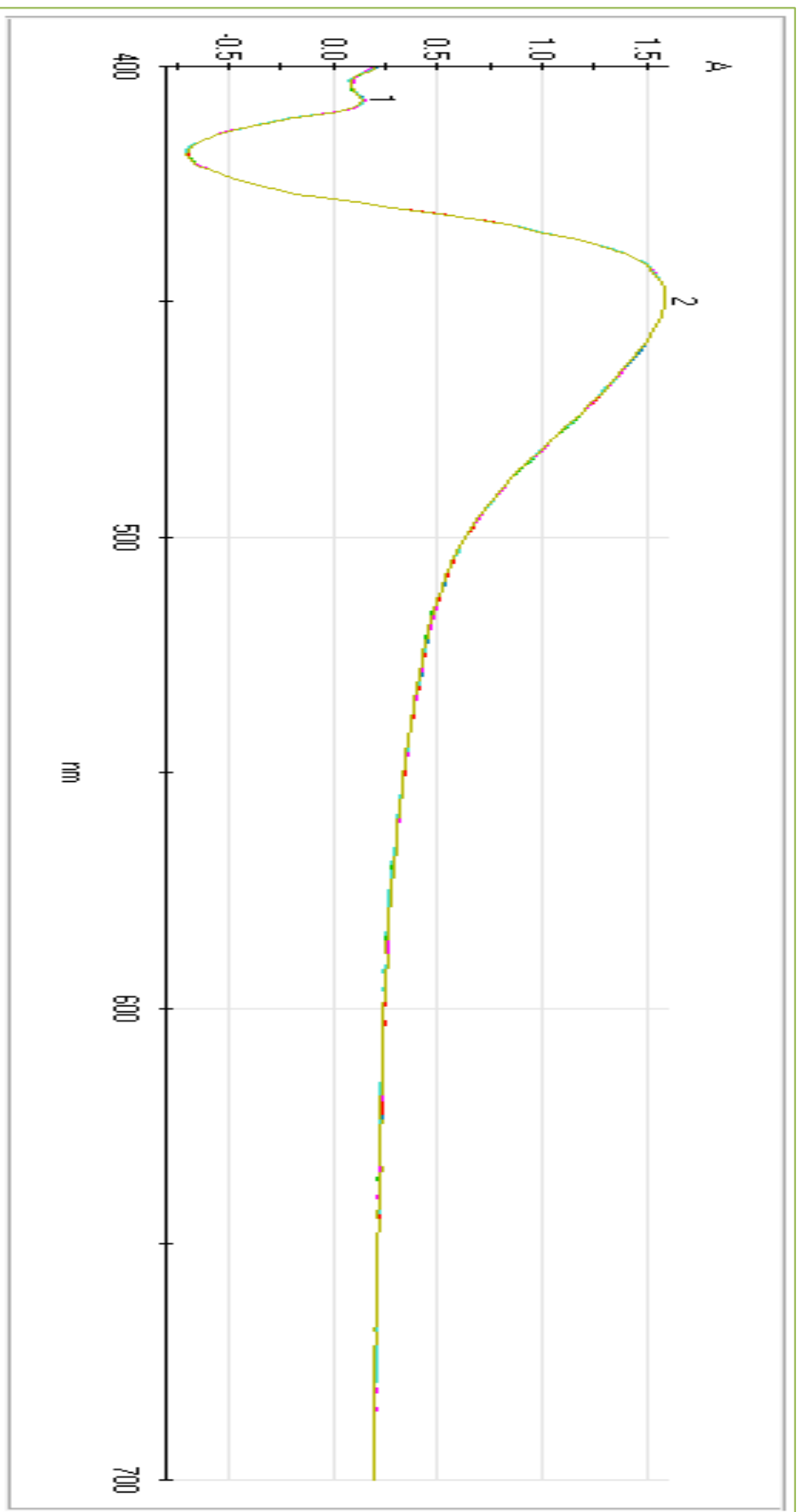
**ANEXO N° 9: Determinación de antocianinas de las hojas de *Coriandrum sativum L.* (Culantro del país).**

Tipo de muestra	Código	repetición	ABS = $\lambda$ Vis-máx	ABS = $\lambda$ Vis-máx nm	ABS = 700 nm	ABS = 700 nm	A = (a-c)-(b-d)	PM	FD	$\epsilon$	L	Concentración	Media	SD
			pH 1	pH 4.5	pH 1	pH 4.5						de Antocianinas	Antocianinas	
			(a)	(b)	(c)	(d)		g/mol		L/cm <sup>2</sup> mol	cm	mgCianidina-3-glucosido/ 100 g muestra original	mgCianidina-3-glucosido/ 100 g muestra original	
CULANTRO DEL PAIS	extracto 1	R1	1,8700	1,5450	0,244	0,199	0,2800	449,2	3,0	26.900,0	1,0	35,3977		
		R2	1,8550	1,5340	0,244	0,194	0,2710	449,2	3,0	26.900,0	1,0	34,2599	34,7656	0,5793
		R3	1,8130	1,4900	0,244	0,195	0,2740	449,2	3,0	26.900,0	1,0	34,6392		
CULANTRO DEL PAIS	extracto 1	R4	1,7640	1,4350	0,244	0,195	0,2800	449,2	3,0	26.900,0	1,0	35,3977		
		R5	1,7900	1,3560	0,244	0,196	0,3860	449,2	3,0	26.900,0	1,0	48,7983	41,9716	6,7039
		R6	1,7170	1,3400	0,244	0,197	0,3300	449,2	3,0	26.900,0	1,0	41,7187		
												PROMEDIO	38,3686	3,6416

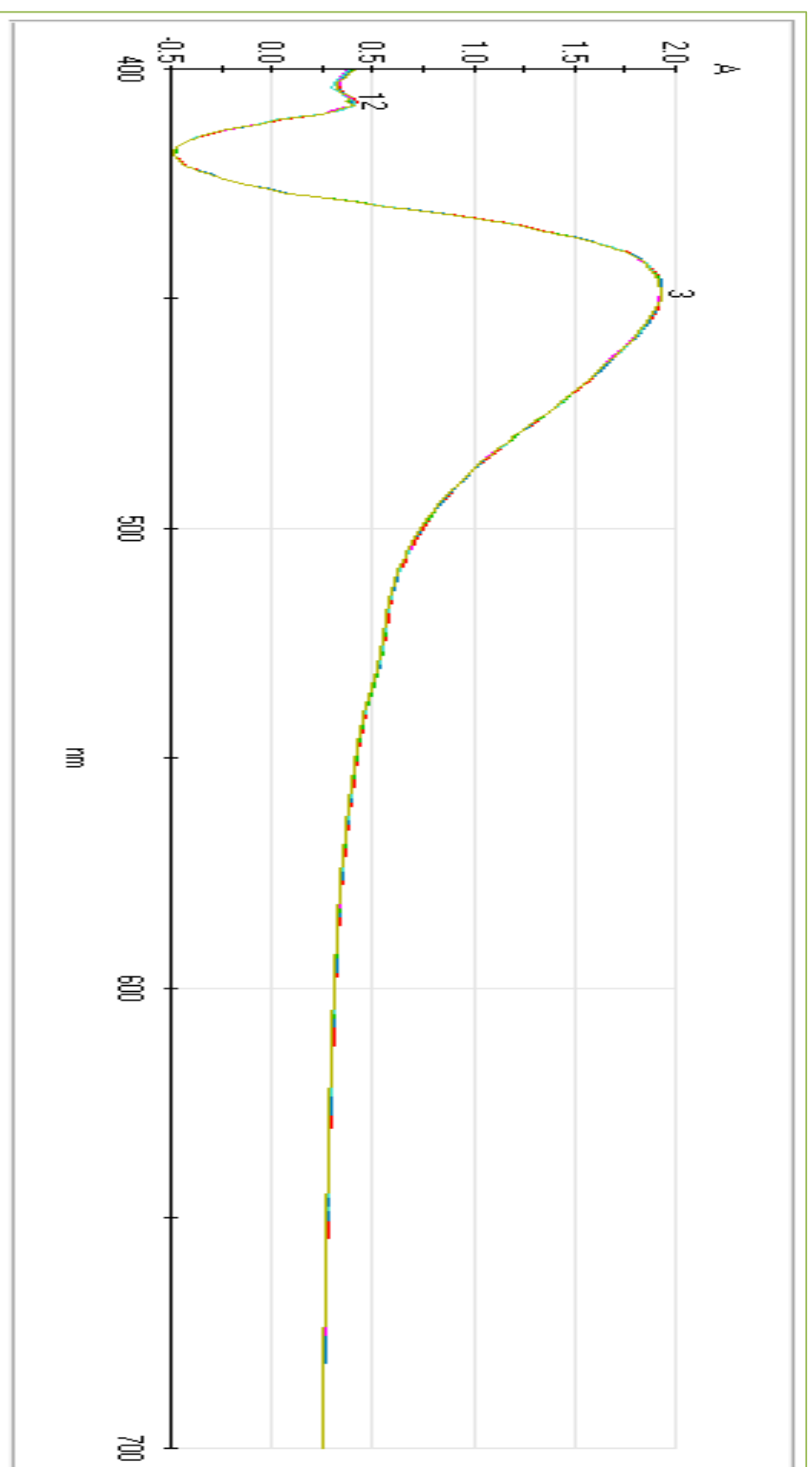
**ANEXO N° 10: Absorbancias obtenidas entre 400-700 nm para la determinación de antocianinas de las hojas de *Coriandrum sativum L.* (Culantro del País).**

ABSORBANCIA	
pH 1	pH 4.5
1.870 A – 455 nm	1.545 A – 455 nm
1.855 A – 456 nm	1.534 A – 456 nm
1.813 A – 458 nm	1.490 A – 459 nm
1.764 A – 460 nm	1.435 A – 462 nm
1.790 A – 459 nm	1.356 A – 466 nm
1.717 A – 462 nm	1.340 A – 467 nm

**ANEXO N° 11: Absorción del extracto etanólico de las hojas de *Coriandrum sativum* L. (Culantro del País) de 400 a 700 nm a pH 4.5 para la determinación de antocianinas.**



**ANEXO N° 12: Absorción del extracto etanólico de las hojas de *Coriandrum sativum* L. (Culantro del País) de 400 a 700 nm a pH 1 para la determinación.**



**ANEXO N° 13: Determinación de flavonoides de las hojas de *Coriandrum sativum* L. (Culantro del país).**

Tipo de muestra	Código	repetición	ABSORBANCIA	PM g/mol	FD	$\epsilon$ l/cm <sup>2</sup> *mol	L cm	Concentración de Flavonoides g quercetina/100 g muestra original	Media Flavonoides g quercetina/100 g muestra original	SD
CULANTRO DEL PAIS	extrato 1	R1	0,935	302,236	10,00	78,66	1,00	30,22	30,41	0,17
		R2	0,944	302,236	10,00	78,66	1,00	30,51		
		R3	0,944	302,236	10,00	78,66	1,00	30,51		
CULANTRO DEL PAIS	extrato 1	R4	0,943	302,236	10,00	78,66	1,00	30,48	30,47	0,05
		R5	0,944	302,236	10,00	78,66	1,00	30,51		
		R6	0,941	302,236	10,00	78,66	1,00	30,41		
CULANTRO DEL PAIS	extrato 1	R7	0,943	302,236	10,00	78,66	1,00	30,48	30,47	0,05
		R8	0,944	302,236	10,00	78,66	1,00	30,51		
		R9	0,941	302,236	10,00	78,66	1,00	30,41		
Promedio Total								30,45	0,09	

**ANEXO N°14: LECTURAS REALIZADAS A LAS HOJAS DE *Coriandrum sativum* (CULANTRO) PARA DETERMINAR  $\beta$ -CAROTENO**

$\beta$ - Caroteno			
Repeticiones	Control	Muestra	Fórmula
1	0,172	2,996	0,443368
2	0,172	2,994	0,443054
3	0,172	2,993	0,442897
4	0,172	2,994	0,443054
5	0,172	2,992	0,44274
6	0,172	2,994	0,443054
7	0,172	2,993	0,442897
8	0,172	2,995	0,443211
<b>PROMEDIO (mg/100g de muestra)</b>			<b>0,4430344</b>

**ANEXO N° 13: LECTURAS REALIZADAS A LAS HOJAS DE *Coriandrum sativum* (CULANTRO) PARA DETERMINAR RETINOL**

Retinol			
Repeticiones	Control	Muestra	Fórmula
1	0,796	2,948	2,34568
2	0,796	2,947	2,34459
3	0,796	2,948	2,34568
4	0,796	2,95	2,34786
5	0,796	2,941	2,33805
6	0,796	2,944	2,34132
7	0,796	2,948	2,34568
8	0,796	2,948	2,34568
<b>PROMEDIO (mg/100g de muestra)</b>			<b>2,3443175</b>

**ANEXO N° 14: Determinación de fenoles totales de las hojas de *Eryngium foetidum* (Sachaculantro).**

Tipo de muestra	Código	repetición	Alicuota de extrato seco	Alicuota de extrato seco	Volumen Acertado 1	Volumen Acertado 2		Alicota en el tubo	lectura en el Equipo	concentración FT	concentración FT	concentración FT	concentración FT	MEDIA FT	DS	
			(g)	(mg)	(ml)	alícuota (ml)	factor de dilución	(mL)	Abs.765 nm	mgGAE/mL	mgGAE	mgGAE/mg Alicuota extrato seco	mgGAE/100 g muestra original			
			a	b=a*1000	c	d	e	f=e/d	g	h	i=h/a	j=i*f*c	k=j/a	j=h/a		
SACHACULANTRO 1	1	R1	0,1000	100,00	30,00	1,000	1,000	1,000	0,200	1,165	0,111	3,324	33,240	192,340	192,396	0,097
		R2	0,1000	100,00	30,00	1,000	1,000	1,000	0,200	1,166	0,111	3,327	33,269	192,508		
		R3	0,1000	100,00	30,00	1,000	1,000	1,000	0,200	1,165	0,111	3,324	33,240	192,340		
SACHACULANTRO 2	2	R1	0,1000	100,00	30,00	1,000	1,000	1,000	0,200	1,166	0,111	3,327	33,269	192,508	192,452	0,097
		R2	0,1000	100,00	30,00	1,000	1,000	1,000	0,200	1,165	0,111	3,324	33,240	192,340		
		R3	0,1000	100,00	30,00	1,000	1,000	1,000	0,200	1,166	0,111	3,327	33,269	192,508		
SACHACULANTRO 3	3	R1	0,1000	100,00	30,00	1,000	1,000	1,000	0,200	1,165	0,111	3,324	33,240	192,340	192,396	0,097
		R2	0,1000	100,00	30,00	1,000	1,000	1,000	0,200	1,166	0,111	3,327	33,269	192,508		
		R3	0,1000	100,00	30,00	1,000	1,000	1,000	0,200	1,165	0,111	3,324	33,240	192,340		
Promedio Total													192,415	0,097		

**ANEXO N° 15: Determinación de Catequinas y Proantocianidoles (Taninos) de las hojas de *Eryngium foetidum* (Sachaculantro).**

Tipo de muestra	Código	repetición	Alicuota del extrato seco	Alicuota del extrato seco	Volumen Acertado 1	Alicuota en el tubo	lectura en el Equipo	concentración taninos	concentración taninos	concentración taninos	concentración taninos	concentración taninos	MEDIA concentración taninos	DS
			(g)	(mg)	(ml)	(mL)	Abs.500 nm	µg(+)-Catequina/mL	mg(+)-Catequina/mL	mg(+)-Catequina	mg (+)-catequina/g alícuota extrato seco	mg (+)-catequina/100 g muestra original	mg (+)-catequina/100 g muestra original	
			a	b = a*1000	c	e	f	g = @	g = @	h = g*c	i = h/b	j = h/a		
SACHACULANTRO	1	R1	0,1000	100,00	20,00	0,200	-0,045	5,137	0,005	0,103	1,027	5,945	5,945	-
		R2	0,1000	100,00	20,00	0,200	-0,045	5,137	0,005	0,103	1,027	5,945		
		R3	0,1000	100,00	20,00	0,200	-0,045	5,137	0,005	0,103	1,027	5,945		
SACHACULANTRO	1	R1	0,1000	100,00	20,00	0,200	-0,044	5,043	0,005	0,101	1,009	5,836	5,836	-
		R2	0,1000	100,00	20,00	0,200	-0,044	5,043	0,005	0,101	1,009	5,836		
		R3	0,1000	100,00	20,00	0,200	-0,044	5,043	0,005	0,101	1,009	5,836		
SACHACULANTRO	1	R1	0,1000	100,00	20,00	0,200	-0,045	5,137	0,005	0,103	1,027	5,945	5,873	0,063
		R2	0,1000	100,00	20,00	0,200	-0,044	5,043	0,005	0,101	1,009	5,836		
		R3	0,1000	100,00	20,00	0,200	-0,044	5,043	0,005	0,101	1,009	5,836		
Promedio Total												5,885	0,021	

**ANEXO N° 16: Determinación de antocianinas de las hojas de *Eryngium foetidum* (Sachaculantro).**

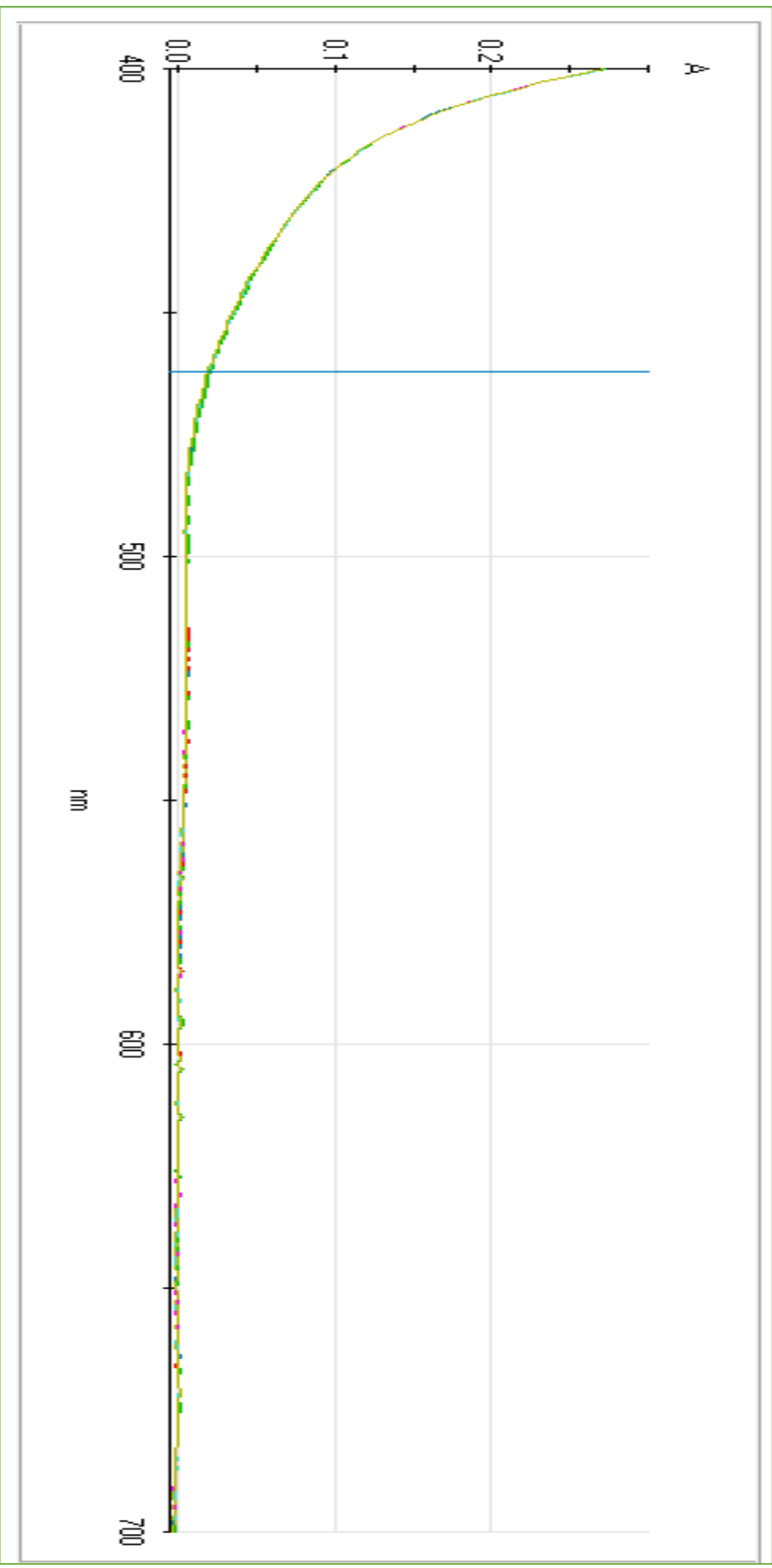
Tipo de muestra	Código	repetición	ABS = λ Vis-máx	ABS = λ Vis-máx nm	ABS = 700 nm	ABS = 700 nm	A = (a-c)-(b-d)	PM	FD	ε	L	Concentración de Antocianinas	Media Antocianinas	SD
			pH 1	pH 4.5	pH 1	pH 4.5	g/mol	L/cm <sup>3</sup> mol	cm	mg/Cianidina-3-glucosido/100 g muestra original	mg/Cianidina-3-glucosido/100 g muestra original			
			(a)	(b)	(c)	(d)								
SACHACULANTRO extracto 1		R1	0,5330	0,2880	0,201	0,018	0,0620	449,2	3,0	26.900,0	1,0	10,7835	10,8995	2,7847
		R2	0,4780	0,2480	0,201	0,018	0,0470	449,2	3,0	26.900,0	1,0	8,1746		
		R3	0,4650	0,2040	0,2	0,018	0,0790	449,2	3,0	26.900,0	1,0	13,7403		
SACHACULANTRO extracto 1		R4	0,4480	0,1730	0,201	0,018	0,0620	449,2	3,0	26.900,0	1,0	16,0014	20,3496	7,2321
		R5	0,4220	0,1450	0,201	0,018	0,0940	449,2	3,0	26.900,0	1,0	16,3492		
		R6	0,4140	0,0650	0,201	0,017	0,1650	449,2	3,0	26.900,0	1,0	28,6981		
Promedio Total												15,6245	5,0084	

**ANEXO N° 17: Absorbancias obtenidas entre 400-700 nm para la determinación de antocianinas de las hojas de *Eryngium foetidum* (Sachaculantro).**

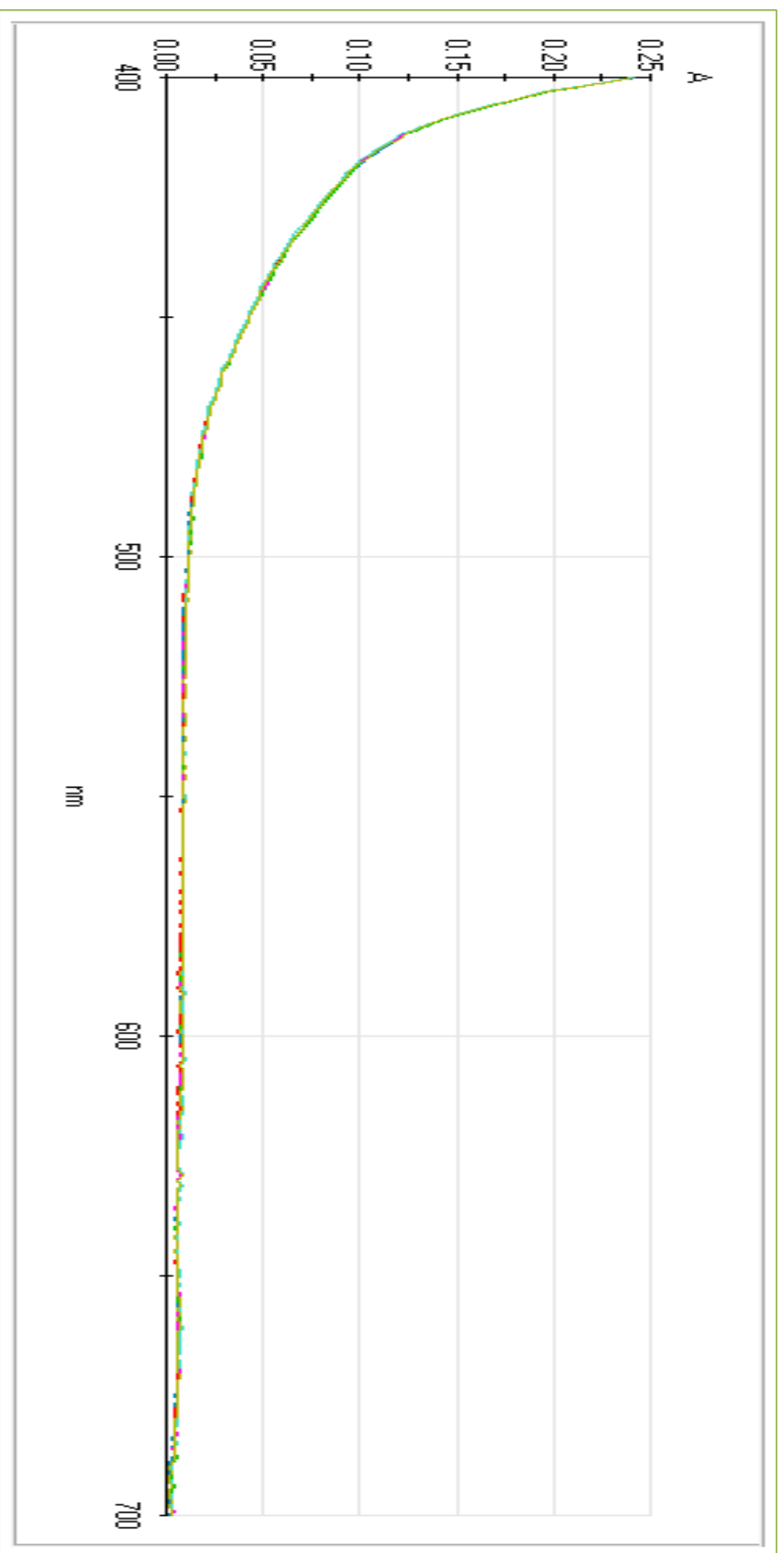
ABSORBANCIA	
pH 1	pH 4.5
0.533 A – 405 nm	0.288 A – 404 nm
0.478 A – 411 nm	0.248 A – 425 nm
0.465 A – 413 nm	0.204 A – 433 nm
0.448 A – 416 nm	0.173 A – 440 nm
0.422 A – 422 nm	0.145 A – 448 nm
0.414 A – 424 nm	0.065 A – 493 nm



**ANEXO N° 18: Absorción del extracto etanólico de las hojas de *Eryngium foetidum* (Sachaculantro) de 400 a 700 nm a pH 4.5 para la determinación de antocianinas.**



**ANEXO N° 19: Absorción del extracto etanólico de las hojas de *Eryngium foetidum* (Sachaculantro) de 400 a 700 nm a pH 1 para la determinación de antocianinas.**



**ANEXO N° 20: Determinación de flavonoides de las hojas de *Eryngium foetidum* (Sachaculantro)**

Tipo de muestra	Código	repetición	ABSORBANCIA	PM	FD	$\epsilon$	L	Concentración de Flavonoides	Media Flavonoides	SD
				g/mol		L/cm <sup>2</sup> *mol	cm	g quercetina/100 g muestra original	g quercetina/100 g muestra original	
SACHACULANTRO	extrato 1	R1	0,155	302,236	10,00	78,66	1,00	10,34	10,34	-
		R2	0,155	302,236	10,00	78,66	1,00	10,34		
		R3	0,155	302,236	10,00	78,66	1,00	10,34		
SACHACULANTRO	extrato 1	R4	0,155	302,236	10,00	78,66	1,00	10,34	10,34	-
		R5	0,155	302,236	10,00	78,66	1,00	10,34		
		R6	0,155	302,236	10,00	78,66	1,00	10,34		
SACHACULANTRO	extrato 1	R7	0,155	302,236	10,00	78,66	1,00	10,34	10,34	-
		R8	0,155	302,236	10,00	78,66	1,00	10,34		
		R9	0,155	302,236	10,00	78,66	1,00	10,34		
<b>Promedio Total</b>									<b>10,34</b>	<b>-</b>

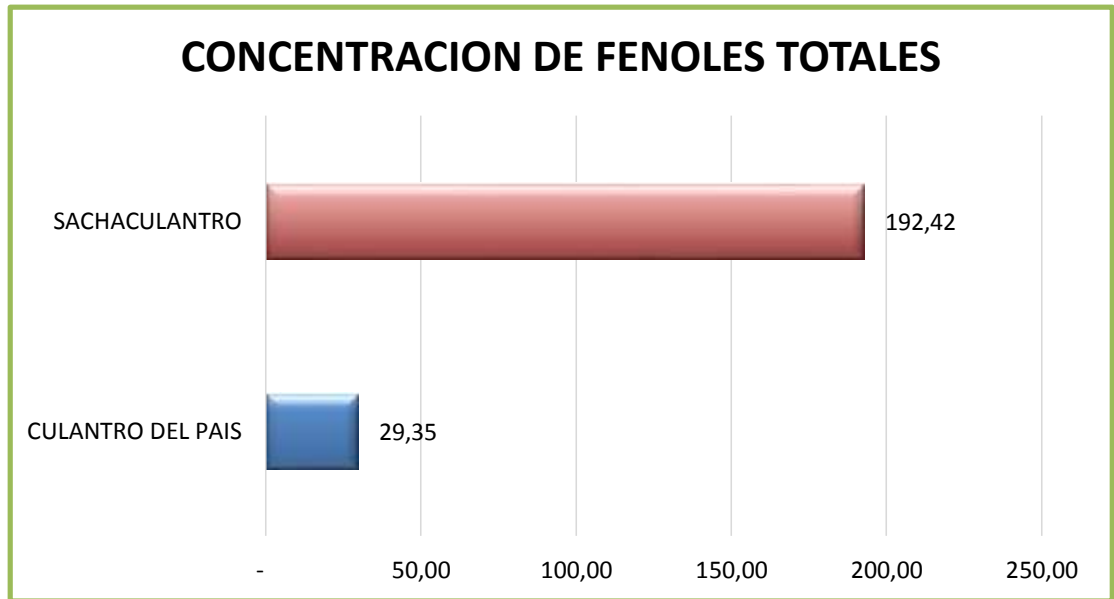
**ANEXO N° 21: LECTURAS REALIZADAS A LAS HOJAS DE *Eryngium foetidum* (SACHACULANTRO) PARA DETERMINAR  $\beta$ -CAROTENO**

<b><math>\beta</math>- Caroteno</b>			
Repeticiones	Control	Muestra	Fórmula
1	0,172	1,234	0,166734
2	0,172	1,234	0,166734
3	0,172	1,234	0,166734
4	0,172	1,234	0,166734
5	0,172	1,234	0,166734
6	0,172	1,234	0,166734
7	0,172	1,234	0,166734
8	0,172	1,234	0,166734
<b>PROMEDIO (mg/100g de muestra)</b>			<b>0,166734</b>

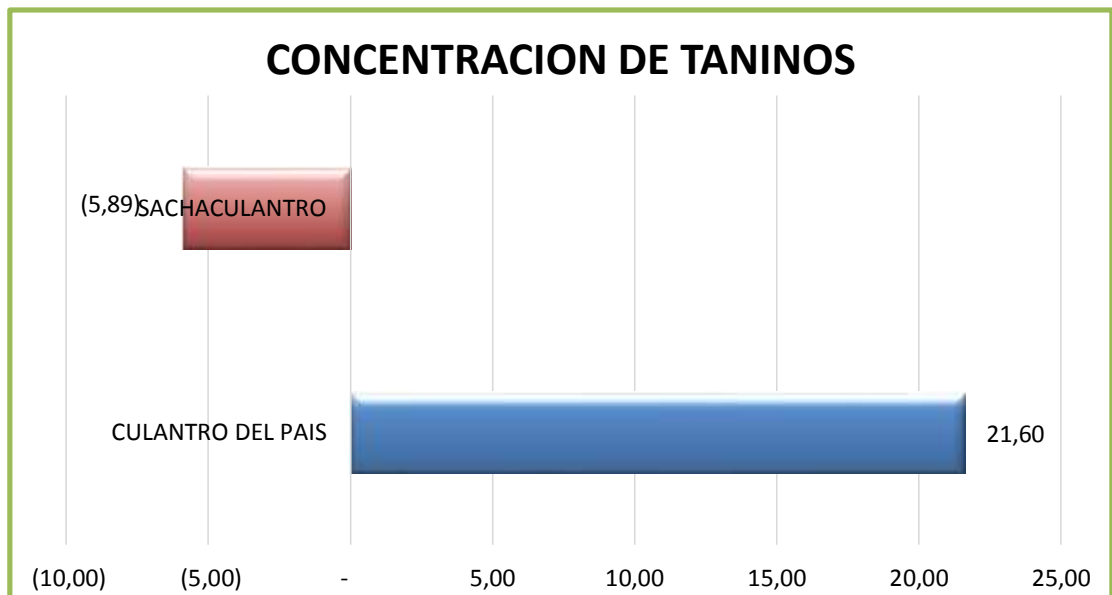
**ANEXO N° 22: LECTURAS REALIZADAS A LAS HOJAS DE *Eryngium foetidum*  
SACHACULANTRO PARA DETERMINAR RETINOL**

<b>Retinol</b>			
<b>Repeticiones</b>	<b>Control</b>	<b>Muestra</b>	<b>Fórmula</b>
1	0,796	1,019	0,24307
2	0,796	1,019	0,24307
3	0,796	1,019	0,24307
4	0,796	1,019	0,24307
5	0,796	1,019	0,24307
6	0,796	1,019	0,24307
7	0,796	1,019	0,24307
8	0,796	1,019	0,24307
<b>PROMEDIO (mg/100g de muestra)</b>			<b>0,24307</b>

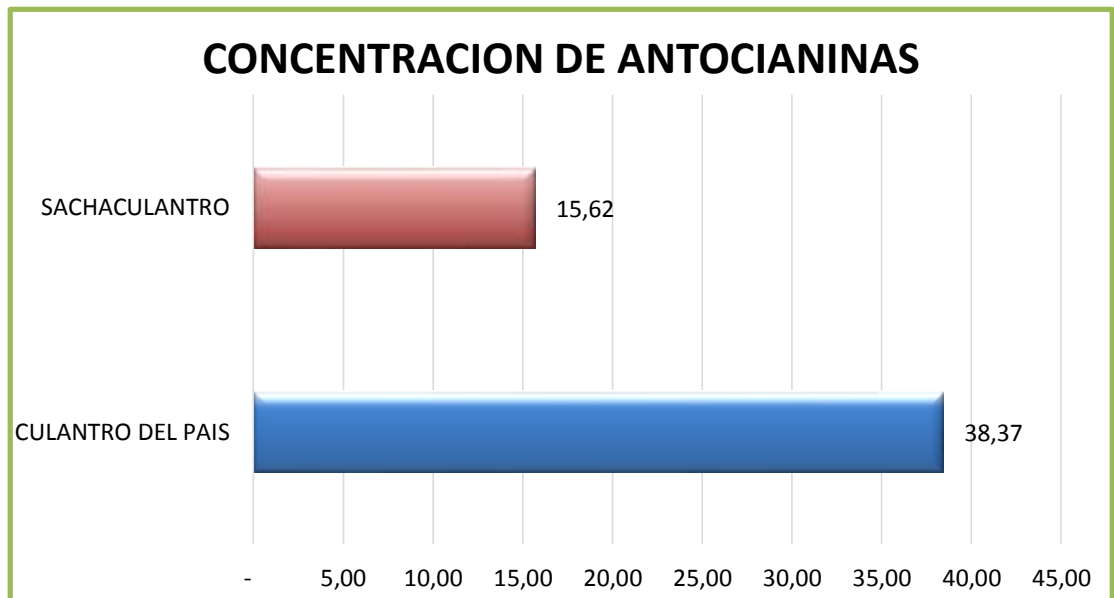
**ANEXO N° 23: Resumen de fenoles totales de las hojas de *Coriandrum sativum* L. (Culantro) y de *Eryngium foetidum* (Sachaculantro).**



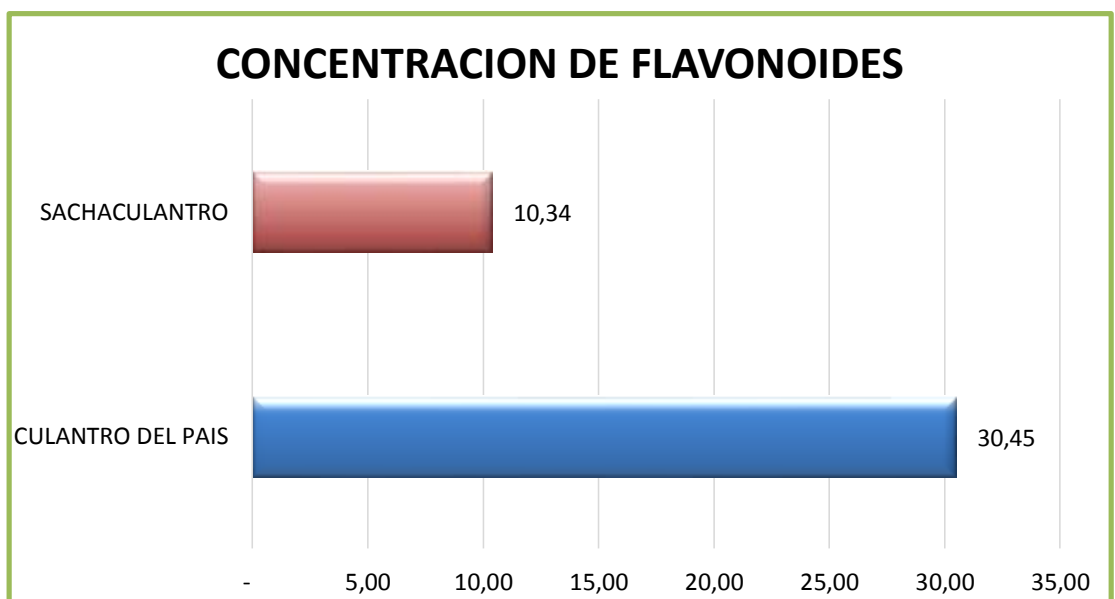
**ANEXO N° 24: Resumen de Taninos de las hojas de *Coriandrum sativum* L. (Culantro) y de *Eryngium foetidum* (Sachaculantro).**



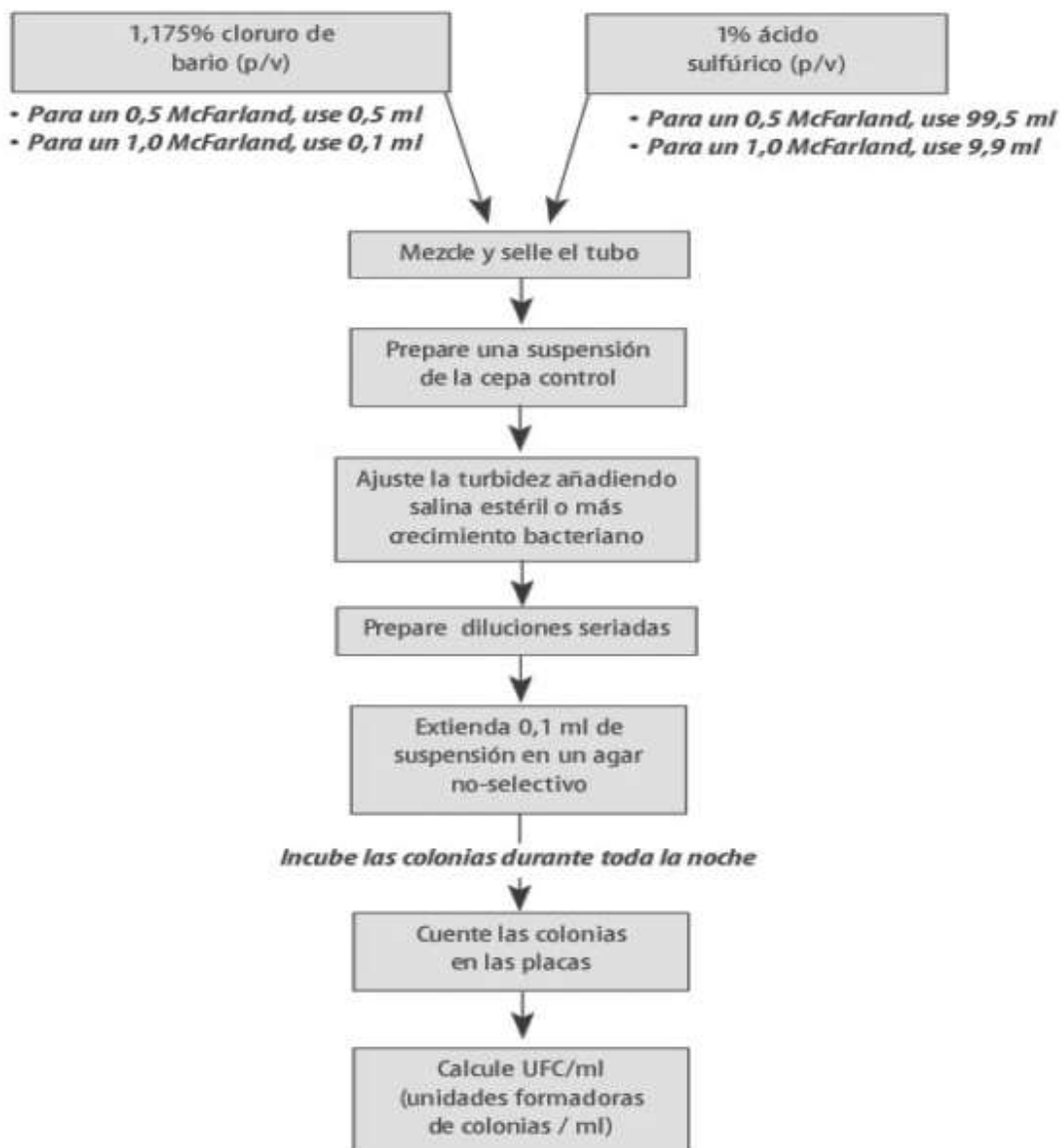
**ANEXO N° 25: Resumen de Antocianinas de las hojas de *Coriandrum sativum* L. (Culantro) y de *Eryngium foetidum* (Sachaculantro).**



**ANEXO N° 26: Resumen de Flavonoides de las hojas de *Coriandrum sativum* L. (Culantro) y de *Eryngium foetidum* (Sachaculantro).**



**ANEXO N° 27: Procedimiento para la preparación y el control de calidad de la turbidez estándar de Mc- Farland.**



**ANEXO N° 28: Procedimiento para obtención del extracto etanólico de *Coriandrum sativum* (Culantro) y de *Eryngium foetidum* (Sachaculantro).**

Lavado y selección de la muestra vegetal



Secado de la muestra vegetal



Molienda de las hojas secas de la muestra Vegetal



Recuperación del alcohol de la muestra utilizando el rotavapor



Filtrado de la muestra macerada



Maceración con etanol de la muestra



Obtención del extracto etanólico



Extracto etanólico Muestra seca



Muestra Final del extracto, listo para el análisis en laboratorio.





**ANEXO N° 29: Procedimiento para la evaluación de la actividad antibacteriana por el método difusión en disco.**

**PREPARACIÓN DEL INÓCULO**

**Activación y Crecimiento de colonias bacterianas en agar M-H**



**Preparación del inóculo en tubos de Cl Na 0.9 % siguiendo el estándar de Mc. Farland, y comparación.**



## DILUCIÓN DE EXTRACTOS Y APLICACIÓN DE DISCOS

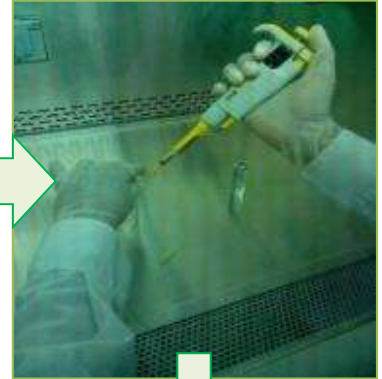
Procedimos a sacar la muestra para el pesado en la balanza digital



Preparación de los discos para el análisis y sembrado de las bacterias



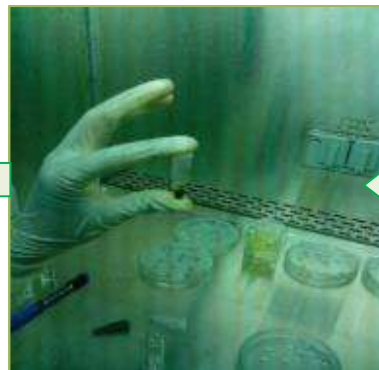
Preparación del control positivo de Gentamicina (160 mg/2ml).



Discos impregnados con las muestras listas para la colocación en el agar Mueller – Hinton.



Impregnación de discos con cada extracto, teniendo así discos impregnados de 12mg, 6 mg y C.N



Impregnación en los disco con 20  $\mu$ L de la concentración de cada extracto

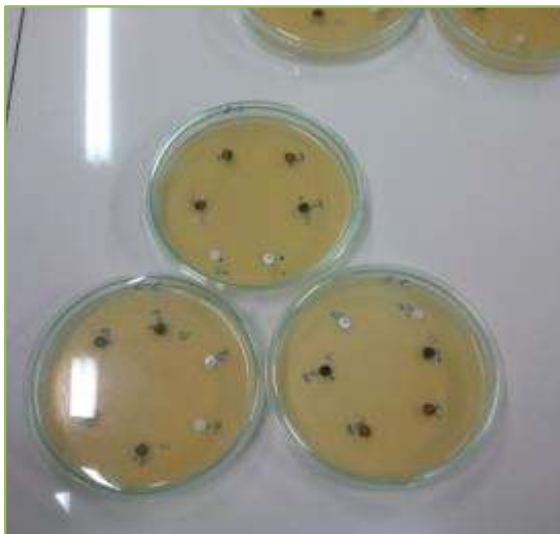


**Placas con Agar Mueller Hinton inoculadas y esparcidas por toda la placa con 100  $\mu$ L de la solución bacteriana.**

**Se procedió con la ayuda de una pinza estéril la colocación de los discos sobre la superficie del agar.**



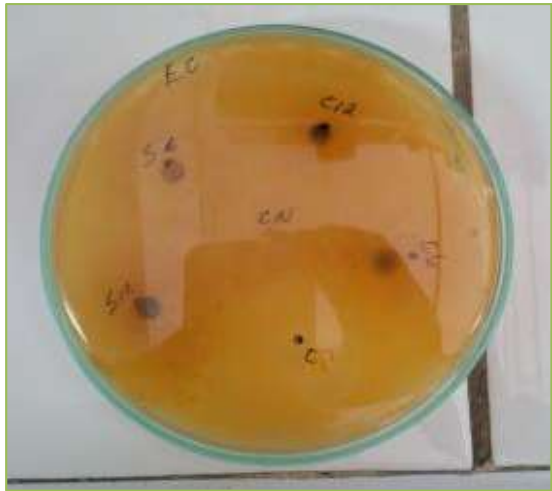
**Placas impregnadas con los discos y el control positivo y negativo**



# INCUBACIÓN



# LECTURA



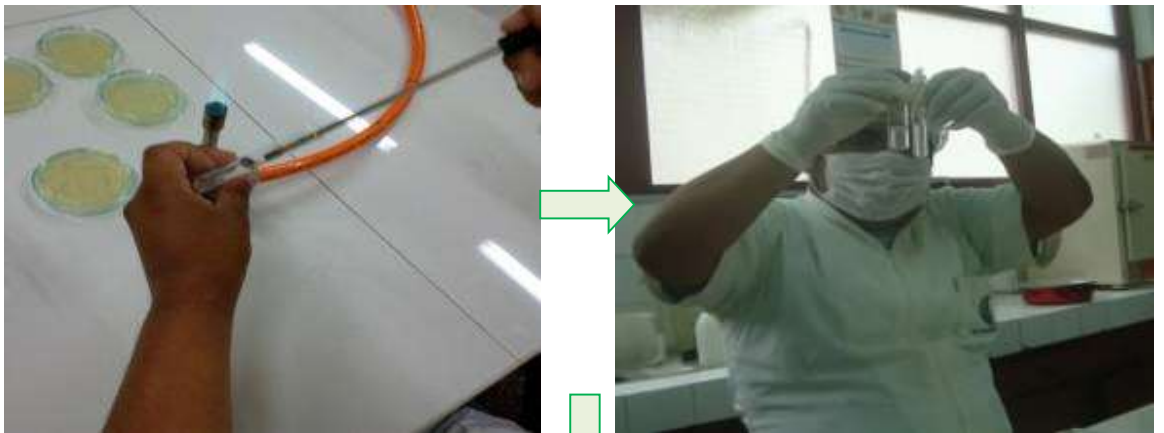
**ANEXO N° 30: Procedimiento para la evaluación de la actividad antibacteriana por el método macrodilución**

**PREPARACIÓN DEL INÓCULO**

**Activación y Crecimiento de colonias bacterianas en agar M-H**



**Preparación del inoculo en tubos de CI Na 0.9 % siguiendo el estándar de Mc. Farland, y comparación.**

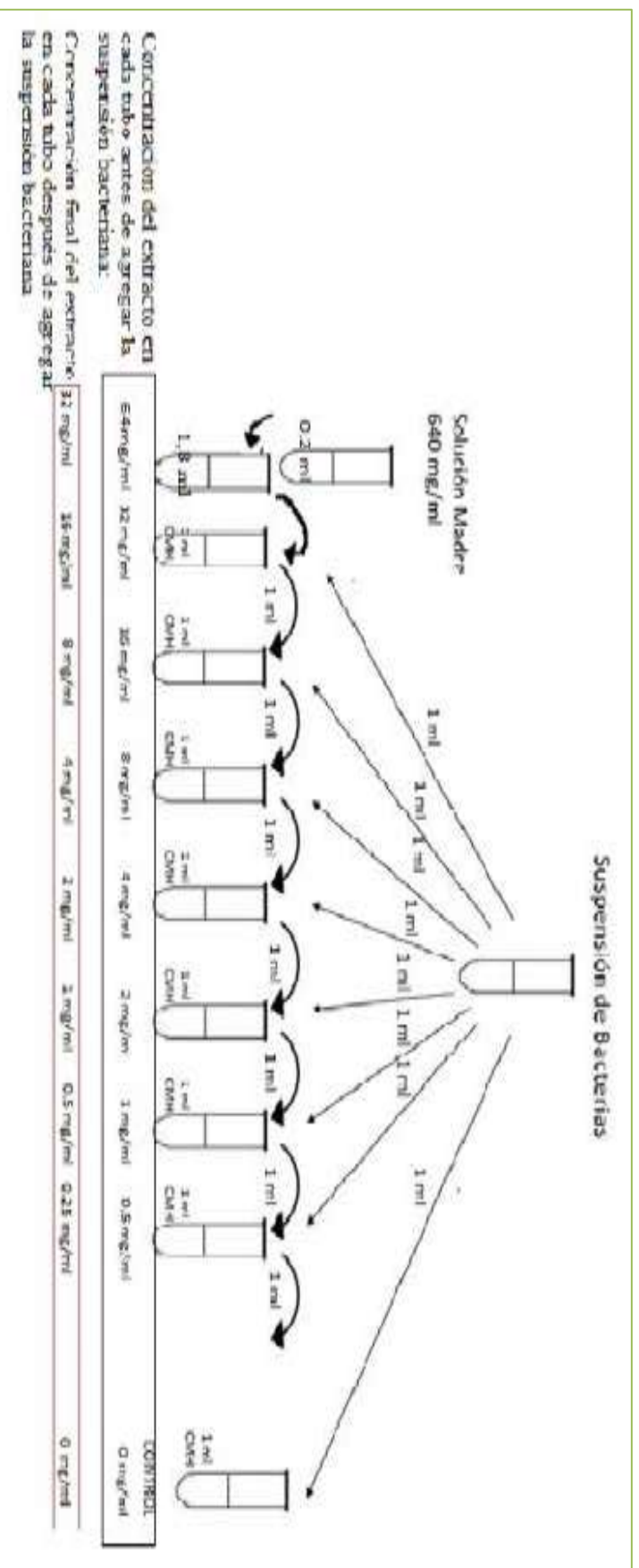


**Preparación del inoculo bacteriano (9,9 ml de caldo Müller Hinton más 0,1 ml de la solución bacteriana)**



## PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES

Se procedió a preparar las diluciones, agregando 500 µL de caldo Müller Hinton en los 8 microtubos más el control, luego se procedió a añadir 500 µL del extracto en los 8 microtubos obviando el control.



## INCUBACIÓN



## LECTURA



**ANEXO N° 31: Procedimiento para la determinación de la actividad antioxidante por el metodo del 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH).**



**50 mg del extracto**



**Diluir y aforar a 10 ml con metanol (5mg/ml)**



**A partir de la dilución anterior, se prepararon concentraciones a 0.05; 0.25; 0.05 y 0.01 mg/ml**



**Se preparo la solución stock**



**A partir de la solución stock DPPH se preparo la solución de trabajo (usado como blanco)**





Se midio a  $\lambda=517\text{nm}$



En una cubeta de poliestireno de 1 ml, se colocó 0.025  $\mu\text{l}$  de cada una de las diferentes concentraciones del extracto etanólico y se agregó 0.975  $\mu\text{l}$  de 0.1 mMol de DPPH.

## ANEXO N° 32: Procedimiento para la determinación de Compuestos Fenólicos.

