



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos



“Infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) tratada con quitosano y ácido salicílico y su efecto sobre la protección *in vivo* de esteatosis hepática en un modelo de obesidad”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
 Maestría en Ciencia y Tecnología de alimentos


Presenta:

I.Q. Carmen Alejandra Rangel García

Dirigida por:

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
 Presidente



 Firma

Dr. Ramón Gerardo Guevara González
 Secretario

 Firma

Dr. Luis Miguel Salgado Rodríguez
 Vocal



 Firma

Dra. Minerva Ramos Gómez
 Suplente



 Firma

Dr. Eduardo Castaño Tostado
 Suplente



 Firma


 MSP. Sergio Pacheco Hernández
 Director de la Facultad


 Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
 Director de Investigación y Posgrado

Resumen

La esteatosis hepática es una complicación de la obesidad y puede ser tratada o prevenida con infusiones herbales como las preparada a base de plantas de hierbabuena *Mentha piperita* (Mp) y hierbabuena *Mentha spicata* (Ms). Los compuestos presentes en la hierbabuena asociados a estos beneficios pueden aumentarse con el uso de elicitores. El objetivo de este trabajo fue evaluar la concentración de compuestos fenólicos presentes en infusiones de hierbabuenas (Mp y Ms) tratadas con quitosano (Q) y ácido salicílico (AS), y determinar su efecto sobre la esteatosis hepática en un modelo de obesidad. Las plantas se cultivaron en invernadero y al día 45 después de la siembra, se trataron con AS (1.0 y 2.0 mM) y Q (0.8, 1.6 y 3.2 μ M), y al día 59 después de la siembra, se determinaron los parámetros de crecimiento de las hojas, longitudinal y transversal y largo de los tallos. Se colectaron hojas y tallos, se secaron y se molieron. No se encontraron diferencias significativas en los parámetros de crecimiento atribuidos a los tratamientos con elicitores en ambas plantas. Se prepararon infusiones al 1% (m/v) y se analizó el contenido de compuestos fenólicos, demostrando un aumento en aquellas tratadas con AS 2 mM para ambas especies; por lo tanto, se realizó el perfil fitoquímico de estas, observando que el AS 2 mM aumentó la concentración de algunos ácidos fenólicos como el hidroxibenzoico, elágico, cafeico, rosmarínico, sinápico, ferúlico y clorogénico. En el caso de los flavonoides se observaron incrementos en limocitrina rutinosido, vitexin-O-xilosido, luteolina, quercetina, catequina, naringenina, diosmetina y apigenina. Mientras que, algunos compuestos como carbohidratos y aminoácidos disminuyeron con este tratamiento. El estudio *in vivo* tuvo una duración de cuatro meses; durante los dos primeros meses, las ratas Wistar se alimentaron con una dieta hipercalórica y después de este tiempo se agregó a su dieta infusiones de hierbabuena (Ms y Mp control y las tratadas con AS 2 mM) durante 12 h al día. Las infusiones de hierbabuena no mostraron efecto negativo sobre la ganancia de peso. Con respecto a los parámetros séricos, las infusiones Ms control y Mp control redujeron el colesterol total (58-64%), y de igual manera las tratadas con AS 2 mM (46% aproximadamente). La concentración de triglicéridos disminuyó con los tratamientos Ms control y Ms AS 2 mM en un 38 y 25%, mientras que para Mp control no se observó ningún efecto y Mp AS 2 mM mostró una reducción del 20%. En el caso de la concentración de glucosa, esta disminuyó solo con Mp control (33%). Con respecto al efecto sobre esteatosis hepática, el tratamiento que mostró mayor efecto fue Ms AS 2 mM, disminuyendo a 1 el grado de esteatosis, respecto al control obeso (grado 4), y mostró una reducción del 43% de triglicéridos en hígado. De esta manera se concluye que las infusiones de Ms se pueden utilizar para el control de la esteatosis hepática y la inducción con AS 2 mM mejora significativamente los beneficios observados.

(Palabras clave: hierbabuena, elicitores, obesidad y esteatosis hepática)

Summary

Hepatic steatosis is a complication of obesity that can be treated with herbal infusions, such as those prepared from peppermint plants *Mentha piperita* (Mp) and *Mentha spicata* (Ms). The compounds associated with these benefits can be increased with elicitors. The aim of this work was to evaluate the concentration of phenolic compounds present in peppermint infusions (Mp and Ms) treated with chitosan (Q) and salicylic acid (SA), and to determine their effects on hepatic steatosis in obese rats. Peppermint plants were grown in a greenhouse and at day 45 after planting, the plants were treated with SA (1.0 and 2.0 mM) and Q (0.8, 1.6 and 3.2 μ M), and at day 59 after planting, growth parameters such as length of the leaf and length of stems were determined. Leaves and stems were collected, dried and ground. There were no significant differences in growth parameters, in any of the plants. All infusions were prepared at 1% (w/v) and those treated with AS 2 mM had higher content of phenolic compounds, therefore, the phytochemical profile was performed, showing that AS 2 mM increased the concentration of hydroxybenzoic acid derivatives, ellagic acid, caffeic acid, rosmarinic acid, sinapic acid, ferulic acid and chlorogenic acid. In addition, for flavonoids increases were observed in rutinid, vitexin-O-xiloside, luteolin, quercetin, catechin, naringenin, diosmetin and apigenin. While, some compounds such as carbohydrates and amino acids decreased with this treatment. For *in vivo* study, Wistar rats were fed with a hypercaloric diet for four months, the last two months the animals were treated with infusions of peppermint (Ms and Mp control and treated with As 2 mM) during 12 h per day. The treatments did not show negative effect on weight gain. Respect to serum parameters, the control-infusion of each specie (Ms y Mp) reduced total cholesterol (58-64%), and those SA-treated infusions up to 46%. For triglycerides, the Ms-control and SA-treated infusions decreased by 38%, and 25%, respectively, while Mp-control infusion had no effect and those SA-treated infusions decreased by 20%. While the glucose concentration decreased, only with Mp-control (33%). Regarding the effect on hepatic steatosis, the treatment with the highest improvement on hepatic steatosis was Ms AS 2 mM infusion, showing grade 1 of steatosis, with respect to obese control (grade 4), and showed a reduction of liver triglycerides (43%). Mp infusion can be used for the control of hepatic steatosis and induction with AS 2 mM significantly improve the benefits observed.

(Key words: peppermint, elicitors, obesity and hepatic steatosis)

Dedicatoria

A mis padres: **Catalina Garcia Gonzáles** por darme tanto amor y fortaleza en cada momento, por enseñarme a encontrar lo mejor de la vida hasta en las peores circunstancias. **Adrián Rangel Pineda** por enseñarme que a veces es necesario salir a buscar los sueños, que los límites están en nuestra imaginación y que puedo llegar tan lejos como me lo proponga. Por sacrificar su tiempo juntos para darnos lo mejor, los amo y son mi más grande motivación.

A mis hermanas: **Tere**, por ayudarme a tomar buenas decisiones, por apoyarme en todo momento, por confiar en mí, por enseñarme a que ser sensible no es lo mismo que ser débil y que aunque no me lo digas me demuestras tu amor con tus acciones. **Adriana**, por tener siempre las palabras correctas en el momento indicado, por escucharme, por cuidarme, por amarme tanto, por aconsejarme y por siempre estar cuando te necesito, eres una persona maravillosa. Por darme el mejor regalo de mi vida (Adrián, Grettell y Rafita), las amo.

A mis cuñados: **Crescencio**, por siempre escucharme y aconsejarme de la mejor manera, por ser una gran motivación y ejemplo para mí, eres una excelente persona. **Rafael**, por tu gran ejemplo de perseverancia, fortaleza y responsabilidad.

A toda mi familia, por su apoyo y amor brindado en cada momento, especialmente a mis tíos: **Víctor López García**, por creer en mí, apoyarme, cuidarme y aconsejarme, en verdad le estaré eternamente agradecida. **Emma Rangel Pineda**, por su apoyo y confianza.

A mis amigos: **Araceli**, por ayudarme desde el primer momento, por adoptarme en tu casa cuando me sentía sola, por tu deliciosa comida, por tu paciencia, porque siempre me haces sentir en paz y como en casa, eres una personita con un gran corazón. **Carolina**, por compartir tantos momentos y experiencias juntas, por siempre hacerme sentir bien y sacarme de los momentos difíciles, por hacerme sentir en confianza, por motivarme, por acompañarme en mis locuras, por todo esto “gracias totales”, eres una persona extraordinaria. **Diana**, por ser la madura del grupo, por tus acertados consejos, por siempre brindarme tu apoyo incondicional en todo momento, por salir de tu casa a media noche para ir a rescatarme a Amazcala, por demostrarme tu amor y amistad tantas veces, eres una persona maravillosa. **Liliana**, por estar a mi lado en los momentos difíciles, por siempre tener una palabra de aliento, por enseñarme que los días que vivimos no regresan y que por eso debemos disfrutar cada momento, sin duda eres el mejor ejemplo de brillantez y modestia.

Samy, mi amiga del alma, por compartir tantas cosas juntas, por ser mi compañera incondicional, por brindarme tu tiempo y consejos, porque juntas aprendimos lo fuertes que somos, eres un gran ejemplo de fortaleza.

A todas ustedes por hacer esta etapa de mi vida una experiencia hermosa, por su maravillosa amistad, por ser como mi familia, por enseñarme tanto de la vida, las amo.

Lucy, mi hermanita de generación, gracias por tu hermosa y sincera amistad, por estar a mi lado en esos momentos que sentía que ya no podía, por ser una persona tan maravillosa conmigo, por enseñarme a ser un poco más amable y por compartir tus conocimientos. Estoy muy feliz de haber compartido esta experiencia contigo, eres una personita muy especial para mí. Un gran ejemplo de dedicación, responsabilidad y trabajo, te quiero pequeña Lucy.

Elizabeth, por ser como una hermana mayor, por siempre tener tiempo para escucharme y ayudarme, por hacerme sentir que no estaba sola, por compartirme tus amplios conocimientos, sabes que te admiro mucho y que eres una gran persona en todos los sentidos, cuando sea grande quiero ser como tú. **Julio**, amigo del alma, hermanito de laboratorio, compañero de aventuras, gracias por ayudarme a transportar mis plantitas, por compartir tus conocimientos, por siempre contagiarnos de tu alegría en el laboratorio, y principalmente, gracias por ser mi mejor amigo, por todos tus consejos personales y profesionales, por tenerme paciencia y aguantar mis bromas sin llorar, eres el mejor.

Pequeña Gloria por ser igualita a mí, por estar a mi lado siempre que lo necesité, por los momentos maravillosos a tu lado, por regañarme y ser mi baúl de secretos, por siempre tener una tierna palabra para mejorar mi ánimo, por tu cariño y compañía, te quiero. A todos ustedes por enseñarme el significado de la palabra amistad.

Agradecimientos

A Dios por acomodar todas las variables en el lugar y tiempo perfectos, por darme fortaleza, sabiduría y paciencia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

A la **Dra. Rosalía** Reynoso Camacho por hacerme parte de este gran proyecto, por brindarme su confianza, por su apoyo y dirección, por motivarme y enseñarme tantas cosas tanto en lo profesional como en lo personal, por ayudarme a crecer y formarme como Maestra en ciencia y tecnología de alimentos.

A mis sinodales **Dr. Ramón** Gerardo Guevara González, **Dr. Luis Miguel** Salgado Rodríguez, **Dra. Minerva** Ramos Gómez y **Dr. Eduardo** Castaño Tostado, por todas sus observaciones y propuestas para mejorar este trabajo.

Al departamento administrativo de la universidad y de posgrado, especialmente a **Carmelita**, por ser excelente en su trabajo, por su gran dedicación y empeño.

A mis compañeros de laboratorio: **Gerardo**, siempre con una sonrisa y una palabra que me alegraba el día, gracias por todo amigo mío; **Magda**, por compartirme tus conocimientos y resolver mis dudas, siempre amigable y con amor a tu trabajo, eres un gran ejemplo de responsabilidad; **Rocío**, por tus acertados comentarios y observaciones en seminario; **Diana**, por escucharme, aconsejarme y regalarme una palabra de ánimo cuando lo necesitaba, eres un gran ejemplo de dedicación y trabajo; **Sarahí**, por enseñarme que lo importante es mantenerse y alcanzar los sueños a pensar de las adversidades; **Iza**, por compartirme tus conocimientos, por tus consejos, por tu tiempo, observaciones y propuestas aportadas a mi proyecto; **Haiku**, por tu amistad y apoyo, eres un chico súper trabajador y responsable, gracias por tu ejemplo; **Gersaín**, por ser un buen amigo, por escucharme y aconsejarme, por aguantarme y no enojarte conmigo; **Alex**, por siempre ser tan amable y muy buen amigo, **Judith**; gracias por escucharme y aconsejarme, porque enseñarme que nunca es tarde para alcanzar nuestros sueños y a no quitar el dedo del renglón, por estar ahí en momentos difíciles y tenderme tu mano, gracias por todo.

A mis niñas de licenciatura, **Gaby** por ser parte del inicio de este proyecto, gracias por siempre estar dispuesta a ayudarme; **Monse** y **Belem** (con M), en verdad sin ustedes no hubiera sido lo mismo, son unas niñas súper trabajadoras, gracias por ayudarme en mis experimentos, desde el invernadero hasta el bioterio, este trabajo también es de ustedes, las quiero mucho.

Y a todas las personas que han sido especiales en el transcurso de mi vida y a aquellas que se sumaron a ese grupo en esta etapa, que tuvieron una palabra de aliento, que estuvieron ahí para escucharme, que me llamaron o mandaron mensajes cuando los necesitaba, que me apoyaron y me regalaron momentos hermosos, **Cynthia**, **Inés**, **Yamil**, **Jokebed**, **Karen**, **Miriam**, **Rodolfo**, **Erika**, **Alexis**, **Oscar**, **Karla**, **Maleny**, **Angélica** y **Abigail**.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS	4
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	8
2.1 Obesidad y sobrepeso	8
2.1.1 Prevalencia de obesidad y sobrepeso en México	8
2.2 Fisiopatología de la obesidad.....	8
2.2.1 Tejido adiposo e inflamación	10
2.3 Esteatosis hepática	11
2.4 Causas de la obesidad en México	13
2.5 Implicaciones terapéuticas	14
2.6 Infusiones y bebidas funcionales	14
2.7 Hierbabuena.....	16
2.8 Mecanismos de defensa de plantas.....	19
2.9 Elicitores.....	20
2.9.1 Quitosano	21
2.9.2 Ácido salicílico	23
2.10 Hierbabuena sometida a diferentes factores de estrés	25
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. OBJETIVOS.....	29
4.1 Objetivo general	29
4.2 Objetivos específicos	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
5.1 Material vegetal.....	30
5.2 Material biológico	30
5.3 Evaluación de parámetros de crecimiento y compuestos fenólicos en <i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i> tratadas con quitosano y ácido salicílico	30
5.4 Cuantificación de ácidos fenólicos y flavonoides por UPLC.....	32
5.4.1 Preparación de la muestra	32
5.4.2 Cuantificación de compuestos fenólicos en plantas tratadas con inductores.....	32

5.5	Determinación del perfil de metabolitos presentes en las infusiones de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i>) tratada con ácido salicílico 2 mM.....	33
5.6	Determinación de la capacidad antioxidantes de las infusiones de <i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i> tratada con AS 2 mM mediante los ensayos de DPPH y ORAC.....	34
5.6.1	Ensayo DPPH	34
5.6.2	Ensayo ORAC.....	34
5.7	Evaluación de las propiedades fisicoquímicas	34
5.7.1	Color	34
5.7.2	Azúcares	35
5.7.3	Acidez	35
5.8	Evaluación del efecto de las infusiones de hierbabuena tratada con ácido salicílico 2 mM sobre el peso corporal y esteatosis hepática de ratas obesas.....	35
5.8.1	Evaluación del efecto de las infusiones de hierbabuena tratada con ácido salicílico 2 mM sobre el perfil de lípidos y glucosa en suero.....	37
5.8.2	Evaluación del efecto de las infusiones de hierbabuena tratada con ácido salicílico 2 mM sobre la esteatosis hepática	37
5.9	Diseño y Análisis estadístico.....	38
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
6.1	Parámetros de crecimiento de las plantas de hierbabuena tratadas con quitosano y ácido salicílico.....	39
6.2	Cuantificación de compuestos fenólicos presentes en infusiones de plantas <i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i> tratadas con quitosano y ácido salicílico.....	39
6.3	Perfil metabólico de compuestos presentes en infusiones de plantas <i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i> tratadas con ácido salicílico 2 mM	43
6.3.1	Perfil de compuestos fenólicos identificados en infusiones de <i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i> tratadas con ácido salicílico 2 mM.....	43
6.3.2	Metabolitos de bajo peso molecular en infusiones de <i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i> tratadas con ácido salicílico 2 mM.....	48
6.4	Determinación de la capacidad antioxidantes de las infusiones de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i>) tratada con ácido salicílico	50
6.5	Propiedades fisicoquímicas de las infusiones de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i>) tratadas con ácido salicílico	52
6.5.1	Color	52
6.5.2	Azúcares y acidez titulable.....	53

6.6	Efecto de las infusiones de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i>) tratada con ácido salicílico 2 mM sobre el peso corporal	55
6.7	Efecto de las infusiones de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i>) tratada con ácido salicílico sobre concentración de lípidos en suero de ratas obesas.....	57
6.8	Efecto de las infusiones de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i>) tratada con AS sobre la glicemia en suero de ratas obesas y resistencia a la insulina.....	59
6.9	Efecto de las infusiones de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i>) tratada con ácido salicílico 2 mM sobre la esteatosis hepática	60
7.	CONCLUSIONES	64
8.	REFERENCIAS.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia de sobrepeso y obesidad de hombres y mujeres de 20 años o más. México, ENSANUT 2016.....	9
Figura 2. Prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población adolescente de 12 a 19 años de edad.....	10
Figura 3. Representación esquemática del proceso de inflamación crónica.....	11
Figura 4. Mecanismos involucrados en el desarrollo de esteatosis hepática asociada a la obesidad.....	12
Figura 5. Consumo calórico diario proveniente de bebidas en adolescentes y adultos, por grupo de edad, en 2006 (Rivera et al., 2008).....	13
Figura 6. Hierbabuena (<i>Mentha piperita</i>).....	16
Figura 7. Estructura de los compuestos mayoritarios de la hierbabuena.	18
Figura 8. Vía de fenilpropanoides.....	22
Figura 9. Modelo esquemático del AS sobre la inducción de la tolerancia a estrés abiótico en plantas superiores.....	24
Figura 10. Metodología de cultivo de plantas de hierbabuena, aplicación de inductores, medición de parámetros de crecimiento y preparación de la muestra	31
Figura 11. Efecto de la aplicación de quitosano y ácido salicílico sobre el crecimiento a) longitudinal y b) transversal de las hojas y c) el largo de los tallos de plantas de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i>)..	40
Figura 12. Aminoácidos presentes en infusiones de hierbabuena <i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i> tratada con AS 2 mM	49
Figura 13. Carbohidratos presentes en infusiones de hierbabuena <i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i> tratada con AS 2 mM.	49
Figura 14. Ácidos orgánicos presentes en infusiones de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i>) tratada con AS 2 mM.....	50
Figura 15. Efecto del consumo de infusiones de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i>) tratada con ácido salicílico 2 mM sobre la ganancia de peso de ratas macho Wistar obesas.....	56
Figura 16. Cambios histológicos en el tejido hepático: a) Sanas, b) Obesas, (c) obesas con infusión <i>Mentha piperita</i> control, (d) obesas con infusión <i>Mentha piperita</i> ácido salicílico 2 mM, (e) obesas con infusión <i>Mentha spicata</i> control, (f) obesas con infusión <i>Mentha spicata</i> ácido salicílico 2 mM.	62
Figura 17. Efecto del consumo de infusiones de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i>) tratada con ácido salicílico 2 mM sobre el contenido de triglicéridos en hígado de ratas macho Wistar obesas.	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Infusiones más consumidas en México según la Encuesta Nacional de Gastos de los Hogares.....	16
Cuadro 2. Estudios previos de la actividad biológica de la hierbabuena	17
Cuadro 3. Uso de quitosano como inductor.....	23
Cuadro 4. Concentración de compuestos fenólicos identificados en infusiones preparadas a partir de hojas de hierbabuena cultivada en invernadero (<i>Mentha piperita</i>) tratada con ácido salicílico.	27
Cuadro 5. Concentración de saponinas identificadas en infusiones preparadas a partir de hojas de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i>) tratada con ácido salicílico....	27
Cuadro 6. Contenido nutrimental de las dietas estándar y alta en grasa y fructosa .	36
Cuadro 7. Grupos de los estudio In vivo para la evaluación de las infusiones de hierbabuena tratadas con quitosano	36
Cuadro 8. Efecto de la aplicación foliar de ácido salicílico y quitosano sobre la concentración de ácidos fenólicos en infusiones de <i>Mentha piperita</i>	41
Cuadro 9. Efecto de la aplicación de ácido salicílico y quitosano sobre la concentración en µg/mL de ácidos fenólicos en infusiones de <i>Mentha spicata</i> .	41
Cuadro 10. Efecto de la aplicación foliar de ácido salicílicos y quitosano sobre la concentración de flavonoides en infusiones de <i>Mentha piperita</i>	42
Cuadro 11. Efecto de la aplicación foliar de ácido salicílico y quitosano sobre la concentración de flavonoides en infusiones de <i>Mentha spicata</i>	42
Cuadro 12. Perfil de ácidos fenólicos identificados en infusiones de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i>) tratada con ácido salicílico 2 mM	45
Cuadro 13. Perfil de flavonoides identificados en infusiones de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i>) tratada con ácido salicílico 2 mM	47
Cuadro 14. Efecto de la aplicación foliar de ácido salicílico 2 mM sobre la actividad antioxidante de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i>).....	52
Cuadro 15. Determinación de color de infusiones de hierbabuena <i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i> , elicitada con ácido salicílico 2 mM	53
Cuadro 16. Determinación de acidez titulable y grados brix de las infusiones de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i>) tratada con ácido salicílico 2 mM	54
Cuadro 17. Efecto del consumo de infusiones de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i>) tratada con ácido salicílico 2 mM sobre el contenido de lípidos en suero de ratas macho wistar obesas.....	58
Cuadro 18. Cuantificación de glucosa e insulina en suero de ratas obesas y determinación de HOMA-IR	60

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad es la acumulación anormal o excesiva de grasa, o hipertrofia general del tejido adiposo con anormal distribución corporal que puede ser perjudicial para la salud (OMS, 2012). En México se ha reportado una prevalencia de sobrepeso de 27.7 % en hombres y 38.6 % en mujeres en un rango de edad de 12 a 19 años y una prevalencia combinada de sobrepeso u obesidad en adultos de 20 años en adelante de 69.4 % en hombres y 75.6 % en mujeres (ENSANUT, 2016). La esteatosis hepática tiene una prevalencia aproximadamente del 80 % en personas obesas, esta patología se caracteriza por una acumulación de triglicéridos en el hígado, que conlleva a inflamación, fibrosis y cirrosis hepática, y puede culminar en la muerte del individuo, siendo las enfermedades hepáticas la causa de muerte número cuatro en nuestro país.

La intervención alimentaria es un medio muy recomendado para la prevención de estas alteraciones, dichas recomendaciones incluyen la suplementación con compuestos antioxidantes, ya que estos son clave en la reducción del riesgo del desarrollo de las patologías relacionadas con el estrés oxidativo y la obesidad. Actualmente, un grupo de bebidas, dentro de las que destacan las infusiones, se caracterizan por ejercer beneficios a la salud asociado a su carácter hipocalórico y a su contenido de fitoquímicos y micronutrientes (Rivera *et al.*, 2008).

En México, aproximadamente 80 % de la población consume infusiones (Guzmán, 2011). Entre las infusiones más consumidas se encuentran la de anís (*Pimpinella anisum*), canela (*Cinnamomum verum*), manzanilla (*Chamaemelum nobile*), menta (*Mentha*), hierbabuena (*Mentha piperita*), Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), té verde y negro (*Camellia sinensis*), limón (*Cymbopogon citratus*) y azahar (*Citrus aurantiifolia*) (ENGASTO, 2013).

Debido a lo anterior, ha surgido el interés por el desarrollo de bebidas, con mayor aporte nutricional y con potencial nutracéutico. En relación a esto, una de las estrategias que se han utilizado es el uso de nuevas tecnologías agrícolas, como la aplicación de elicitors, los cuales son compuestos químicos que actúan sobre la

respuesta inmune de las plantas y aumentan la activación de vías de biosíntesis de fitoquímicos, especialmente aquellos con potencial biológico (Edreva *et al.*, 2008).

Estudios previos demostraron que al tratar las plantas de hierbabuena (Mp) con AS, las propiedades nutracéuticas de sus infusiones mejoran (Figuroa-Pérez *et al.*, 2014). En dicho estudio se aplicó de manera foliar, en dos ocasiones, AS en plantas de hierbabuena (Mp), concluyendo que el tratamiento con AS aumenta los compuestos activos presentes en las plantas y la capacidad antioxidante de sus infusiones. De igual manera, las infusiones al 1 % de Mp tratada con AS, al ser consumidas por ratas macho Wistar inducidas con estreptozotocina, disminuyeron los niveles de glucosa y LDL en suero, asimismo los niveles de triglicéridos decrecieron tanto en suero como en hígado, además incrementaron los niveles de insulina y HDL en suero comparadas con un control sano (Figuroa-Pérez *et al.*, 2015).

El quitosano es otro de los compuestos altamente utilizados con el fin de proteger y aumentar la resistencia de plantas, así como, inducir y estimular la biosíntesis de compuestos bioactivos en las plantas (Velásquez, 2008; Vitalini *et al.*, 2014).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo de investigación fue determinar el efecto de las infusiones de plantas de hierbabuenas (Mp y Ms) inducidas con quitosano en concentraciones de 1.85, 3.96 y 7.93 μM y ácido salicílico 1.0 y 2.0 mM sobre la protección de esteatosis hepática no alcohólica en un modelo de obesidad.

2. ANTECEDENTES

2.1 Obesidad y sobrepeso

La obesidad y sobrepeso se definen como la acumulación excesiva de grasa o hipertrofia general del tejido adiposo, con anormal distribución corporal que limita las expectativas y la calidad de vida, siendo perjudicial para la salud, (OMS, 2012) ambas se acompañan de alteraciones metabólicas que incrementan el riesgo para desarrollar trastornos o enfermedades adicionales (NOM-008-SSA3-2010). La obesidad se origina por un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético, a consecuencia del cual el exceso de energía es transformado en triglicéridos y almacenado en los adipocitos, los cuales pueden aumentar en tamaño, en número o ambos (Manzur *et al.*, 2010).

2.1.1 Prevalencia de obesidad y sobrepeso en México

La obesidad y sobrepeso se han convertido en un problema de salud pública en México, la prevalencia combinada de obesidad y sobrepeso reportada por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino (ENSANUT MC) en 2016, para adultos de 20 años en adelante es de 75.6 % en el caso de las mujeres y 69.4 % para los hombres (Figura 1). La encuesta también reportó una prevalencia combinada de 27.7 % en hombres y 38.6 % en mujeres en un rango de edad de 12 a 19 años (Figura 2).

2.2 Fisiopatología de la obesidad

Los lípidos procedentes de la dieta, principalmente triglicéridos, al llegar al lumen intestinal son emulsificados en partículas sobre las cuales actúan las sales biliares, produciendo partículas de grasa más pequeñas y favoreciendo su digestión. Los triglicéridos son hidrolizados por la lipasa pancreática formando 2 ácidos grasos libres y monoacilglicerol (Sheridan, 1988). Al pasar a los enterocitos los productos de la hidrólisis se reesterifican hasta triglicéridos y son empaquetados en lipoproteínas, que transportan la grasa de la dieta, llamadas quilomicrones. Las lipoproteínas que transportan la grasa endógena son sintetizadas por los hepatocitos y se conocen

como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Gómez *et al.*, 2000). Los triglicéridos son transportados por dichas lipoproteínas a los tejidos extrahepáticos (muscular y adiposo) en donde son hidrolizados hasta ácidos grasos libres y monoglicéridos por la lipoproteinlipasa, localizada en los capilares endoteliales, con el fin de ser internalizados para su almacenamiento o suministro energético en los tejidos (Eckel, 1989).

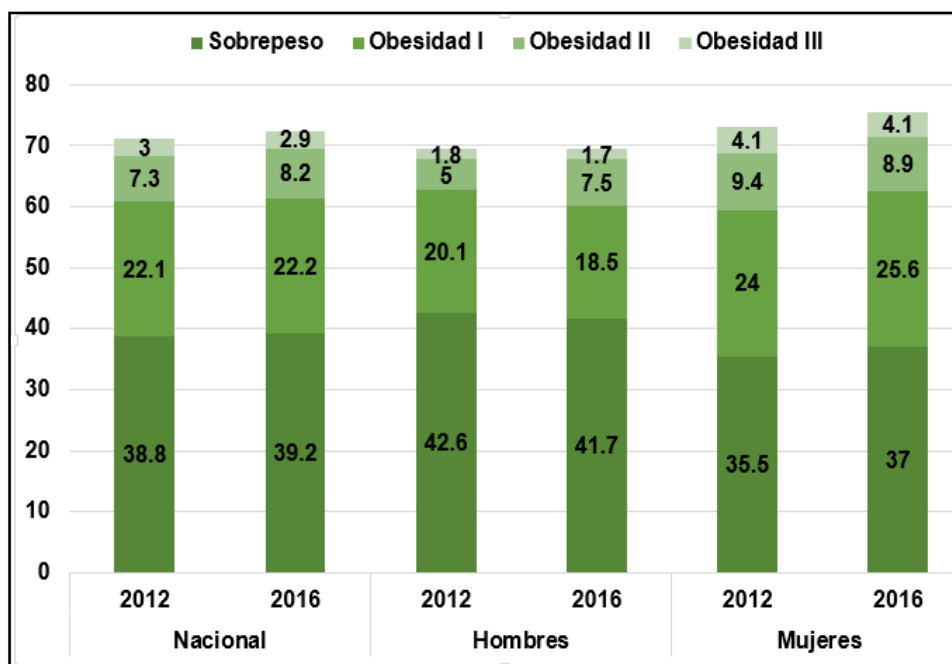


Figura 1. Prevalencia de sobrepeso y obesidad* de hombres y mujeres de 20 años o más. México, ENSANUT 2016. *Clasificación de IMC descrita por la OMS: sobrepeso = 25.0-29.9 kg/m², obesidad grado I = 30.0-34.9 kg/m², obesidad grado II = 35.0-39.9 kg/m², obesidad grado III ≥ 40.0 kg/m².

Durante los periodos de ingesta, los ácidos grasos libres provenientes de las lipoproteínas (quilomicrones y VLDL) son captados por los adipocitos a través de procesos de transporte activo mediado por proteínas transportadoras específicas de ácidos grasos. Una vez internalizados, los ácidos grasos son reesterificados para formar triglicéridos, por eso cuando la ingestión supera el gasto, se produce una acumulación excesiva de triglicéridos en el tejido adiposo (Langhans, 1996; Moreno-Aliaga y Martínez, 2002).

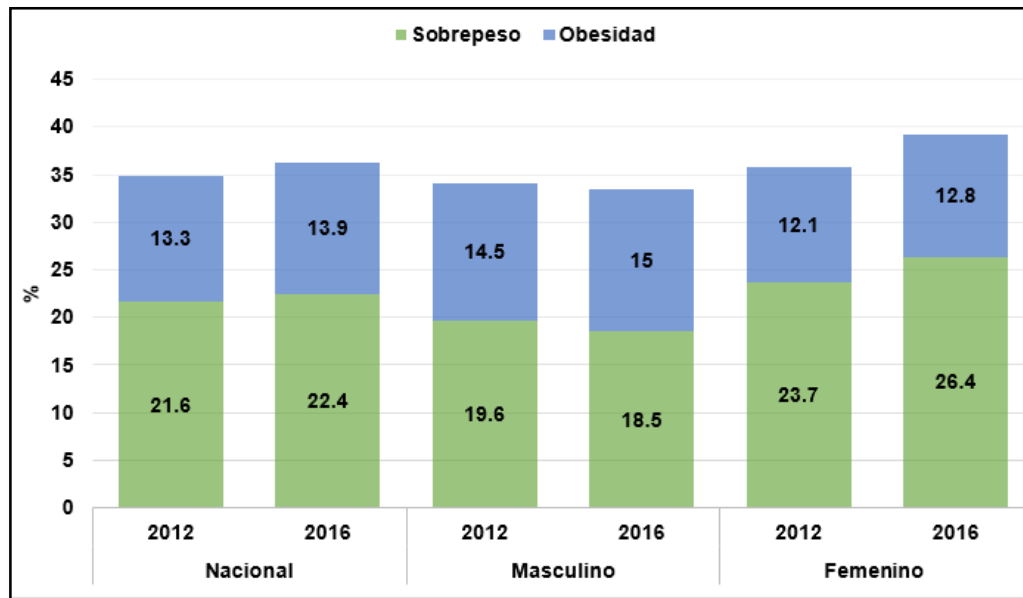


Figura 2. Prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población adolescente de 12 a 19 años de edad

2.2.1 Tejido adiposo e inflamación

La obesidad se considera un estado de inflamación crónica con una elevada concentración de marcadores de inflamación (Boque, 2014). El tejido adiposo juega un papel importante en este proceso inflamatorio y se caracteriza por generar una respuesta dinámica inmediata a las alteraciones por exceso de nutrientes (hiperfagia) a través de la hipertrofia (incremento de tamaño) y la hiperplasia (incremento de unidades) de los adipocitos (Halberg *et al.*, 2008), lo cual provoca la reducción del abastecimiento de sangre a los mismos, con el consecuente suministro inadecuado de oxígeno (hipoxia). La hipoxia en el tejido adiposo promueve que los monocitos atraviesen las paredes intactas de los capilares por respuesta a la acción inflamatoria, dada por el exceso de adipocitos, estimulando la acumulación de macrófagos, lo cual conlleva la sobreproducción de factores proinflamatorios, tales como diversas adipocinas (Figura 3) (Wang y Nakayama, 2010); de esta manera se forma un círculo inflamatorio, atrayendo más macrófagos proinflamatorios al tejido adiposo y conduciendo a un estrés oxidativo (Boque, 2014).

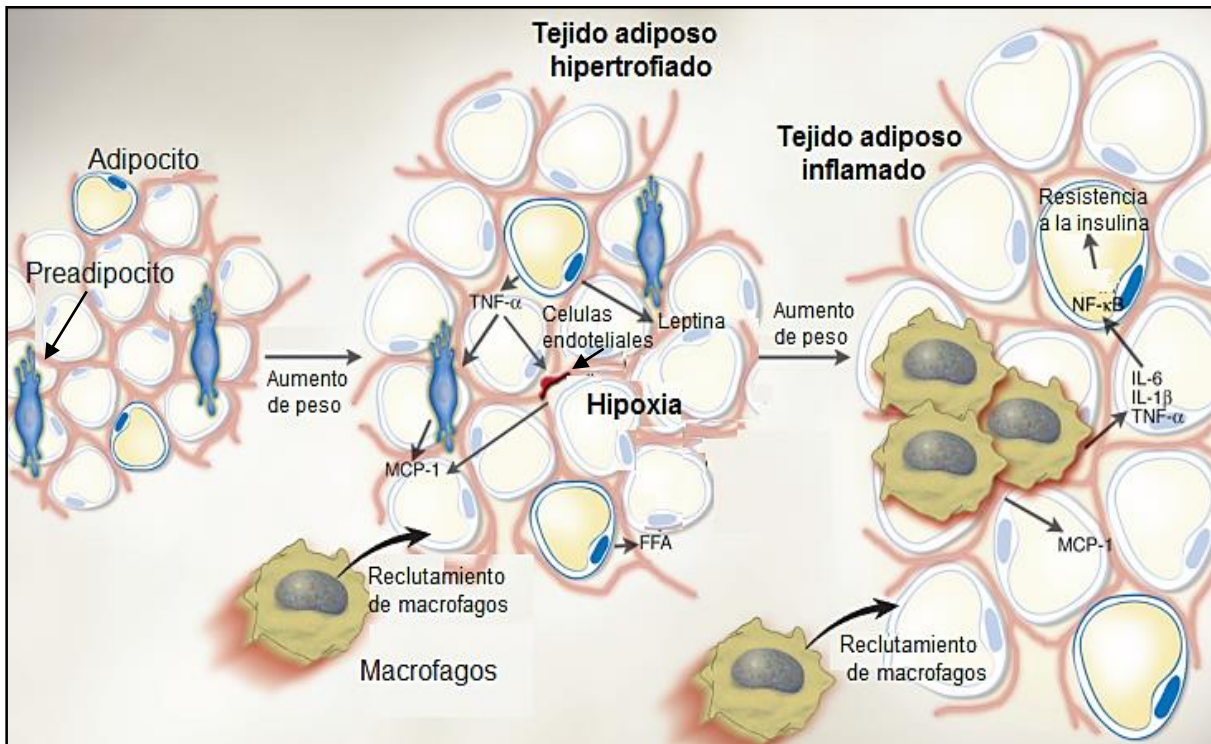


Figura 3. Representación esquemática del proceso de inflamación crónica. TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa, IL: Interleucinas, FFA: Ácidos grasos libres, MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos-1 (Modificado de Wellen y Hotamisligil 2003).

2.3 Esteatosis hepática

La esteatosis hepática es una enfermedad en la cual se presenta una acumulación excesiva de lípidos en el tejido hepático. Se caracteriza por la presencia de resistencia hepática a la insulina, lo que puede progresar a inflamación hepática (esteatohepatitis), apoptosis, necrosis y puede culminar con fibrosis o cirrosis (Browning *et al.*, 2004).

La esteatosis hepática se caracteriza por el desbalance entre la acumulación y catabolismo de los lípidos en el tejido hepático (Figura 4). Los lípidos acumulados en hígado provienen de la dieta y de la lipólisis de triglicéridos en el tejido adiposo. Asimismo, el consumo excesivo de fructosa promueve la síntesis de novo de ácidos grasos vía la activación de la proteína de unión al elemento de respuesta de esteroides (SREBP), la cual promueve la expresión de enzimas lipogénicas, tales como la sintasa de ácidos grasos (FAS), la acil-CoA carboxilasa (ACC) y la esteroil-

CoA desaturasa (SCD). Por otro lado, el catabolismo de los ácidos grasos (AG) vía β -oxidación se encuentra disminuido, debido a la inhibición de la expresión y/o actividad de la Carnitina palmitoil-CoA transferasa-1 (CPT1) y la acil-CoA deshidrogenasa (ACOX), enzimas claves de esta vía metabólica.

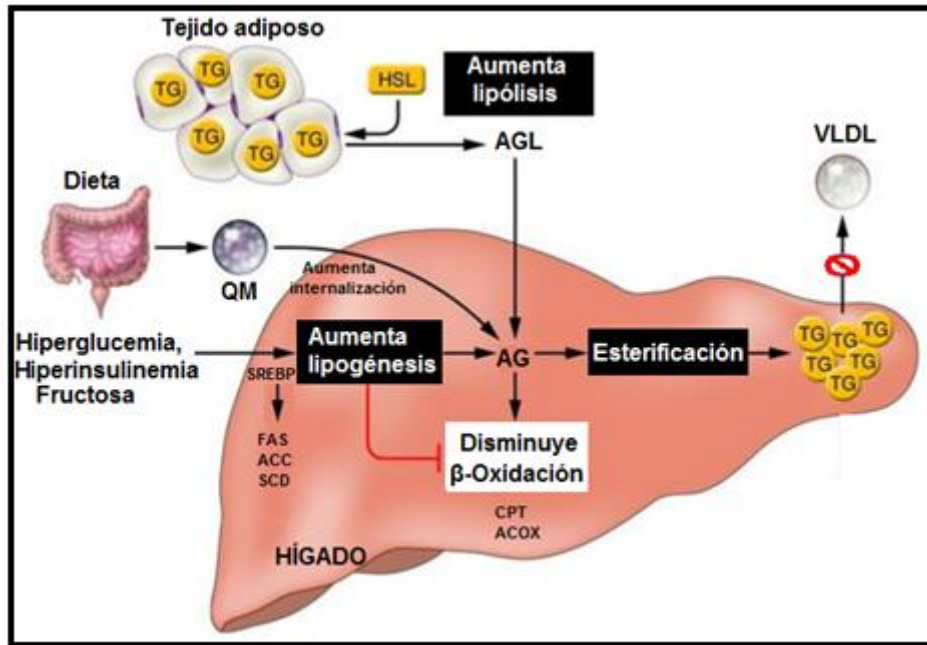


Figura 4. Mecanismos involucrados en el desarrollo de esteatosis hepática asociada a la obesidad. TAG: triacilglicéridos, QM: quilomicrosoma, HSL: lipasa sensible a la hormona, AGL: ácidos grasos libres, VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad, CPT: carnitina-palmitoil transferasa, ACOX: acil-CoA deshidrogenasa, SREBP: proteína de unión al elemento de respuesta de esteroides, FAS: sintasa de ácidos grasos, ACC: acetil-CoA carboxilasa, SCD: esteroil-CoA desaturasa (Savage y Semple, 2010; Fabbrini y Magkos, 2015).

Asimismo, la excreción al torrente sanguíneo de triglicéridos en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) se encuentra disminuida (Savage y Semple, 2010; Fabbrini y Magkos, 2015).

La alteración que se encuentra con mayor frecuencia en pacientes con daño hepático es la elevación de los niveles de transaminasas, en un rango de 2 a 3 veces su valor normal y con un nivel mayor de alanina aminotransferasa (ALT) que de aspartato aminotransferasa (AST) (Roesch-Dietlen *et al.*, 2006).

2.4 Causas de la obesidad en México

La principal causa de la obesidad es la adopción de malos hábitos alimenticios, entre los cuales se incluyen el consumo de bebidas, ya que éstas aportan la cuarta parte de energía del consumo total de los alimentos, tanto en adolescentes como en adultos. La cantidad de calorías de los líquidos, que proceden particularmente de bebidas azucaradas (jugos, refrescos, leche entera y alcohol), se adiciona a la energía proveniente de los alimentos de la dieta y contribuye al consumo excesivo de energía vinculado con la obesidad (Rivera *et al.*, 2008). En la Figura 5 se observan las tendencias de consumo de bebidas y el aporte calórico de estas en México en 2006.

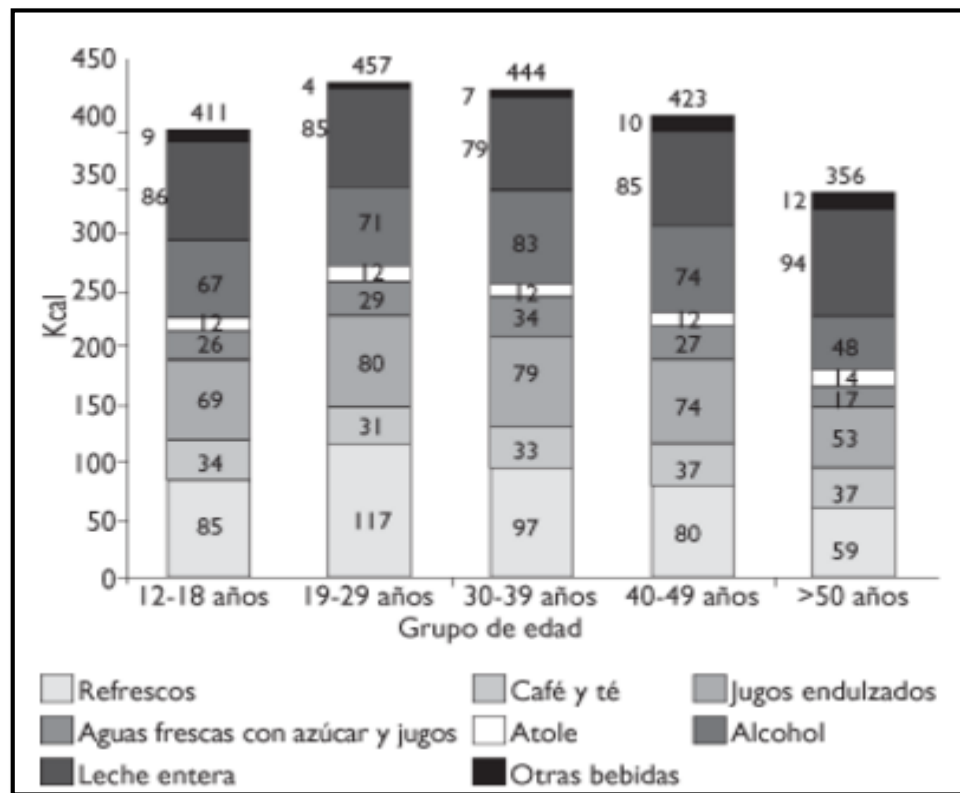


Figura 5. Consumo calórico diario proveniente de bebidas en adolescentes y adultos, por grupo de edad, en 2006 (Rivera *et al.*, 2008).

Las bebidas con mayor aporte energético son los refrescos, leche entera y jugos endulzados, siendo el grupo de 10 a 29 años el mayor consumidor de bebidas endulzada. Con base en estos resultados, se recomienda que el consumo de bebidas no deberá exceder el 10 % de energía diaria (Rivera *et al.*, 2008).

Las bebidas con elevada concentración de azúcar contienen, principalmente, endulzantes como la fructosa, cuyo consumo constante conlleva a la ganancia de peso corporal, esta es consecuencia de la falta de saciedad al consumir este tipo de productos, siendo que el consumo de un producto rico en azúcares (500 mL) al día puede conllevar a la ganancia de 5.5 kg en un año (Stanhope *et al.*, 2009; Hu, 2010).

2.5 Implicaciones terapéuticas

La protección contra alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad, como la esteatosis, puede llevarse a cabo por medio de la prevención y/o control del sobrepeso u obesidad, a través de tratamientos farmacológicos y/o ajustes en los hábitos de los individuos, siendo la intervención alimentaria el medio más recomendado (SSA, 2008). Dichas recomendaciones incluyen la suplementación de la alimentación con compuestos antioxidantes, tales como las vitaminas A, C y E, los flavonoides y los ácidos fenólicos, entre otros, ya que estos compuestos parecen ser claves en la reducción del riesgo del desarrollo de las patologías relacionadas al estrés oxidativo y obesidad (Rivera *et al.*, 2008).

Se han propuesto diversas recomendaciones con el objetivo de promover un mejor estado nutricional. Dentro de dichas recomendaciones destaca el consumo de infusiones o extractos herbales, debido a su carácter hipocalórico y al efecto benéfico para la salud asociado con su contenido de fitoquímicos y micronutrientes, características que las definen como bebidas hipocalóricas funcionales (Rivera *et al.*, 2008).

2.6 Infusiones y bebidas funcionales

Una dieta saludable no requiere de bebidas endulzadas para satisfacer las necesidades de energía y nutrientes pues el agua potable puede satisfacer todos los requerimiento corporales de líquidos. Sin embargo, para permitir cierta variedad en

los alimentos y por preferencias individuales, una dieta saludable puede incluir diversos tipos de bebidas, como lo son las bebidas funcionales, las cuales se consideran como el mayor número de lanzamientos de bebidas a nivel mundial, siendo por lo tanto una de las áreas de mayor crecimiento en la industria alimentaria (Rivera *et al.*, 2008).

Dentro de este grupo se encuentran las infusiones que se definen como bebidas preparadas con agua a punto de hervir a la cual se le agregan hojas secas, partes de flores o hierbas aromáticas. Los beneficios antioxidantes de las infusiones se deben a sus componentes, como lo son los polifenoles, que pueden actuar como atrapadores de especies reactivas de oxígeno (Murillo, 2010).

Por herencia cultural y globalización la ingesta de infusiones es popular, el 80% de la población mexicana consume bebidas preparadas con frutas y hojas secas (Guzmán, 2011). El té verde es la infusión más estudiada hasta el momento, presenta importantes beneficios para la salud, ya que disminuye el riesgo de enfermedades relacionadas con inflamación como lo es la obesidad. Sin embargo, para la población mexicana, el consumo de té verde es poco común, ya que el mayor porcentaje de la población consume infusiones de hierbas locales. Por ello se requieren estudios que demuestren los posibles beneficios de estas hierbas para prevenir enfermedades relacionadas con inflamación, y de esta manera, contribuir con bases científicas en la disminución del riesgo de enfermedades crónico degenerativas (O'Hara *et al.*, 1998).

En el Cuadro 1 se muestran las infusiones más consumidas en México según la Encuesta Nacional de Gasto de los Hogares (ENGASTO 2013). La infusión de hierbabuena (*Mentha piperita*) en presentación de bolsa para té es una de las más populares por su bajo costo y los beneficios a la salud que se le atribuyen (Profeco, 2008). Las bebidas a base de infusiones listas para beber, tales como los tés helados altamente comercializados en nuestro país, adicionados con sabores naturales, minerales y bajos en azúcar, son actualmente la forma de consumo más popular de las infusiones por su practicidad (Hurtado *et al.*, 2012).

Cuadro 1. Infusiones más consumidas en México según la Encuesta Nacional de Gastos de los Hogares, 2013

Infusiones más consumidas en México	Sabores
Nombre común	Nombre científico
Anís	(<i>Pimpinella anisum</i>)
Canela	(<i>Cinnamomum verum</i>)
Manzanilla	(<i>Chamaemelum nobile</i>)
Menta	(<i>Mentha</i>)
Hierbabuena	(<i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i>)
Jamaica	(<i>Hibiscus sabdariffa</i>)
Té verde y negro	(<i>Camellia sinensis</i>)
Azahar	(<i>Citrus aurantiifolia</i>)
Limóm	(<i>Cymbopogo citratus</i>)

2.7 Hierbabuena

La hierbabuena, mostrada en la Figura 6, es una hierba nativa de Europa, naturalizada en el norte de Estados Unidos y Canadá, y cultivada en muchas partes del mundo. La cual es consumida de manera muy común como infusión debido a su bajo costo, fácil acceso, uso tradicional y sobre todo por los efectos benéficos para la salud que se le atribuyen (como antiinflamatorio, antiséptico, digestivo y antioxidante) (McKay y Blumberg, 2006).



Figura 6. Hierbabuena (*Mentha piperita*)

En el Cuadro 2 se muestran estudios previos de la actividad biológica de las hierbabuenas (Mp y Ms). En un estudio realizado por Maliakal y Wanwimolruk (2001) se evaluó el efecto protector de las infusiones de hierbabuena (Mp) sobre la función hepática, dicho estudio se llevó a cabo en ratas Wistar sanas, demostrando que al

igual que el té verde y negro, las infusiones de hierbabuena modulan positivamente las enzimas de la fase I y fase II, las cuales metabolizan fármacos.

Cuadro 2. Estudios previos de la actividad biológica de la hierbabuena

Tratamiento	Modelo de estudio	Resultados y conclusiones	Referencia
Infusiones de <i>mentha piperita</i> al 2% <i>ad libitum</i> durante 4 semanas	Ratas hembra wistar sanas	1. Efecto protector en hígado 2. Al igual que el té verde y negro, ciertos tés de hierbas tienen efecto protector del hígado	Maliaka y Wanwimolruk (2001)
Jugo de hojas licuadas de <i>Mentha piperita</i>	Ratas Wistar diabéticas inducidas con streptozotocina	1. Disminuye colesterol, triglicéridos, LDL-c y glucosa. Aumento de HDL-c todo esto en plasma 2. No diferencia en peso corporal ni consumo de alimentos 3. Se lo atribuye a los compuestos fenólicos	Barbalho <i>et al.</i> (2011a)
Jugo de hojas licuadas de <i>Mentha piperita</i> 20 g de hojas/200 mL de agua (dos tomas diarias)	Estudiantes entre 18 y 45 años de edad	1. Disminuye colesterol total y glicemia, triglicéridos y LDL-c. Aumenta HDL-c todo esto en plasma 2. Disminuye IMC 3. El uso de <i>Mentha piperita</i> en humanos puede ser considerado benéfico en la prevención y tratamiento de factores de riesgo de enfermedades crónico degenerativas 4. Se lo atribuye a los compuestos fenólicos	Barbalho <i>et al.</i> (2011b)
Extractos acuosos de <i>Mentha piperita</i> en dosis diaria de 100mg/Kg durante tres semanas	Ratas macho Sprague Dawley alimentadas con una dieta alta en fructosa	1. Disminución de peso corporal , triglicéridos de LDL, VLDL, glucosa, también aumentó los niveles de HDL 2. Se lo atribuye a los compuestos fenólicos	Mani Badal <i>et al.</i> (2011)
Infusiones de hierbabuena comerciales de <i>Mentha spicata</i>	Ratas macho Sprague Dawley alimenadas con dieta alta en grasa y fructosa	1. Disminución de triglicéridos	Lomelí de la Rosa (2011)
Infusiones de hierbabuena <i>Mentha piperita</i> al 1%	Ratas macho Wistar diabéticas inducidas con streptozotocina	1. Disminuye glucosa y triglicéridos en suero 2. Disminuye el daño hepático	Figuroa-Pérez <i>et al.</i> (2015)

De igual manera, se han reportados estudios tanto en ratas Wistar diabéticas inducidas con streptozotocina, como intervenciones clínicas en humanos, que demostraron que el consumo de jugo (extraído en la molienda de las hojas de Mp con agua) disminuye colesterol, triglicéridos, glucosa y LDL, y aumenta HDL en plasma, por lo anterior se concluyó que la hierbabuena tiene efectos benéficos sobre el perfil lipídico y glucémico (Barbalho *et al.*, 2011a; Barbalho-B *et al.*, 2011b). De igual manera se evaluó el efecto de infusiones comerciales de Ms en un modelo de obesidad, demostrando una disminución de triglicéridos en suero (Lomelí, 2011).

Los beneficios biológicos de las hierbabuenas (Mp y Ms), mencionados anteriormente, se atribuyen a los componentes químicos presentes en estas plantas, los cuales varían según la madurez de la planta, la región geográfica en la cual fue sembrada y las condiciones de su procesamiento (Xu *et al.*, 2011). El contenido total de polifenoles en las hojas de las plantas de hierbabuena es aproximadamente 19-23% (12% son flavonoides totales), los cuales incluyen 59-67% eriocitrina y ácido rosmarínico, 7-12% luteolina 7-O-rutinósido, 6-10% hesperidina. En la Figura 7 se observan las estructuras de los principales compuestos presentes en la hierbabuena (Mp).

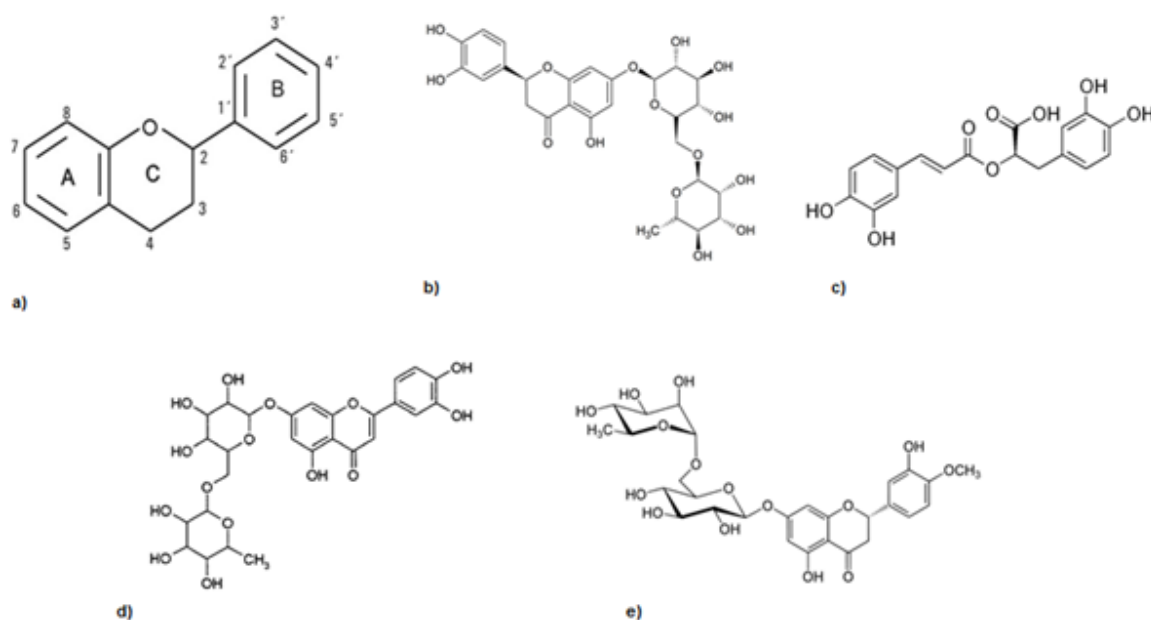


Figura 7. Estructura de los compuestos mayoritarios de la hierbabuena (*Mentha piperita*); estructura general de flavonoides (a) a los cuales pertenecen eriocitrina (b), luteolina 7-O-rutinósido (d) y hesperidina (e). Ácido fenólico, ácido rosmarínico (c).

También se han cuantificado cantidades pequeñas de 5,6-hidroxi-7,8,32,42-tetrametoxiflavona, pebrellina, gardenina B y apigenina. Alrededor del 75% del contenido de compuestos fenólicos presentes en las hojas de hierbabuena son extraídos en las infusiones (Areias *et al.*, 2001; Zheng y Wang, 2001).

El ácido rosmarínico tiene actividad antioxidante y antiinflamatoria, las cuales se relacionan con la inhibición de la lipoxigenasas y la ciclooxigenasas, enzimas relacionadas con eventos inflamatorios (Parnham y Kesselring, 1985).

Según estudios realizados en ratones obesos inducidos con dieta alta en grasas que contenía 45% de calorías derivadas de los lípidos, durante cuatro semanas, la hesperidina y la eriocitrina son capaces de disminuir de manera eficiente la inflamación inducida por la obesidad y el alto consumo de alimentos hiperlipidémicos. Se reportó que la hesperidina, y la eriocitrina protegen contra la inflamación y el estrés oxidativo causado por el consumo de la dieta alta en grasas y acumulación de grasa visceral, tal como se indicó por la reducción de los marcadores inflamatorios, peroxidación lipídica, la esteatosis y daños en el riñón, y el peso del bazo y el corazón (Ferreira, 2014).

Se ha sugerido que la acción antiinflamatoria de la hesperidina, actúa mediante la inhibición de la síntesis y de la actividad biológica de diversos mediadores inflamatorios, tales como IL-10 y TNF- α , la modulación de la actividad de la enzima de formación de óxido nítrico y de las vías inflamatorias, como la fosfolipasa A2, la lipoxigenasa y la ciclooxigenasa (Benavente-García y Castillo, 2008; Coutinho *et al.*, 2009).

2.8 Mecanismos de defensa de plantas

Cuando las plantas están bajo el ataque de agentes bióticos (hongos, bacterias, plantas competitivas, insectos, fauna local e inductores químicos) o abióticos (climáticos, geológicos o geográficos) producen metabolitos secundarios, esto principalmente en plantas que se encuentran al aire libre, ya que en invernadero las condiciones son controladas. Existe un grupo de estos compuestos que se acumulan en tejidos específicos de plantas sanas, independientemente de la presencia de estos agentes, y se conocen como fitoanticipinas, siendo parte de la

defensa constitutiva de las plantas, entre ellos se encuentran las saponinas, los alcaloides y los flavonoides (Ferrari, 2010).

Cuando una planta es expuesta a alguno de los agentes bióticos, se somete a una reprogramación metabólica, lo que lleva a la acumulación, en el sitio de ataque, de altos niveles de compuestos antimicrobianos, generalmente tóxicos. Estos compuestos son conocidos generalmente como fitoalexinas e incluyen una amplia gama de especies químicas, tales como los derivados de fenilpropanoides simples, flavonoides y otros compuestos fenólicos. La gran mayoría de estos metabolitos secundarios son de interés para la salud humana y la nutrición (Ferrari, 2010).

Por lo general una planta muestra la acumulación de altos niveles de especies reactivas del oxígeno (ERO), ya sea como resultado de la actividad de plagas, o como un mecanismo de defensa para restringir patógenos o insectos. Como consecuencia, se propicia la producción de moléculas de antioxidantes, con el objetivo de restringir el daño causado por ERO. Estas moléculas antioxidantes también son de interés tecnológico, ya que puede utilizarse como medicamentos o como aditivos alimentarios. Debido a lo anterior, la investigación biotecnológica básica y aplicada de plantas se ha destinado a identificar los inductores químicos (también llamados “elicitores”) más eficaces de metabolitos de interés y los mecanismos moleculares y bioquímicos subyacente a esta inducción, y también sugiere nuevas estrategias para explotar este conocimiento con el fin de obtener tales compuestos a escala industrial (Ferrari, 2010).

2.9 Elicitores

Se conocen como inductores químicos o “elicitores” a ciertos compuestos que tienen la capacidad de estimular algún tipo de defensa en las plantas. Existen elicitores endógenos, que son sintetizados por la misma planta en respuesta al ataque de patógenos. De igual manera existen elicitores exógenos, que se aplican de manera externa para inducir algún efecto (Edreva *et al.*, 2008). Estos últimos pueden ser agentes abióticos, tales como iones metálicos o compuestos inorgánicos, o se pueden derivar de otros organismos, tales como moléculas derivadas de los hongos, bacterias, virus o herbívoros, así como productos químicos derivados de plantas que

se liberan en el sitio de ataque (Ferrari, 2010). Generalmente, su presencia en la planta desencadena mecanismos que implican la producción de ERO, la expresión de enzimas antioxidantes y la síntesis de metabolitos secundarios de defensa, como los polifenoles (Edreva *et al.*, 2008).

Los elicitores exógenos bióticos son combinaciones complejas de productos químicos. Una de las principales categorías de estos compuestos identificados con bioactividad comprende a los poli- u oligosacáridos tales como la quitina, el quitosano (obtenido después de la de-acetilación de quitina) y sus fragmentos (quitooligosacáridos), derivados de hongos y paredes de células de insectos, entre otros (Ferrari, 2010).

2.9.1 Quitosano

El quitosano es utilizado para la protección, inducción de resistencia y crecimiento (raíces, retoños y hojas) de las plantas (Velásquez, 2008). El quitosano es eficaz en la estimulación de la biosíntesis de fitoquímicos bioactivos, ya que se ha mostrado que induce reacciones de defensa en algunas plantas (Pearce y Ride, 1982; Vitalini *et al.*, 2014). Se ha sugerido que este compuesto podría actuar sobre las enzimas fenilalanina amonio-liasa (PAL) y la tirosina amonio-liasa (TAL), enzimas clave de la ruta de los fenilpropanoides (Figura 8), ya que estas son inducibles en respuesta a estreses bióticos (Katiyar *et al.*, 2015). Los factores importantes a considerar para el uso del quitosano como elicitador incluyen: el peso molecular, la fuente de extracción y el grado de acetilación (Velásquez, 2008). El quitosano proveniente de hongos requiere dosis menores para la diferenciación de plantas de orquídeas, comparado con los oligómeros procedentes de caparzones de camarones (Nge *et al.*, 2006), la acetilación es importante debido a que el quitosano completamente desacetilado no induce respuesta defensiva en la mayoría de los sistemas donde ha sido probado; los resultados con quitosano parcialmente acetilado son muchas veces dependientes del sistema estudiado, pero en general este actúa como excelente inductor de defensa (Lee *et al.*, 1999).

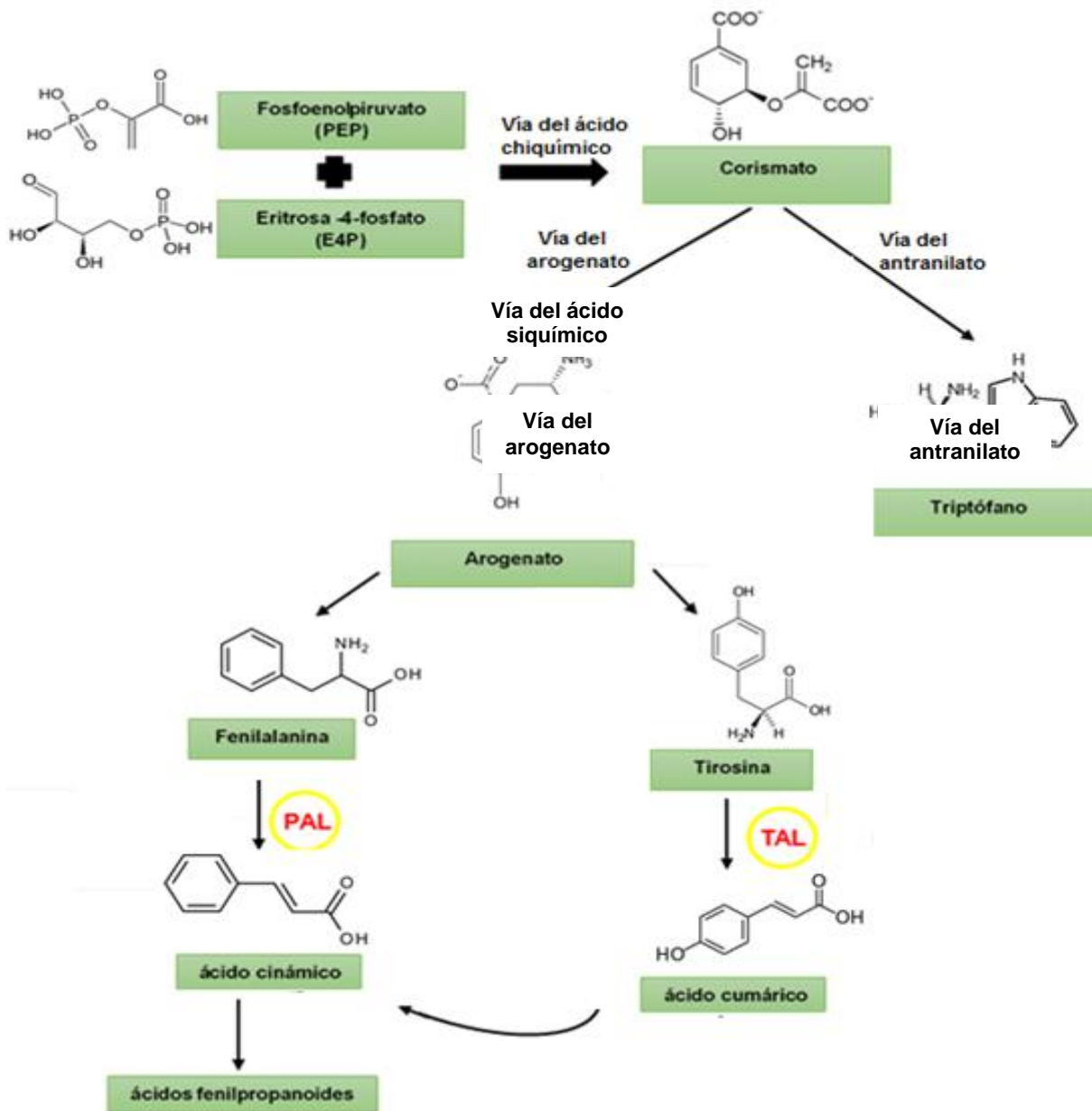


Figura 8. Vía de fenilpropanoides. PEP y E4P son metabolitos primarios que mediante la vía del ácido siquímico llevan a la biosíntesis de corismato, precursor común para los aminoácidos aromáticos que preceden a la síntesis de ácidos fenilpropanoides (Modificado de Ferrari, 2010).

En el Cuadro 3 se presenta un resumen del uso de quitosano como elicitador, sus efectos en la producción de metabolitos secundarios y las posibles vías que activa para la producción de éstos. En un estudio realizado por Chang y colaboradores (1998) se trató un cultivo en suspensión de células de *Mp* con quitosano para evaluar su efecto sobre la producción de mentol. En dicho estudio se

mostró un incremento en la producción de mentol y no se observó inhibición en el crecimiento de las células.

Cortes de tallos de soja y frutos de fresa se sumergieron en una solución de quitosano y se observó un aumento de los fenoles totales, este efecto estuvo relacionado con un incremento de la actividad de las enzimas PAL y TAL (Khan *et al.*, 2003; Landi *et al.*, 2014). También se concluyó que la elevación de la actividad enzimática depende de la longitud de la cadena de los oligómeros y el tiempo después del tratamiento (Khan *et al.*, 2003).

Cuadro 3. Uso de quitosano como inductor

Referencia	Modelo de estudio	Tratamiento	Resultados	Conclusiones
Chang <i>et al.</i> , 1998	Cultivo de células de <i>Mentha piperita</i>	Se agregaron soluciones de quitosano en concentraciones de 50 a 300 mg/L a la línea celular.	Las condiciones óptimas para la producción de mentol fueron a la concentración de 200 mg de quitosano/L y a los 12 días. No se vio inhibición en el crecimiento de las células.	
Khan <i>et al.</i> , 2003	Hojas de soja	Aproximadamente a las 2 semanas de edad. Se hicieron cortes del tallo y se sumergieron en solución que contenía quitosano.	Aumento fenoles totales Aumenta la actividad de las enzimas PAL y TAL.	La elevación de la actividad enzimática depende de la longitud de la cadena de los oligómeros y el tiempo después del tratamiento
Landi <i>et al.</i> , 2014	Frutos de fresa	Se sumergieron los frutos de fresa en solución de quitosano por 30 s y posteriormente se dejaron secar para realizar las pruebas.	Promueve la expresión de genes de la ruta de fenilpropanoides, clave para la síntesis de los flavonoides.	Existe una relación entre la composición del inductor y el patrón específico de genes de defensa inducidos

2.9.2 Ácido salicílico

El ácido salicílico (ácido orto-hidroxibenzoico) es un compuesto fenólico endógeno de las plantas, este puede considerarse como un derivado de ácido cinámico. Por otro lado, si es aplicado de forma exógena tiene efecto sobre las resistencias adquirida de las plantas, induce resistencia a patógenos, activa la producción de proteínas relacionadas a la patogénesis y desempeña un papel clave en la regulación del crecimiento (Raskin, 1992; Kang y Guo, 2014). Se ha propuesto

un mecanismo por el cual el ácido salicílico activa la tolerancia al estrés abiótico mediante la interacción con nutrientes minerales, la señalización de ROS y la modulación de antioxidantes (Figura 9). El ácido salicílico puede estar involucrado en la regulación de la absorción de varios elementos benéficos para la planta como Mn, Ca, Cu, Fe, P, y Zn (Wang *et al*, 2011).

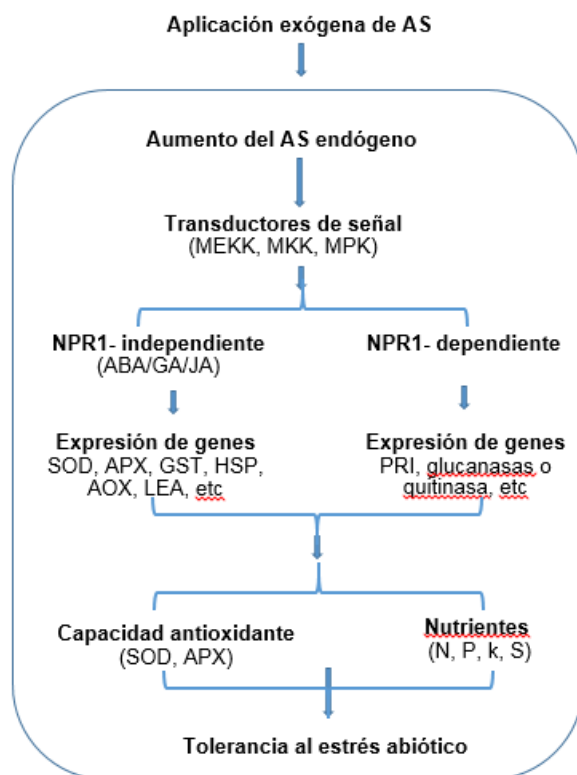


Figura 9. Modelo esquemático del AS sobre la inducción de la tolerancia a estrés abiótico en plantas superiores. AOX; oxidasa alternativa, APX; ascorbato peroxidasa, GST GSH-S-transferasa, HSP; proteína de choque térmico, LEA proteína abundante de embriogénesis tardía, MEKK MAP; proteína quinasa quinasa (activado por mitógenos), MKK MAP; quinasa quinasa, MPK MAP; Quinasa, NPR1; no expresor de PR1, PR1; proteína 1 relacionada con la patogénesis, SOD superóxido dismutasa (Kang y Guo., 2014).

Además el AS endógeno y exógeno tiene un papel importante en el metabolismo antioxidante y tienen un control sobre las ROS celulares (Kang y Guo 2014). La coordinación de la señalización independiente y dependiente de AS con junto con la señalización de ROS proporciona una respuesta de defensa en la planta. En conjunto a esto, la aplicación exógena de ácido salicílico ha demostrado el

aumento de importantes compuestos como los compuestos fenólicos, alcaloides y antocianinas (Khan *et al.*, 2015).

2.10 Hierbabuena sometida a diferentes factores de estrés

Estudios muestran que las concentraciones de los compuestos bioactivos de la hierbabuena (Mp) mejoran al ser sometida a estrés tanto biótico como abiótico. Experimentos realizados previamente en nuestro laboratorio han mostrado que al someter a la planta de hierbabuena a un estrés por déficit de humedad (específicamente a 25%) cultivada a cielo abierto, se induce en ella un incremento considerable en el contenido de fenoles totales y flavonoides.

También se han realizado experimentos con hierbabuena, cultivada en invernadero, sometida a estrés con elicitores, como fue reportado por Figueroa-Pérez y colaboradores (2014). En dicho estudio se aplicó de manera foliar ácido salicílico (AS) en plantas de Mp concluyendo que al tratarlas con AS 1 mM mejora el perfil de compuestos fenólicos (Cuadro 4) y en un estudio posterior se comprueba que la aplicación de ácido salicílico también aumenta la concentración de saponinas y alcaloides (Cuadro 5). De igual manera, se determinó la capacidad antioxidante de sus infusiones por ensayos de DPPH y ABTS. Las infusiones de hojas de hierbabuena tratadas con AS presentaron una mayor actividad antioxidante en comparación con el control en ambos ensayos; las concentraciones de 1 mM y 0.5 mM presentan los efectos más significativos, la reducción de los valores de IC50 fueron 44 y 35% para ABTS y 88 y 78% de DPPH, respectivamente. Estos efectos podrían atribuirse al aumento de los compuestos fenólicos en las plantas tratadas con AS. Los compuestos fenólicos se consideran los principales compuestos antioxidantes en la infusión.

En un estudio realizado por Figueroa-Pérez y colaboradores (2015) se evaluó la actividad biológica de la hierbabuena cultivada en invernadero, tratada con AS, para ello se administró durante cuatro semanas infusiones de Mp tratada con AS 2 mM, a ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina con una dieta alta en grasas, dicho tratamiento disminuyó los niveles de glucosa en suero (hasta 25%) y aumento los niveles de insulina en suero (hasta 75%) en comparación con el control

diabético. Esto puede estar relacionado con la protección observada en células β -pancreáticas. Además, las infusiones de hierbabuena tratadas con AS 0.5 mM y 2 mM disminuyeron LDL (24 y 47%, respectivamente) y aumentaron los niveles de HDL (18 y 37%, respectivamente). Mientras, todos animales tratados con infusiones de hierbabuena tenían menor contenido de triglicéridos hepáticos y en suero, donde la infusión de hierbabuena tratada con SA 2 mM mostró el efecto más alto. Dicho estudio sugiere que esto es probablemente causado por la alta capacidad de inhibición de lipasa pancreática que presentó la infusión tratada con AS 2 mM. Por lo tanto, el tratar con AS 2 mM las plantas de hierbabuena (Mp) durante el cultivo de se considera una buena alternativa para mejorar las propiedades antidiabéticas de sus infusiones.

También se encontró, en estudios previos del laboratorio, que la aplicación foliar de quitosano y ácido salicílico a plantas de hierbabuena (Ms) incrementa la concentración de compuestos fenólicos y flavonoides contenidos en sus infusiones, principalmente hesperidina y ácido rosmarínico. Los mejores tratamientos de quitosano fueron las concentraciones 1.6 y 3.2 μ M en el día 14, ya que al tratar las plantas con quitosano en dichas concentraciones las infusiones resultantes muestran un mejor perfil de compuestos fenólicos. De igual manera, se realizó el perfil de fitoesteroles, el cual mostró que el tratamiento con quitosano 0.8 μ M en el día 14 fue el que mostró un mejor perfil de estos compuestos.

Por todo lo anterior, en el presente proyecto se decidió trabajar con Q en concentraciones de 0.8, 1.6 y 3.2 μ M y AS 1.0 y 2.0 mM.

Cuadro 4. Concentración de compuestos fenólicos identificados en infusiones preparadas a partir de hojas de hierbabuena cultivada en invernadero (*Mentha piperita*) tratada con ácido salicílico.

	Control	SA 0.5 mM	SA 1 mM	SA 2 mM	LOD (µg/ml)
Total phenolic content	29.42 ± 0.8 ^c	48.63 ± 1.8 ^a	39.82 ± 1.2 ^b	38.75 ± 3.2 ^b	-
Flavonoid content	8.60 ± 0.3 ^c	16.62 ± 0.9 ^a	17.87 ± 1.1 ^a	13.49 ± 0.7 ^b	-
Caffeic	1.04 ± 0.0 ^a	1.06 ± 0.1 ^a	0.69 ± 0.2 ^a	0.66 ± 0.0 ^a	0.41
Coumaric	0.74 ± 0.0 ^{bc}	1.27 ± 0.0 ^a	0.65 ± 0.0 ^c	0.76 ± 0.0 ^b	0.24
Sinapic	LLD	0.23 ± 0.1	LLD	LLD	
Rosmarinic	68.10 ± 0.2 ^c	94.35 ± 0.6 ^b	112.74 ± 0.2 ^a	91.94 ± 6.4 ^b	0.65
Gallocatechin-gallate	2.38 ± 0.1 ^d	8.89 ± 0.1 ^a	5.21 ± 0.3 ^b	4.45 ± 0.9 ^c	1.1
Rutin	LLD	LLD	3.85 ± 0.1	LLD	2.9
Quercetin	2.28 ± 0.1 ^c	5.07 ± 0.1 ^a	3.78 ± 0.1 ^{ab}	3.01 ± 0.6 ^{bc}	1.5
Naringin	LLD	50.62 ± 1.5 ^a	6.91 ± 0.9 ^b	6.36 ± 2.7 ^b	0.68
Hesperidin	32.30 ± 0.3 ^c	48.40 ± 0.3 ^c	79.44 ± 0.2 ^a	61.49 ± 0.4 ^b	1.7

Los resultados se expresan como µg de compuesto por mL de infusión de menta y son la media de tres determinaciones independientes ± ES. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativa para cada compuesto ($\alpha=0.05$, prueba de Tukey). LLD: límite inferior de detección. LDD: Límite de detección (Figuroa-Pérez *et al.*, 2014).

Cuadro 5. Concentración de saponinas identificadas en infusiones preparadas a partir de hojas de hierbabuena (*Mentha piperita*) tratada con ácido salicílico.

Proposed compounds	Retention time (min)	[M – H]	Areas (mA)		
			Control	SA 0.5 mM	SA 2.0 mM
<i>Saponins</i>					
Phytolaccagenic acid 3β-galactopyranoside	71.6	1001	5.4 ± 0.4 ^a	2.8 ± 0.3 ^b	LDL
Phytolaccagenic acid 3β-arabinopyranoside	72.5	1133	6.9 ± 0.5 ^a	1.9 ± 0.2 ^b	LDL
Hederagenin 3β-glucuronopyranoside	73.8	941	14.3 ± 0.6 ^a	8.4 ± 0.6 ^b	9.2 ± 0.2 ^b
Serjanic acid 3β-arabinopyranoside	74.7	927	LDL	1.3 ± 0.0 ^b	10.1 ± 1.2 ^a
Campesterol 3β-D-glucopyranoside	85.5	562	31.5 ± 1.4 ^a	23.4 ± 1.3 ^b	37.5 ± 14 ^a
Stigmasteryl 3β-D-glucopyranoside	88.7	574	48.1 ± 2.0 ^c	67.4 ± 0.9 ^b	95.6 ± 3.0 ^a
Sitosteril 3β-D-glucopyranoside	92.9	576	35.7 ± 1.8 ^b	42.1 ± 1.3 ^a	42.5 ± 2.9 ^a
<i>Alkaloids</i>					
Choline	6.7	104	21.5 ± 0.8 ^c	25.7 ± 1.5 ^b	31.5 ± 1.9 ^a
Trigonelline	8.2	138	18.6 ± 1.0 ^c	22.4 ± 1.8 ^b	34.5 ± 3.0 ^a
Nicotinic acid	13.4	124	6.7 ± 0.5 ^a	6.1 ± 0.5 ^a	7.1 ± 0.6 ^a
Sitsirikine	18.5	355	14.9 ± 0.7 ^a	15.1 ± 0.6 ^a	15.6 ± 0.5 ^a
Vinblastine	34.7	825	LDL	1.1 ± 0.1 ^b	2.5 ± 0.3 ^a
Vindoline	37.7	457	1.8 ± 0.2 ^a	1.3 ± 0.1 ^a	LDL
Catharanthine	42.2	337	4.1 ± 0.3 ^b	5.6 ± 0.4 ^b	6.3 ± 0.6 ^a
Vinleurosine	50.6	809	5.5 ± 0.5 ^a	4.6 ± 0.3 ^b	LDL

Los resultados son la media de tres determinaciones independientes ± SD. Diferentes superíndices significan diferencia significativamente por la prueba de Tukey, $\alpha=0.05$ (Figuroa-Pérez, 2015).

3. JUSTIFICACIÓN

La obesidad y sus complicaciones, como la esteatosis hepática, la cual tiene una alta prevalencia entre las personas obesas y puede culminar en la muerte del individuo, son uno de los principales problemas de salud en nuestro país. Se ha propuesto como alternativa para contrarrestar este problema el consumo de alimentos y bebidas con propiedades antioxidantes y nutricias; dentro de las cuales se encuentran las infusiones herbales, que son bebidas económicas, de fácil acceso y consumidas comúnmente por la población debido a diversos beneficios a la salud que se les atribuyen. Entre las infusiones de mayor consumo en México se encuentra la preparada a partir de hierbabuena cultivada a cielo abierto, de esta se ha reportado que mejora el perfil lipídico y glicémico, haciendo de suma importancia la búsqueda de condiciones de cultivo que mejoren dichas propiedades.

La aplicación foliar de AS en diferentes concentraciones incrementa la concentración de compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas y alcaloides en plantas de hierbabuena y esto conlleva a una mayor concentración en sus infusiones. De igual forma, aumenta la capacidad antioxidante, además se ha demostrado que su consumo disminuye la glucosa sérica (25%) e incrementa los niveles de insulina en suero (75%), esto demostrado en un modelo diabético de ratas Wistar inducidas con estreptozotocina, lo cual puede estar relacionado con una protección a las células pancreáticas. Además, el consumo de infusión de hierbabuena tratada con AS disminuyó los niveles de triglicéridos y LDL en suero e incrementaron las concentraciones de HDL. Por otra parte, la infusión de hierbabuena tratada con AS mejoró el nivel de esteatosis en hígado de los animales diabéticos. Por lo tanto, la aplicación de AS 2.0 mM durante el cultivo de hierbabuena podría utilizarse para potenciar las propiedades nutraceuticas de sus infusiones.

Además, se ha comprobado que cuando las plantas de hierbabuenas son tratadas con quitosano se puede inducir en las plantas un incremento de metabolitos secundarios, como los polifenoles. Por lo que, la aplicación de estos factores de estrés sobre la planta de hierbabuena podría generar materia prima para la producción de infusiones con mayores propiedades bioactivos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el perfil de compuestos fenólicos de infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) tratada con quitosano y ácido salicílico y determinar su efecto sobre la esteatosis hepática en un modelo de obesidad.

4.2 Objetivos específicos

Evaluar el efecto de la aplicación de quitosano y ácido salicílico sobre parámetros agronómicos de plantas de *Mentha piperita* y *Mentha spicata*.

Evaluar el efecto de la aplicación de quitosano y ácido salicílico sobre el perfil de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y propiedades fisicoquímicas de las infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*)

Determinar el efecto de las infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) tratadas con AS 2 mM sobre el peso corporal, perfil lipídico y la esteatosis hepática en un modelo de obesidad.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material vegetal

El estudio se realizó con 36 plantas de *Mentha piperita* (Mp) y 36 plantas de *Mentha spicata* (Ms), la cuales fueron adquiridas en el vivero de plantas (Floraplant S.A. de C.V) con un tamaño inicial de 10 cm aproximadamente. Las plantas fueron sembradas en bolsas bicapa negra/blanca de 10 L (30x40 cm), se aplicó un riego automatizado de 2 min por cada 10 min durante el día (12 h), el fertilizante fue aplicado en el riego a todas las plantas. La composición del fertilizante para preparar 5000 L fue la siguiente: nitrato de calcio (3.265 kg), sulfato de magnesio (640 g), nitrato de potasio (1.5 kg), fosfato de potasio (1.23 g), sulfato de magnesio (640 g), ácido sulfúrico (223 mL), ácido nítrico (250 mL), nitrato de magnesio (1.06 Kg), quelato de Fe (76 g), quelato de Cu (2 g), quelato de Zn (11 g), borato de sodio (10 g) y molibdato de sodio (1 g).

5.2 Material biológico

Se utilizaron 48 ratas macho Wistar con pesos entre 200 g y 230 g, adquiridas en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro. Los animales se dividieron en 6 grupos (8 ratas por grupo), estas fueron aclimatadas por 7 días bajo condiciones ambientales estándar (40-60% humedad relativa, 24 ± 2 °C de temperatura y un ciclo de 12 horas de luz-obscuridad).

5.3 Evaluación de parámetros de crecimiento y compuestos fenólicos en

***Mentha piperita* y *Mentha spicata* tratadas con quitosano y ácido salicílico**

La inducción se llevó a cabo en una dosis única el día 45 después del trasplante. Las plantas se trataron al azar con soluciones de quitosano en agua destilada a diferentes concentraciones (1.85 μ M, 3.96 μ M y 7.93 μ M) y ácido salicílico (1 mM y 2 mM) por aspersion. El muestreo de hojas y tallos se realizó 14 días después de la aplicación del elicitor, se secaron a 45 °C durante 24 h, y posteriormente se molieron. Para la determinación del efecto de la inducción sobre

los parámetros de crecimiento se realizó la medición longitudinal y transversal de 15 hojas y el largo de 15 tallos por planta, utilizando un vernier digital, dichas mediciones se realizaron en los días 45 y 59 (Figura 10).

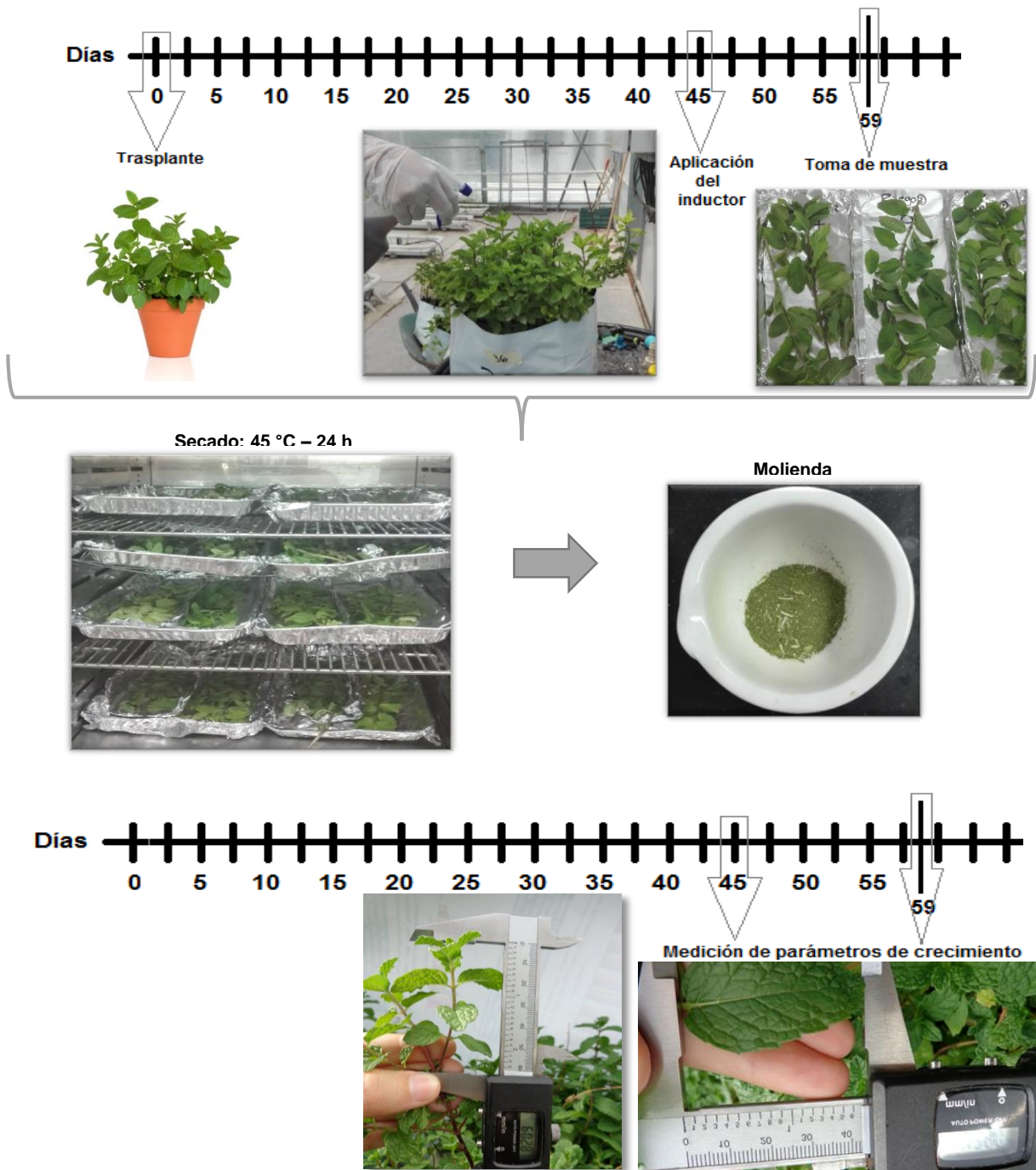


Figura 10. Metodología de cultivo de plantas de hierbabuena, aplicación de inductores, medición de parámetros de crecimiento y preparación de la muestra

5.4 Cuantificación de ácidos fenólicos y flavonoides por UPLC

5.4.1 Preparación de la muestra

Se realizó una extracción de compuestos fenólicos utilizando cartuchos de extracción Supel-Select HLB SPE Tube bed wt. 60 mg, volumen 3 mL. Llevando a cabo la siguiente metodología:

Para activar los cartuchos, se agregaron 3 mL de metanol a cada cartucho y posteriormente 3 mL de agua destilada. Después se agregaron 2 mL de infusión de hierbabuena al 1% de los diferentes tratamientos, al terminar de pasar la muestra por el cartucho se adicionaron 2 mL de ácido fórmico 1.5 M, para retirar compuestos que no son de nuestro interés (azúcares), posteriormente se agregaron 2 mL de una solución de agua:metanol (95:5), también se extraen compuesto que no se desean (ácidos orgánicos). Finalmente para la extracción de compuestos fenólicos se dejó pasar por los cartuchos una solución de ácido fórmico (99:1) (2 mL) y esta fracción se recolecto en tubos eppendorf de 2 mL. Se llevó a sequedad la muestra para concentrar los compuestos.

Se resuspendieron las muestra en 100 μ L de una solución al 95% fase (a) y 5% fase (b), se agitaron por 1 min y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 min y se recuperó el sobrenadante.

5.4.2 Cuantificación de compuestos fenólicos en plantas tratadas con inductores

La determinación se realizó en un sistema de cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC) (Acquity clase I Waters) con un detector de arreglo de diodos (DAD) y utilizando como estándares hesperidina, ácido rosmarínico, naringenina, quercetina, rutina, ácido sinapico, ácido cafeico, ácido cafeoilquinico, ácido clorogénico y ácido cumárico empleando como columna de separación una acquity BEH C18 (2.1 x 1000 mm, 1.7 μ m) a 35° C.

La separación de polifenoles se realizó utilizando como fase móvil ácido fórmico 75 mM (a) y acetonitrilo (b) en condiciones de gradiente: 95/5 (A/B) de 0-20

min, 80/20 de 20-25 min, 60/40 de 25-30 min, seguido de 5 min de re-acondicionamiento con las condiciones iniciales. La muestra se mantuvo a 10° C con un flujo de 0.2 mL/min durante 11 min y se realizó la medición de absorbancias a 280 y 320 nm (Rodríguez-Medina *et al.*, 2009).

Las siguientes determinaciones se realizaron únicamente para las infusiones de las plantas tratadas con ácido salicílico 2 mM y sus controles ya que fueron las que presentaron un mejor perfil general de compuestos.

5.5 Determinación del perfil de metabolitos presentes en las infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) tratada con ácido salicílico 2 mM.

El perfil de compuestos se realizó mediante la metodología descrita por Rodríguez-Medina *et al.* (2009). Se empleó un sistema de cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC) (Acquity clase I Waters) acoplado a masas. Se utilizó una columna de fase reversa Zorbax octadecilsilano (150 x 4.6 mm, ODS-C18). El equipo se operó a 34 °C con un flujo de 0.5 mL/min. La fase móvil utilizada fue el solvente A: acetonitrilo:agua (10:90 v/v) con 1% ácido fórmico y el solvente B: acetonitrilo. Durante el análisis, el gradiente programado fue 95% A y 5 % B al tiempo cero, 20% B a los 20 min, 40% B a los 25 minutos, 5% B a los 35 minutos y 5 % B a los 35 minutos. El volumen de inyección del extracto fue de 20 µL. Se utilizaron las siguientes longitudes de onda: 214, 280, 320, 365 y 520 nm, con un barrido de 190 a 560 nm.

Para el análisis de masas, las condiciones fueron las siguientes: [M-H]⁻ 100-1200 m/z, 120 °C de temperatura de fuente, 800 L/h de nitrógeno a 250 °C como gas de desolvatación, los voltajes del cono y del capilar fueron de 39 V y 3.2 kV, respectivamente, y se realizó tanto ionización negativa como positiva.

La identificación de los compuestos se realizó mediante la comparación con el tiempo de retención de los estándares comerciales, los cuales se inyectaron de manera independiente.

5.6 Determinación de la capacidad antioxidantes de las infusiones de *Mentha piperita* y *Mentha spicata* tratada con AS 2 mM mediante los ensayos de DPPH y ORAC

Las muestras utilizadas fueron infusiones al 1% de hierbabuena (Mp y Ms) tratada con ácido salicílico 2 mM y sus controles, preparadas con agua destilada.

5.6.1 Ensayo DPPH

Se preparó una solución de DPPH en metanol suficiente para obtener una absorbancia entre 0.75 y 0.78 a 517 nm. Se utilizó como estándar una solución de trolox con la cual se realizó una curva de calibración (regresión lineal). Se agregaron 20 μ L de la muestra y 200 μ L de la solución de DPPH, se dejó reposar 6 min con agitación y se leyó la absorbancia a 517 nm (Bran-Williams *et al.*, 1995).

5.6.2 Ensayo ORAC

En los pozos de las placas especiales para fluorescencia se preparó un patrón agregando 200 μ L de fluoresceína 70 nM, también se preparó un blanco con 120 μ L de fluoresceína 70 nM más 60 μ L de AAPH más 20 μ L de PBS, de igual manera se prepararon los pozos de las muestras agregando 120 μ L de fluoresceína 70 nM, 60 μ L de AAPH y 20 μ L de muestra.

Se adicionaron 20 μ L de la muestra más 120 μ L de fluoresceína 70 nM, se incubó durante 15 min con agitación a 37 °C, después de este tiempo se adicionaron los 60 μ L de AAPH a cada pozo. La intensidad de la fluorescencia fue medida cada minuto durante 2 horas con longitud de onda de excitación y emisión de 485 y 520 nm respectivamente.

5.7 Evaluación de las propiedades fisicoquímicas

5.7.1 Color

El color de las infusiones de las plantas de hierbabuena (Mp y Ms) tratadas y sin tratar con ácido salicílico 2 mM, se les determinó mediante la reflexión de la luz

blanca registrando los valores: L* (luminosidad), a* (+ rojo, - verde), b* (+ amarillo, - azul), C* (croma o saturación), H* (color/tono) de la escala internacional de color CIE LAB, utilizando un espectrofotómetro portátil Minolta CM-2002 (McGuire, 1992).

5.7.2 Azúcares

La determinación de azúcares de todas las infusiones de plantas de hierbabuena (Mp y Ms), se realizaron midiendo el índice de refracción de cada muestra a una temperatura ambiente de 28 °C aproximadamente y utilizando un refractómetro marca Hanna®, modelo HI96801. Los resultados se expresaron en °Brix (Quintero et al., 2013).

5.7.3 Acidez

Para la determinación de la acidez titulable de todas las infusiones de las plantas de hierbabuena (Mp y Ms), se empleó el método de la AOAC 942.15 (1990). En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se colocaron 10 mL de muestra y 50 mL de agua destilada, después se adicionaron 2 gotas de fenolftaleína al 1% diluida con etanol, se tituló con una solución de hidróxido de sodio (0.1 N) hasta observar el primer cambio de color. Se analizaron las muestras por triplicado y los resultados obtenidos fueron calculados utilizando la siguiente fórmula (Bustamante, 2015):

$$\% \text{ Acidez titulable} = \frac{\text{Vol.NaOH} \cdot \text{NrNaOH} \cdot \text{Eq. Acido}}{\text{Vol. muestra}} \times 100 \times \text{FD}$$

Dónde: Vol.NaOH es el volumen de NaOH gastado en mL, NrNaOH es la normalidad del NaOH, Vol. es el volumen de la muestra en mL, Eq. Acido (60.02) es el valor equivalente del ácido acético en mL y FD que es el factor de dilución que corresponde a 0.01 g/mL.

5.8 Evaluación del efecto de las infusiones de hierbabuena tratada con ácido salicílico 2 mM sobre el peso corporal y esteatosis hepática de ratas obesas

Las ratas se clasificaron en 2 grupos: i) grupo control sano, el cual fue alimentado con una dieta estándar y ii) grupo obeso, el cual fue alimentado con una dieta alta en lípidos y fructosa (Cuadro 6) durante 10 semanas. Los animales correspondientes al grupo obeso fueron subclasificados en cinco grupos:

Cuadro 6. Contenido nutrimental de las dietas estándar y alta en grasa y fructosa

Nutrientes	Dieta estándar	Dieta alta en grasas y fructosa
Proteínas	24%	13%
Carbohidratos	45%	43%
Fructosa	0.3%	18%
Manteca	5%	20%
Saturados	1%	6%

i) Grupo control obeso, al cual se le administrará agua *ad libitum*; ii) Grupo obeso con tratamiento de hierbabuena Mp control; iii) Grupo obeso con tratamiento de hierbabuena Mp AS 2 mM; iv) Grupo obeso con tratamiento de hierbabuena Ms control y v) grupo obeso con tratamiento de hierbabuena Ms AS 2 mM (Cuadro 7).

Cuadro 7. Grupos de los estudio *In vivo* para la evaluación de las infusiones de hierbabuena tratadas con quitosano

Grupo	Dieta	Tratamiento
Control sano	Estándar	Agua
Control obeso	Alta en grasa y fructosa	Agua
<i>Mentha piperita</i> Control	Alta en grasa y fructosa	Infusión al 1%
<i>Mentha piperita</i> AS 2 mM	Alta en grasa y fructosa	Infusión al 1%
<i>Mentha spicata</i> Control	Alta en grasa y fructosa	Infusión al 1%
<i>Mentha spicata</i> AS 2 mM	Alta en grasa y fructosa	Infusión al 1%

El experimento se llevó a cabo durante seis semanas más. Se realizaron mediciones semanales del peso corporal, así como la determinación diaria del consumo de alimento y bebida. Al finalizar el experimento y previo al sacrificio se llevó a cabo la recolección de orina y heces de 24 horas.

Posteriormente, los animales fueron sacrificados utilizando guillotina y se recolectó sangre. En el sacrificio se recolectó hígado y tejido adiposo, los cuales fueron pesados, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C. Una fracción de los tejidos se almacenó en una solución amortiguadora de formalina al 10% (pH 7.4) para los análisis histológicos.

5.8.1 Evaluación del efecto de las infusiones de hierbabuena tratada con ácido salicílico 2 mM sobre el perfil de lípidos y glucosa en suero

La cuantificación de colesterol, triglicéridos, LDL y glucosa en suero se realizaron por medio de kits colorimétricos/enzimáticos de la marca Spinreact y los resultados se expresaron como mg/dL de suero, todo de acuerdo a las instrucciones en la ficha técnica del fabricante.

5.8.2 Evaluación del efecto de las infusiones de hierbabuena tratada con ácido salicílico 2 mM sobre la esteatosis hepática

5.8.2.1 Análisis histológico del tejido hepático

Los tejidos fueron embebidos en parafina, cortados en secciones de 5 μm , y teñidos con la solución de Harris de hematoxilina y eosina (H&E). Las muestras de tejido hepático fueron observadas y fotografiadas bajo microscopio a 100X, 300X y 600X analizando 5 imágenes por animal. Las muestras de tejido adiposo fueron observadas y fotografiadas a 100X analizando 5 imágenes por animal.

5.8.2.2 Determinación del efecto de las infusiones de hierbabuena sobre la absorción de triglicéridos

Para la cuantificación de triglicéridos en hígado se realizó una extracción lipídica a partir del tejido previamente congelado de acuerdo a la metodología de Norris (2002) como se describe a continuación, se tomaron 100 mg de tejido en un tubo eppendorf de 2 mL, se le adicionaron 350 μL de hidróxido de potasio (KOH) en etanol (2 partes de etanol por 1 parte de KOH al 30%), se incubaron toda la noche a 55 °C, posterior a la incubación se agitaron las muestras en un vortex hasta que el tejido estuviera completamente digerido, se llevó a un volumen total de 1000 μL con agua:etanol (1:1) y se centrifugaron a 10000 rpm por 5 minutos, se transfirió el sobrenadante a otro tubo eppendorf, se completó el volumen a 1200 μL con la misma solución de agua:etanol (1:1), se transfirieron 200 μL a un tubo nuevo y se le adicionaron 215 μL de cloruro de magnesio 1M, se mantuvieron en hielo por 10 minutos y finalmente se centrifugaron a 10000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante

se colocó en un tubo nuevo y este se utilizó para hacer la cuantificación de triglicéridos mediante un kit colorimétrico/enzimático de la marca Spinreact de acuerdo con las especificaciones de la ficha técnica del fabricante. Los resultados se expresaron como mg de triglicéridos por gramo de tejido.

5.9 Diseño y Análisis estadístico

Se realizó un diseño experimental multifactorial con una población de 36 plantas de cada variedad, con una n=6 plantas por tratamiento. Los tratamientos fueron Q1.85, Q3.96, Q7.93, AS1 y AS2. Las variables respuesta de este experimento fueron los parámetros de crecimiento longitudinales y transversales de las hojas y el largo de los tallos de las plantas, concentración de los principales ácidos fenólicos y flavonoides contenidos en las infusiones resultantes.

El experimento in vivo fue un 2² con una población total de 48 ratas, una n=4 jaulas con dos individuos cada una, por tratamiento. Los tratamientos fueron infusiones de *Mentha piperita* y *Mentha spicata* tratadas con AS 2 mM y sin tratar (Mp control, Mp AS 2 mM, Ms control y Ms AS 2 mM). Las variables respuesta fueron ganancia de peso corporal; perfil lipídico, concentración de glucosa e insulina (en suero); grado de esteatosis según los análisis histopatológicos y concentración de triglicéridos en hígado.

Los resultados se reportan como la media \pm error estándar de la media (EE). El análisis estadístico se determinará mediante el análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias aplicando la prueba de Tukey-Kramer y t de Student (programa JMP 10.0), con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Parámetros de crecimiento de las plantas de hierbabuena tratadas con quitosano y ácido salicílico.

Los tratamientos con quitosano (0.8, 1.6, 3.2 μ M) y ácido salicílico (1 y 2 mM), en una sola aplicación, no tienen efecto en el crecimiento transversal y longitudinal de las hojas y tampoco sobre el largo de los tallos de las plantas de hierbabuena (Mp y Ms) (Figura 11).

Este es un resultado favorable, ya que se ha reportado que el tratamiento con quitosano a concentraciones menores a las utilizadas en este trabajo, en otra planta de la familia lamiácea, disminuye la altura y el peso seco de las plantas (Salehi *et al.*, 2017). Por otro lado Figueroa-Pérez y colaboradores (2014) mostraron que el tamaño de hoja y brotes de las plantas de hierbabuena (Mp) aumentan de manera significativa, al aplicar de modo foliar en dos tiempos una solución de ácido salicílico 2 mM comparada con un control.

Por lo tanto el efecto de la aplicación de elicitores sobre los parámetros de crecimiento depende de la variedad de la planta, el número de aplicaciones, compuesto inductor y concentración utilizada (Bruce, 2014).

6.2 Cuantificación de compuestos fenólicos presentes en infusiones de plantas *Mentha piperita* y *Mentha spicata* tratadas con quitosano y ácido salicílico

El contenido de ácidos fenólicos y flavonoides de las infusiones de hierbabuena (Mp y Ms) tratada con quitosano (0.8, 1.6 y 3.2 μ M) y ácido salicílico (1 y 2 mM) se muestra en los Cuadros 8, 9, 10 y 11. En las infusiones preparadas con Mp el tratamiento de AS 2 mM aumentó un 17.5% el contenido de ácido rosmarínico en comparación con el control, siendo este uno de los compuestos mayoritarios de la hierbabuena al cual se le atribuyen muchos de los beneficios de esta planta (Cuadro 8).

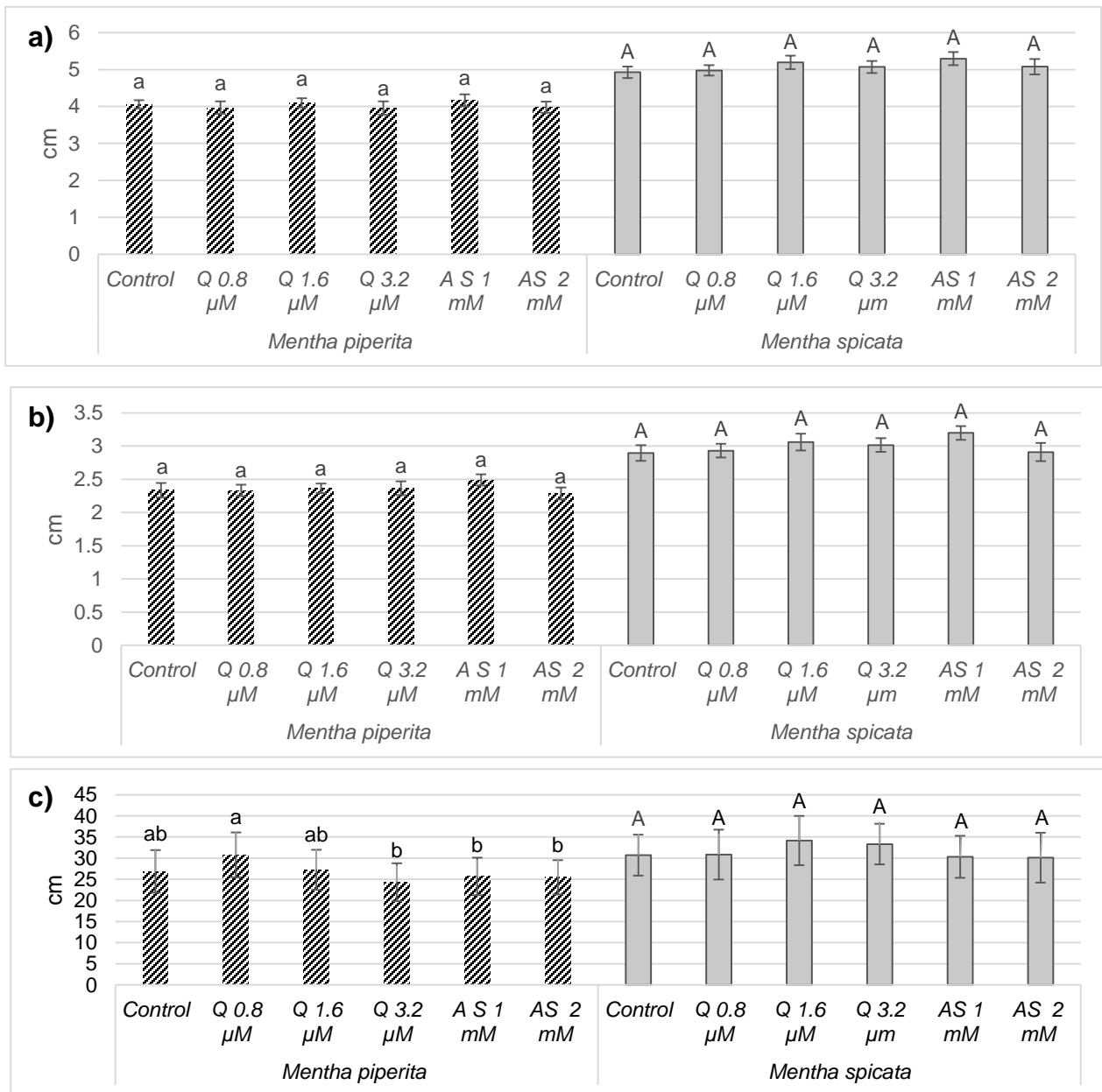


Figura 11. Efecto de la aplicación de quitosano y ácido salicílico sobre el crecimiento a) longitudinal y b) transversal de las hojas y c) el largo de los tallos de plantas de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*). Los resultados son expresados como la media \pm EE (n=15). Diferentes letras en cada columna indican diferencias entre tratamientos ($\alpha=0.05$, prueba de Tukey).

Cuadro 8. Efecto de la aplicación foliar de ácido salicílico y quitosano sobre la concentración de ácidos fenólicos en infusiones de *Mentha piperita*.

Compuesto	Control	Q 0.8 µM	Q 1.6 µM	Q 3.2 µM	AS 1 mM	AS 2 mM
Rosmarínico	2,625 ± 119 ^{bc}	2,025 ± 70 ^d	2,185 ± 144 ^{cd}	2,506 ± 102 ^{bcd}	3,033 ± 107 ^{ab}	3,179 ± 165 ^a
Sinápico	62.1 ± 5.0 ^a	40.0 ± 3.9 ^b	13.2 ± 1.6 ^c	23.8 ± 0.5 ^c	46.9 ± 2.4 ^b	46.1 ± 1.9 ^b
Cafeico	4.9 ± 0.2 ^b	6.4 ± 0.4 ^b	12.0 ± 0.5 ^a	4.8 ± 0.2 ^b	4.5 ± 0.4 ^b	4.9 ± 0.3 ^b
Clorogénico	2.2 ± 0.0 ^{bc}	3.6 ± 0.2 ^a	1.5 ± 0.1 ^c	2.2 ± 0.0 ^b	3.0 ± 0.1 ^a	1.9 ± 0.1 ^{bc}
Cumárico	1.8 ± 0.2 ^c	2.6 ± 0.1 ^{ab}	1.2 ± 0.0 ^c	2.0 ± 0.1 ^{bc}	2.6 ± 0.1 ^{ab}	2.9 ± 0.1 ^a
Cafeoilquínico	1.3 ± 0.1 ^c	6.8 ± 0.6 ^b	10.9 ± 0.9 ^a	4.8 ± 0.6 ^b	5.8 ± 0.3 ^b	6.5 ± 0.2 ^b

Resultados son expresados en µg/mL y como la media ± EE (n=4). Q: quitosano, AS: ácido salicílico. Diferentes letras en cada renglón indican diferencias entre tratamientos ($\alpha=0.05$, prueba de Tukey).

En el caso de la Ms no se ve incrementada la concentración de los ácidos fenólicos medidos como efecto de la aplicación de quitosano y ácido salicílico 1 mM, sin embargo se pudo observar un aumento en la concentración de ácido cumárico provocado por el tratamiento de ácido salicílico 2 mM (Cuadro 9).

Cuadro 9. Efecto de la aplicación de ácido salicílico y quitosano sobre la concentración en µg/mL de ácidos fenólicos en infusiones de *Mentha spicata*

Compuesto	Control	Q 0.8 µM	Q 1.6 µM	Q 3.2 µM	AS 1 mM	AS 2 mM
Rosmarínico	2,609 ± 68 ^{ab}	2,153 ± 113 ^{bcd}	2,487 ± 153 ^{abc}	2,692 ± 89 ^a	1,859 ± 90 ^d	2,015 ± 118 ^{cd}
Sinápico	48.3 ± 0.8 ^a	35.4 ± 1.4 ^b	41.3 ± 4.3 ^{ab}	47.8 ± 3.6 ^a	35.3 ± 0.9 ^b	49.1 ± 2.7 ^a
Cafeico	11.1 ± 0.2 ^b	4.4 ± 0.4 ^d	6.8 ± 0.3 ^{cd}	8.3 ± 0.9 ^{bc}	18.0 ± 1.2 ^a	10.7 ± 1.0 ^b
Cafeoilquínico	10.7 ± 0.7 ^{ab}	7.5 ± 0.4 ^b	7.1 ± 0.4 ^b	7.6 ± 0.7 ^b	12.5 ± 1.7 ^a	10.8 ± 0.3 ^{ab}
Clorogénico	4.0 ± 0.4 ^a	1.7 ± 0.0 ^{bc}	1.8 ± 0.1 ^{bc}	1.7 ± 0.1 ^c	2.0 ± 0.1 ^{bc}	2.72 ± 0.1 ^b
Cumárico	1.9 ± 0.1 ^c	1.2 ± 0.0 ^d	2.9 ± 0.1 ^a	2.3 ± 0.1 ^{bc}	2.7 ± 0.1 ^{ab}	3.1 ± 0.1 ^a

Resultados son expresados como la media ± EE (n=4). Q: quitosano, AS: ácido salicílico. Diferentes letras en cada renglón indican diferencias entre tratamientos ($\alpha=0.05$, prueba de Tukey).

Con respecto al contenido de flavonoides el tratamiento con AS 2 mM aumentó 17.2%, 31% y 37% la hesperidina, naringenina y quercetina respectivamente en comparación con el control, siendo los dos últimos tratamientos

los que presentaron diferencia estadística significativa, esto en la variedad Mp (Cuadro 10).

Cuadro 10. Efecto de la aplicación foliar de ácido salicílicos y quitosano sobre la concentración de flavonoides en infusiones de *Mentha piperita*

Compuesto	Control	Q 0.8 µM	Q 1.6 µM	Q 3.2 µM	AS 1 mM	AS 2 mM
Hesperidina	427 ± 18 ^{ab}	387 ± 23 ^{bc}	311 ± 26 ^{cd}	279 ± 13 ^d	444 ± 9 ^{ab}	516 ± 23 ^a
Naringenina	288 ± 2 ^b	270 ± 14 ^{bc}	208 ± 17 ^{cd}	155 ± 12 ^d	324 ± 14 ^b	418 ± 31 ^a
Rutina	2.8 ± 0.4 ^b	2.2 ± 0.1 ^{bc}	0.4 ± 0.0 ^d	1.1 ± 0.0 ^{cd}	4.1 ± 0.3 ^a	2.6 ± 0.1 ^b
Quercetina	2.2 ± 0.2 ^b	1.4 ± 0.1 ^c	2.1 ± 0.1 ^b	1.1 ± 0.0 ^c	2.6 ± 0.0 ^b	3.5 ± 0.1 ^a

Resultados son expresados en µg/mL y como la media ± EE (n=4). Q: quitosano, AS: ácido salicílico. Diferentes letras en cada renglón indican diferencias entre tratamientos ($\alpha=0.05$, prueba de Tukey).

En las infusiones de hierbabuena Ms el tratamiento con AS 2 mM aumentó un 17.2% la concentración de hesperidina (Cuadro 11) en comparación con el control, siendo este el flavonoide mayoritario de la hierbabuena. El resto de los tratamientos disminuyeron el contenido de flavonoides (Cuadro 11).

Cuadro 11. Efecto de la aplicación foliar de ácido salicílico y quitosano sobre la concentración de flavonoides en infusiones de *Mentha spicata*

Compuesto	Control	Q 0.8 µM	Q 1.6 µM	Q 3.2 µM	AS 1 mM	AS 2 mM
Hesperidina	370 ± 19 ^b	90 ± 20 ^c	263 ± 12 ^c	233 ± 13 ^c	265 ± 7 ^c	447 ± 23 ^a
Naringenina	527 ± 9 ^a	292 ± 19 ^b	353 ± 34 ^b	406 ± 40 ^{ab}	375 ± 26 ^b	377 ± 30 ^b
Rutina	67.3 ± 4.0 ^a	23.9 ± 1.6 ^b	17.4 ± 0.6 ^b	14.7 ± 1.1 ^b	21.1 ± 2.2 ^b	16.4 ± 1.1 ^b
Quercetina	1.4 ± 0.1 ^a	1.3 ± 0.1 ^a	1.4 ± 0.1 ^a	1.3 ± 0.1 ^a	1.4 ± 0.0 ^a	1.6 ± 0.0 ^a

Resultados son expresados en µg/mL y como la media ± EE (n=4). Q: quitosano, AS: ácido salicílico. Diferentes letras en cada renglón indican diferencias entre tratamientos ($\alpha=0.05$, prueba de Tukey).

En el material utilizado en este experimento se observaron diferencias en la respuesta a la inducción de metabolitos secundarios entre la Mp y Ms, resultados como éste se reportaron anteriormente entre variedades diferentes de otras familias de plantas. En este sentido, se ha encontrado diferencia en la respuesta transcripcional entre dos cultivares de col silvestre (*Brassica oleracea*), al ser

sometidos a inductores del mecanismo de defensa (Wu *et al.*, 2008). Esto puede deberse a que si en un genotipo están ausentes rasgos de defensa inducible, estos no podrán ser activados con ningún tratamiento (Bruce, 2014).

Por otro lado, también se ha reportado que si una planta está previamente expuesta a otro tipo de estrés que active su sistema de defensa, esto limita el efecto posterior al aplicar tratamientos con compuestos elicitores (Suzuki *et al.*, 2014).

Cabe mencionar que la nutrición de la planta también es un factor importante en la síntesis de metabolitos secundarios, ya que al tener déficit de compuestos específicos como nitrógeno y hierro, las plantas aumentan la síntesis de metabolitos secundarios específicos como flavonoides e isoflavonoides y ácidos fenólicos respectivamente (Nicolas Lampkin, 1998). Es por esto que los resultados obtenidos pueden diferir con los resultados reportados anteriormente por nuestro grupo de trabajo. Ya que en este estudio se aplicó una solución nutritiva de Steiner modificada como se explica en la sección de materiales y métodos, y además la forma de aplicación también se realizó de diferente manera, en el estudio de Figueroa-Pérez y colaboradores 2014 se realizó semanalmente y solo durante el tiempo de crecimiento, mientras que en el presente estudio se aplicó diariamente, en periodos de 12 horas, durante todo el experimento.

6.3 Perfil metabólico de compuestos presentes en infusiones de plantas *Mentha piperita* y *Mentha spicata* tratadas con ácido salicílico 2 mM

Los resultados anteriores muestran que el único tratamiento que mejoró el contenido de compuestos fenólicos fue el tratamiento con ácido salicílico 2 mM, por lo tanto, el perfil metabolómico sólo se determinó en estos tratamientos.

6.3.1 Perfil de compuestos fenólicos identificados en infusiones de *Mentha piperita* y *Mentha spicata* tratadas con ácido salicílico 2 mM

Los compuestos mayoritarios encontrados en las infusiones de hierbabuena (Mp y Ms) fueron compuestos fenólicos, principalmente ácidos fenólicos (Cuadro 12) y flavonoides (Cuadro 13).

En el caso de los ácidos fenólicos (Cuadro 12) las infusiones de Mp tratada con AS 2 mM incrementaron el contenido de 9 ácidos fenólicos de los identificados, por ejemplo, ácido 3-hidroxibenzoico-glucosa (67%), ácido 3-O-metilrosmarínico (43%), el ácido 2-hidroxibenzoico (39%), el ácido elágico-di-metil éter-O-glucosido (22%) y el ácido rosmarínico (9%). El ácido fenólico mayoritario identificado en esta variedad fue el ácido clorogénico, seguido por el ácido O-cafeoil rosmarínico.

Por otro lado, las infusiones de Ms tratada con AS 2 mM fue el tratamiento que mostro mayor diferencia con respecto a las infusiones de las plantas control, este tratamiento logró aumentar el contenido de 12 ácido fenólicos, entre ellos el ácido cafeico-O-hexosa dímero (58%), el ácido 3-hidroxibenzoico-glucosa (49%), el ácido O-cafeoil rosmarínico (37%), ácido sinápico hexosa (31%), el ácido hidroxibenzoico (24%), el ácido 2-hidroxibenzoico (12%) y el ácido ferúlico hexosa (9.7%). El ácido fenólico mayoritario detectado en esta variedad (Ms) fue el ácido rosmarínico dímero, seguido por el ácido 3-O-metilrosmarínico y el ácido clorogénico. El ácido caftárico fue detectado en las infusiones control pero no en las infusiones de las plantas tratadas con AS 2 mM y el ácido rosmarínico-O-glucósido fue detectado en las infusiones de plantas tratadas y no en las infusiones de plantas control.

El ácido salvianólico B no fue detectado en las infusiones de Mp AS 2 mM, pero si en las infusiones de Mp Control, contrario a esto, el ácido salvianólico E no fue detectado en las infusiones Mp Control pero si en las infusiones de Mp AS 2 mM.

En las infusiones de Mp se identificaron el ácido elágico-di-metil éter-O-glusido, ácido cafeico, el ácido salvianolico A, B, C y E, los cuales no fueron identificados en la Ms. Mientras que en la Ms se identificaron el ácido gálico y el ácido rosmarínico dímero, que no fueron identificados en las infusiones de Mp.

Con respecto al contenido de flavonoides (Cuadro 13), las infusiones de Mp tratada con AS 2 mM mostraron un menor contenido de la mayoría de los flavonoides presentes en estas, únicamente se observó contenido mayor en 17 flavonoides de los identificados, entre ellos la limocitrina rutinósido (37.7%), vitexin-O-xilósido (36.6%), luteolina-O-glicósido (35.1%), 3,7 dimetil quercetina (28.3%), orientina (Luteolina 8-C-glucosido) (27.7%), monohidroxipentametoxiflavanona (26%), quercetina (22.7%), luteolina (14.7%), catequina galato (11.4%) y catequina (7.3%).

Siendo hesperidina (hesperetin 7-O-rutinosido) y luteolina-7-O-rutinosido los compuestos mayoritarios identificados en esta variedad (*Mentha piperita*).

Cuadro 12. Perfil de ácidos fenólicos identificados en infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) tratada con ácido salicílico 2 mM

Ácidos fenólicos	Intensidad			
	Mp Control	Mp AS 2 mM	Ms Control	Ms AS 2 mM
Ácido 2-hidroxibenzoico	164.08	273.09	89.66	102.84
Ácido 2-hidroxibenzoico glucosa	89.40	53.19	59.68	59.58
Ácido 3-hidroxibenzoico	1006.64	368.79	347.93	475.50
Ácido 3-hidroxibenzoico glucosa	351.31	1077.46	792.00	1555.18
Ácido 3-O-metilrosmarínico	2004.71	3566.96	5392.96	5344.94
Ácido 4-hidroxibenzoico	11553.02	7567.66	3063.43	4034.02
Ácido 4-hidroxibenzoico glucosa	135.62	128.85	136.11	127.74
Ácido cafeico	236.59	227.27	ND	ND
Ácido cafeico glucosido	191.55	157.12	493.73	626.25
Ácido cafeico O-hexosa dímero	740.93	488.57	147.76	354.41
Ácido cafeoilferuloiltartárico	379.20	179.31	1313.03	502.38
Ácido cafotárico	91.56	85.03	103.58	ND
Ácido clorogénico	27158.72	23502.07	5283.53	5209.37
Ácido dicafeoiltartárico	642.26	584.01	121.98	140.17
Ácido dihidroferulico-glucosido	138.14	152.22	136.98	136.24
Ácido elálgico	115.54	150.43	205.80	135.71
Ácido elálgico-di-metil éter-O-glucosido	202.28	259.73	ND	ND
Ácido ferúlico hexosa	694.52	546.39	926.48	1026.09
Ácido gálico	ND	ND	81.48	91.14
Ácido litospérmico A	1287.25	1422.08	733.65	612.36
Ácido neoclorogénico	7009.38	6942.12	892.58	941.03
Ácido O-cafeoil rosmarínico	6226.44	4975.28	1419.92	2276.04
Ácido protocatecuico	51.45	55.60	54.95	82.71
Ácido rosmarínico	902.24	1146.95	924.40	736.27
Ácido rosmarínico dímero	ND	ND	32311.70	20961.28
Ácido rosmarínico-O-glucosido	393.63	425.86	ND	21202.37
Ácido salvianólico A	1355.36	1030.88	ND	ND
Ácido salvianólico B	310.94	ND	ND	ND
Ácido salvianólico C	285.72	311.91	ND	ND
Ácido salvianólico E	ND	778.49	ND	ND
Ácido sinápico hexosa	1080.89	921.55	1691.43	2469.82

Mientras que las infusiones de Ms tratada con AS 2 mM también fueron las que mostraron un mayor contenido comparadas con las infusiones de Ms Control, este tratamiento mostró incremento en el contenido de 36 flavonoides de los identificados, algunos de ellos son la orientina (Luteolina 8-C-glucósido) (39.4%), la naringenina 7-O-glucósido (35%), 3',4'-dihidroxi-7,5'-dimetoxiflavona (33.1%), eriodictiol (32.9%), 5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavanona (30.4%), naringenina (25.5%), hesperetina (24.1%), diosmetina-6-C-glucósido (20%), luteolina (20%), hesperidina (hesperetina 7-O-rutinósido) (18%), apigenina-6-C-glucosil-7-O-glucosido (13.6%), luteolina-7-O-rutinosido (13.6%) y apigenina (12.5%). El flavonoide mayoritario identificado para esta variedad fue el Diosmin seguido por apigenina-6-C-glucosil-7-O-glucósido y hesperidina (hesperetina 7-O-rutinósido).

En las infusiones de Mp se identificaron luteolina-7-O-rutinósido y luteolina-O-glicósido y en Ms se identificaron quercetina-O-pentosil-glucurónido y siringetina.

Cuadro 13. Perfil de flavonoides identificados en infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) tratada con ácido salicílico 2 mM

Flavonoides	Intensidad			
	Mp Control	Mp AS 2 mM	Ms Control	Ms AS 2 mM
(+)-Catequina	889.49	960.01	960.04	988.38
3,7-Dimetilquercetina	1261.37	1760.20	1612.54	1617.05
3',4'-dihidroxi-7,5'-dimetoxiflavona	13004.07	3256.09	3345.31	5007.10
5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavanona	129.15	120.62	98.64	141.88
5-hidroxi-6,7,8,3',4'-pentametoxiflavanona	123.73	126.78	1139.09	145.86
Apigenina	421.96	459.70	1395.40	1595.79
Apigenina glucosido	5097.74	4753.08	7121.68	5063.02
Apigenina-6-C-glucosil-7-O- glucosido	471273.73	447456.34	465112.86	538708.94
Catequina galato	442.14	499.90	1015.90	921.20
Didimina	19518.03	11974.10	4852.83	5703.66
Diosmetina-6-C-glucosido	2431.70	2086.48	1994.12	2502.67
Diosmin	499473.38	577925.56	466814.03	532371.69
Epicatequina galato	271.18	365.76	250.37	402.94
Eriocitrina (Eriodictiol 7-O-rutinosido)	916.01	742.28	364.11	527.14
Eriodictiol	332.62	310.91	112.00	167.78
Eriodictiol-7-O-rutinosido-4'- O-glucosido	1265.16	935.56	592.42	613.34
Galocatequina galato	218.41	285.68	230.14	430.14
Hesperetina	15635.13	14318.33	7503.22	9893.95
Hesperetina (Hesperetina 7-O-rutinosido)	772484.47	359650.89	410490.23	504733.86
Isoorientina	994.16	811.63	420.96	567.62
Isonaringina	955.77	538.17	161.94	195.81
Isoramnetina-3-O-neohesperidosido	2800.37	34860.47	5402.81	6301.28
Isoroifolina	87460.01	11583.77	194082.29	224668.33
Isosakuranentina-7-O-rutinosido	19518.03	12438.20	4852.83	5703.66
Kaempferol	14367.16	8753.46	11687.05	9554.97
Limocitrina rutinosido	241.27	387.25	701.45	585.32
Limocitrina-O-glucosido-HMG	240.16	314.42	287.79	284.71
Luteolina-7-O-rutinosido	476640.50	451199.41	ND	ND
Luteolina-O-glicosido	223.92	203.51	ND	ND
Luteolina	1501.76	1760.37	1336.46	1679.69
Luteolina-O-glicosido	142.36	219.73	186.53	284.03
Monohidroxipentametoxiflavanona	120.63	163.13	127.90	141.22
Miricetina	81.13	88.23	ND	ND
Naringenina	493.36	196.81	190.28	255.48
Naringenina 7-O-glucosido	205.10	165.33	110.89	170.60
Naringina	415.79	305.10	273.90	256.14
Narirutina 4'-glucosido	261.23	198.95	ND	259.49
Neeriocitrina	370.70	ND	218.83	258.90
Ácido nomilínico-17-b-D-glucopiranosido	347.67	317.63	464.48	713.16
Nomilínina-17-b-D-glucopiranosido	4699.35	4846.63	5087.49	5201.02
Orientina (Luteolina 8-C-glucosido)	5364.44	7428.49	7886.43	13028.44
Flordizina	249.42	250.62	1753.07	1754.74
Quercetina	67.09	86.75	80.28	76.86
Quercetina 3-O-ramnosido	3831.81	4279.50	2597.55	3444.08
Quercetina 3-O-rutinosido	4496.38	3801.37	3660.33	4170.38
Quercetina 3-O-soforosido	6397.36	ND	1247.59	1783.67
Quercetina 3-O-xilosido	994.17	757.71	400.94	719.94
Quercetina-O-pentosil- glucuronido	ND	ND	1751.06	1647.44
Siringetina	ND	ND	61.06	107.66
Vitexina (apigenina 8-C-glucosido)	653.75	527.12	3042.73	3886.86
Vitexina-2-rhamnosido	87460.01	68344.20	194082.29	223986.55
Vitexin-o-xilosido	114.49	180.85	273.12	189.15
Neodiosmina	6699.59	1921.82	ND	ND

6.3.2 Metabolitos de bajo peso molecular en infusiones de *Mentha piperita* y *Mentha spicata* tratadas con ácido salicílico 2 mM

En la Figura 12 se muestra el contenido de aminoácidos presentes en infusiones de hierbabuena tratada con ácido salicílico 2 mM. En el caso de la Mp el tratamiento con AS disminuyó el contenido de la mayoría de los aminoácidos encontrados, únicamente aumentó leucina en un 10%, mientras que el contenido de ácido aspártico, fenilalanina y tirosina no se vio afectado, esto respecto a las infusiones de las plantas control. Por otro lado, en las infusiones de Ms tratada con AS 2 mM los aminoácidos también disminuyeron, a diferencia de valina el cual aumentó, y en el caso de lisina y leucina no hubo cambios. La Figura 12 muestra que la fenilalanina es el aminoácido mayoritario y que las infusiones de plantas control presentan un mayor contenido de aminoácidos con respecto a las infusiones de plantas tratadas.

La Figura 13 presenta el contenido de carbohidratos presentes en las infusiones de hierbabuena (Mp y Ms), el carbohidrato mayoritario presente en las infusiones de hierbabuena es la sacarosa, la infusión Ms control fue la que mostro mayor contenido de este compuesto. De manera general los carbohidratos disminuyeron con el tratamiento de AS 2 mM en un rango aproximado de 24 a 36% en comparación con las infusiones de plantas control en ambas variedades. Por otro lado, fructosa 6-fosfato y Myo-inositol 1,4-bifosfato fueron encontradas en las infusiones de Mp control, pero no se identificaron en las infusiones Mp AS 2 mM, además la UDP-Glucosa se identificó en Mp, pero no en Ms y Myo-inositol 1,4-bifosfato también se identificó en las infusiones de Ms control pero no es las infusiones de las plantas no tratadas.

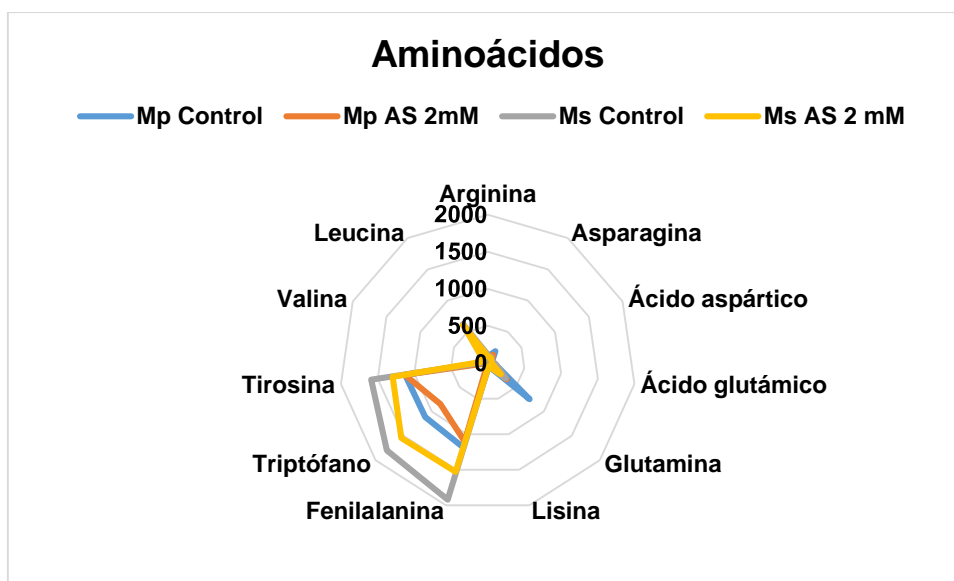


Figura 12. Aminoácidos presentes en infusiones de hierbabuena *Mentha piperita* y *Mentha spicata* tratada con AS 2 mM

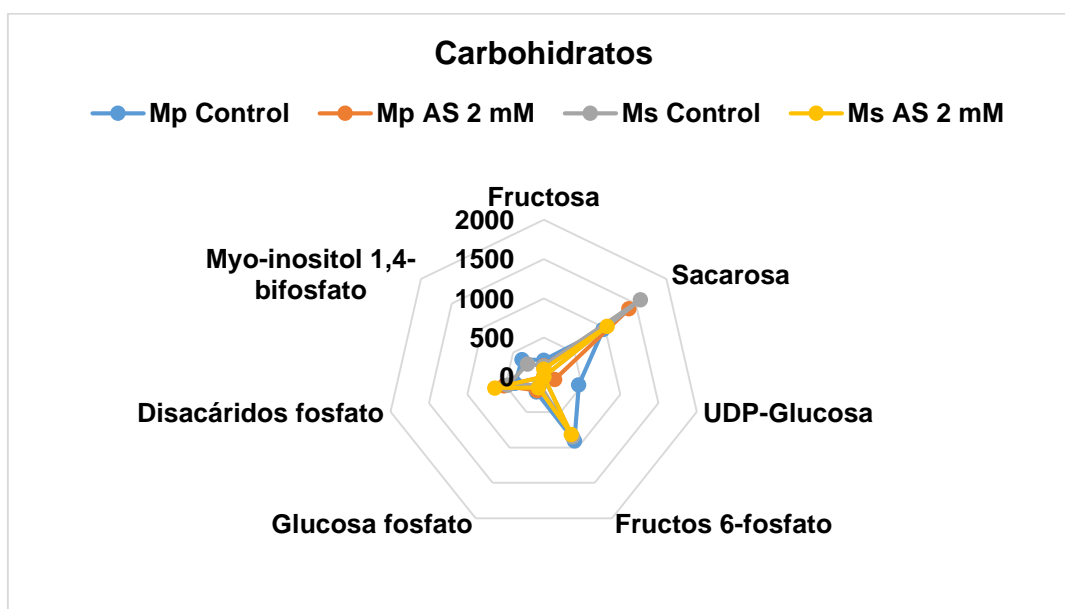


Figura 13. Carbohidratos presentes en infusiones de hierbabuena *Mentha piperita* y *Mentha spicata* tratada con AS 2 mM.

El contenido de ácidos orgánicos se muestra en la Figura 14, respecto a las infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) tratada con ácido salicílico 2 mM, el ácido orgánico mayoritario fue el ácido quínico, la infusión *Mp*

Control fue la que presentó el mayor contenido de este, seguida por la infusión de *Mp* AS 2 mM, *Ms* AS 2 mM y *Ms* Control respectivamente. En el caso de *Mp* el tratamiento con ácido salicílico disminuyó el ácido quínico un 12% con respecto a las infusiones de plantas control, mientras que aumento el ácido dehidrofaseico b-glucopiranososa ester y el ácido glucárico un 19.5 y 15% respectivamente.

Por otro lado, en las infusiones de *Ms* tratada con AS 2 mM se observó una disminución del ácido glucárico un 13.4% y un incremento de ácido ascórbico, ácido quínico y ácido málico en un 13.9, 24.1 y 11.9% respectivamente.

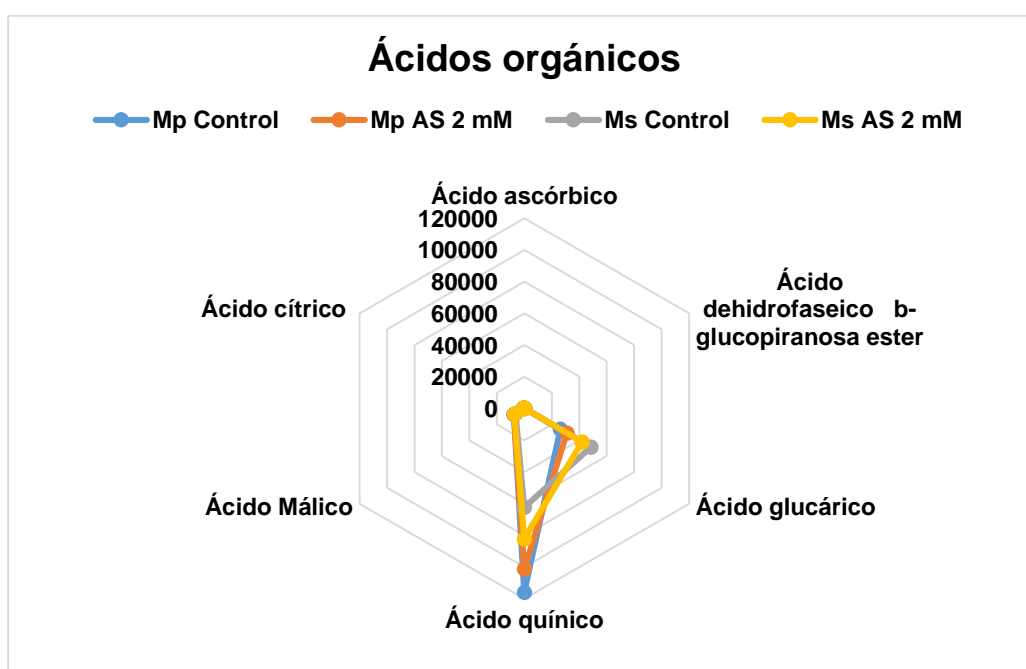


Figura 14. Ácidos orgánicos presentes en infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) tratada con AS 2 mM

6.4 Determinación de la capacidad antioxidantes de las infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) tratada con ácido salicílico

El poder antioxidante es la capacidad que tiene un compuesto antioxidante de atrapar radicales libres, los principales responsables de esta capacidad antioxidante son los compuestos fenólicos, específicamente los ácidos fenólicos,

como el ácido cafeico en sus formas libres y esterificadas y distintos flavonoides (Yu *et al.*, 2004; Naczk & Shahidi, 2006)

La capacidad antioxidante puede ser medida mediante dos tipos de ensayos: 1) los que se basan en la transferencia de electrones, en los que interviene una reacción redox, siendo el oxidante el indicador del punto final de reacción, un ejemplo de este tipo es el ensayo DPPH*; 2) los basados en la transferencia de átomos de hidrógeno en los que se lleva a cabo una cinética de reacción, en la cual intervienen un generador de radical libre (AAPH), una prueba molecular oxidable (floreseína) y un antioxidante, ejemplo de este tipo de ensayos es la capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC-FL) (Huang *et al.*, 2005).

En el Cuadro 14 se muestran los resultados de la actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH* y ORAC-FL, las infusiones de Mp tratada con ácido salicílico 2 mM presentaron un aumento del 24% y 31.64% con respecto a las infusiones de plantas control no tratadas, en DPPH* y ORAC respectivamente, este efecto podría atribuirse al aumento en los compuestos fenólicos. Respecto a las infusiones de Ms tratada con ácido salicílico 2 mM no mostraron diferencia significativa con respecto a las infusiones de plantas no tratadas, esto mediante el ensayo DPPH*, mientras que en el ensayo de ORAC presentaron un aumento del 41.36%, dichos resultados pueden ser atribuido al aumento de ácido clorogénico y hesperidina. Se ha reportado la capacidad antioxidantes de soluciones acuosas de hojas de *Mentha piperita*, *Mentha aquatica* y *Mentha spicata* mediante el método de ORAC-FL, dando como resultado 15.84, 19.80 y 8.10 μM equivalente de trolox por g en peso fresco de estos materiales (Zheng y Wang, 2001), mientras que los resultados obtenidos en nuestro estudio son de 33.24 para Mp y 18.24 μM equivalente de trolox por mL de infusión para M. spicata, las infusiones son preparadas con material seco. La capacidad antioxidante de infusiones herbales está relacionada con el contenido de compuestos fenólicos que estas contengan (Zheng y Wang, 2001).

Los compuestos fenólicos que poseen mayor capacidad antioxidante son los ácidos fenólicos y flavonoides (Kahkonen *et al.*, 1999). Se ha reportado que los ácidos fenólicos son los principales antioxidantes naturales en plantas, tales como, el

ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido vanílico. Por otro lado, los flavonoides son el grupo de compuestos fenólicos más amplio, en general, los flavonoides que contienen múltiples grupos hidroxilo tienen mayor actividad antioxidante contra radicales peróxido que la que tienen los ácidos fenólicos. La quercetina es uno de los flavonoides a los que más se les atribuye esta cualidad. Sin embargo, los glucósidos flavonoides (incluidos rutina, naringina y hesperidina) generalmente tienen valores bajos de ORAC (Robards *et al.*, 1999).

Cuadro 14. Efecto de la aplicación foliar de ácido salicílico 2 mM sobre la actividad antioxidante de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*)

Determinación	<i>Mentha piperita</i>		<i>Mentha spicata</i>	
	Control	AS 2 mM	Control	AS 2 mM
DPPH* ($\mu\text{g/mL}$ Eq. Trolox)	10.38 \pm 0.04 ^B	13.66 \pm 0.02 ^A	10.43 \pm 0.03 ^a	10.51 \pm 0.04 ^a
ORAC (μM Eq. Trolox)	33.24 \pm 2.79 ^B	48.63 \pm 2.51 ^A	18.24 \pm 0.26 ^b	31.11 \pm 1.5 ^a

Resultados son expresados como la media \pm EE (n=4). ET: equivalentes de trolox, AS: ácido salicílico. Letras diferentes por renglón indican diferencias entre tratamientos minúsculas para *Mentha piperita* y mayúsculas para *Mentha spicata* ($\alpha=0.05$, prueba de t de Student). ET: Equivalentes de trolox

6.5 Propiedades fisicoquímicas de las infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) tratadas con ácido salicílico

6.5.1 Color

El color y la apariencia son las primeras características percibidas por el consumidor en cuanto a alimentos y bebidas. La colorimetría es una de las técnicas más utilizada en la industria alimentaria, esta técnica cuantifica el color mediante la medición de tres componentes de colores primarios de luz que son vistos por el ojo humano, específicamente el rojo, el verde y el azul. El saber estos datos es importante para ajustar los componentes que dan el color de alimentos y bebidas y funcionan como una medida de la calidad.

El Cuadro 15 muestra las diferencias significativas de color en las infusiones de *Mentha piperita* y *Mentha spicata* de plantas tratadas con AS 2 mM y sus controles no tratados. Las infusiones de Mp control mostraron mayor luminosidad, coloración más roja, tonalidad más amarilla y una mayor saturación con respecto a las

infusiones de las plantas tratadas con AS 2 mM, estas últimas mostraron una tendencia a coloraciones verdes y mayor ángulo de matiz, es decir también se inclinan hacia las tonalidades amarillas. Por otro lado las infusiones de Ms tratadas con AS 2 mM mostraron coloración más roja, saturación y ángulo de matiz más alto es decir, estas tienden también a las coloraciones amarillas. Las infusiones de las plantas control mostraron mayor luminosidad.

Cuadro 15. Determinación de color de infusiones de hierbabuena *Mentha piperita* y *Mentha spicata*, elicitada con ácido salicílico 2 mM

Tratamiento	Color				
	L*	a*	b*	C*	h
Mp Control	10.9 ± 0.9A ^a	9.9 ± 0.1 ^a	13.6 ± 0.4 ^a	17.7 ± 0.5 ^a	48.9° ± 1.3 ^b
Mp AS 2 mM	7.8 ± 0.2 ^b	8.8 ± 1.5 ^b	11.4 ± 0.8 ^b	15.3 ± 0.1 ^b	52.4° ± 3.1 ^a
Ms Control	10.8 ± 1.1 ^A	3.5 ± 0.0 ^B	5.5 ± 3.9 ^A	3.6 ± 0.0 ^B	13.6° ± 2.4 ^B
Ms AS 2 mM	5.7 ± 1.2 ^B	9.7 ± 0.5 ^A	9.0 ± 1.0 ^A	13.2 ± 0.3 ^A	42.7° ± 5.1 ^A

Resultados son expresados como la media ± DE (n=3). Letras diferentes por columna indican diferencias entre tratamientos minúsculas para *Mentha piperita* (Mp) y mayúsculas para *Mentha spicata* (Ms) ($\alpha=0.05$, prueba de t de Student).

Los principales pigmentos en las hojas de las plantas son las clorofilas que se caracterizan por su coloración verde, a mayor coloración verde, mayor cantidad de cloroplastos y por ende mayor cantidad de compuestos clorofílicos, los cuales han sido relacionados con las propiedades funcionales y contenido de antioxidantes de extractos de algunas plantas (Broin, 2006). Mientras que las pigmentaciones amarillas se deben a los carotenos, una tendencia mayor hacia totalidades amarillas de un extracto o infusión, se le atribuye a una mayor proporción de carotenoides.

6.5.2 Azúcares y acidez titulable

La determinación de moléculas de azúcares presentes en infusiones obtenidas de plantas de hierbabuena (Mp y Ms) tratadas con ácido salicílico y sus controles sin tratar, se muestra en el Cuadro 16 donde se observó que en ninguna de las infusiones hay presencia de sólidos solubles en la determinación de °Brix.

Debido a que las infusiones de hierbabuena (Mp y Ms) no presentaron sólidos solubles (azúcares), se consideran como bebidas saludables, por lo que se

recomienda la incorporación a nuestra dieta, además de su alto contenido de otros tipos de compuestos con beneficios a la salud.

La acidez es un parámetro importante para la estabilidad y vida de una bebida funcional, esta puede percibirse en el brillo e intensidad de color, siendo principalmente causada por la presencia de ácidos orgánicos (Alcalá, 2007). Las infusiones preparadas a partir de las plantas de hierbabuena Ms no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de acidez titulable determinado, los cuales estuvieron entre 0.2% para infusiones obtenidas de plantas sin tratamiento y 0.17% para infusiones resultantes de plantas tratadas con ácido salicílico 2 mM.

Las infusiones preparadas con plantas de Mp sí mostraron diferencias en los porcentajes de acidez determinados, obteniendo 0.14 y 0.21% las infusiones control y las infusiones de plantas tratadas con ácido salicílico 2 mM respectivamente (Cuadro 16). Esto puede ser atribuido a cambios en el perfil de los ácidos orgánicos encontrados en esta planta. Se reportó el contenido de ácidos orgánicos presentes en la Mp, el cual incluye el ácido láctico, málico, acético, succínico, treónico y tartárico. Además, se evaluó el efecto del ácido salicílico, aplicado a plantas de hierbabuena (Mp) y se observó, que en las infusiones resultantes, disminuía de manera significativa la expresión de algunos ácidos orgánicos como el ácido láctico (Figueroa-Pérez *et al.*, 2014).

Cuadro 16. Determinación de acidez titulable y grados brix de las infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) tratada con ácido salicílico 2 mM

Tratamiento	°Brix	Acidez titulable (%)
Mp Control	ND	0.14 ± 0.03X10 ⁻⁰⁵ b
Mp AS 2 mM	ND	0.21 ± 0.03X10 ⁻⁰⁵ a
Ms Control	ND	0.20 ± 0.06X10 ⁻⁰⁵ A
Ms AS 2 mM	ND	0.17 ± 0.04X10 ⁻⁰⁵ A

Los resultados son expresados como la media ± DE (n=3). Letras diferentes indican diferencias entre tratamientos, letras minúsculas para *Mentha piperita* (Mp) y mayúsculas para *Mentha spicata* (Ms) ($\alpha=0.05$, prueba de t de Student).

6.6 Efecto de las infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) tratada con ácido salicílico 2 mM sobre el peso corporal

La ganancia de peso corporal es un factor que se desarrolla cuando el consumo de energía supera al gasto, provocando un estado de obesidad que conlleva a las patologías relacionadas con esta. La importancia de reducir el aumento de peso corporal es fundamental en el tratamiento de la obesidad. En este estudio se monitoreo la ganancia de peso corporal semanalmente para determinar el efecto que tienen las infusiones hierbabuena (Mp y Ms) tratada con ácido salicílico 2 mM sobre este factor.

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa de 138 g en la ganancia de peso entre las ratas del grupo obeso y las ratas del grupo sano. El efecto de las infusiones de hierbabuena (Mp y Ms) elicitada con ácido salicílico 2 mM sobre la ganancia de peso se puede observar en la Figura 15. Las ratas obesas tratadas con las infusiones de hierbabuena no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto a las ratas obesas no tratadas. Esto coincide con lo reportado por Lomelí (2011), quien administró infusiones comerciales de Ms *ad libitum* durante 12 semanas de modo preventivo (desde la semana 1) y tampoco encontró diferencia en la ganancia de peso en ratas macho Sprague Dawley alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa.

De igual manera, Badal y colaboradores (2011) reportaron el efecto sobre la ganancia de peso de ratas hembra Sprague Dawley, suplementadas con fructosa, al consumir extracto acuoso seco de hojas de hierbabuena Mp (51.5 g de hojas en 500 ml de agua filtrado y secado) administrado en su agua de uso, en dosis de 100 mg/kg y 250 mg/kg, este experimento tuvo una duración de tres semanas durante las cuales se administró el tratamiento de manera preventiva, los resultados obtenidos mostraron que la dosis de menor concentración no tuvo efecto sobre la ganancia de peso, mientras que la dosis más alta si mostró una disminución significativa en este parámetro.

Por otro lado, Barbalho y colaboradores 2009, reportaron que una dosis de infusión de Mp (100 g de hojas en 1000 mL filtrado y seco) de 290 mg/kg administrada dos veces al día durante 30 días de manera preventiva, a ratas hembra

Wistar obesas, suplementadas con grasa saturada y aceite de soja, disminuye el porcentaje de ganancia de peso corporal de estas.

Estos resultados muestran que al aumentar la concentración de hierbabuena administrada a las ratas se puede reducir la ganancia de peso, sin embargo hay estudios que muestran que la administración de infusiones de Mp y Ms en concentraciones superiores de 1% (concentración administrada en este estudio) tienen efecto peroxidativo de lípidos y daño hepático (Akdogan *et al.*, 2004) y de igual manera, únicamente para *Mentha spicata*, se reportó un efecto nefrotóxico (Akdogan *et al.*, 2003), además la concentración de 1% es la utilizada en las infusiones comerciales aceptadas por el consumidor.

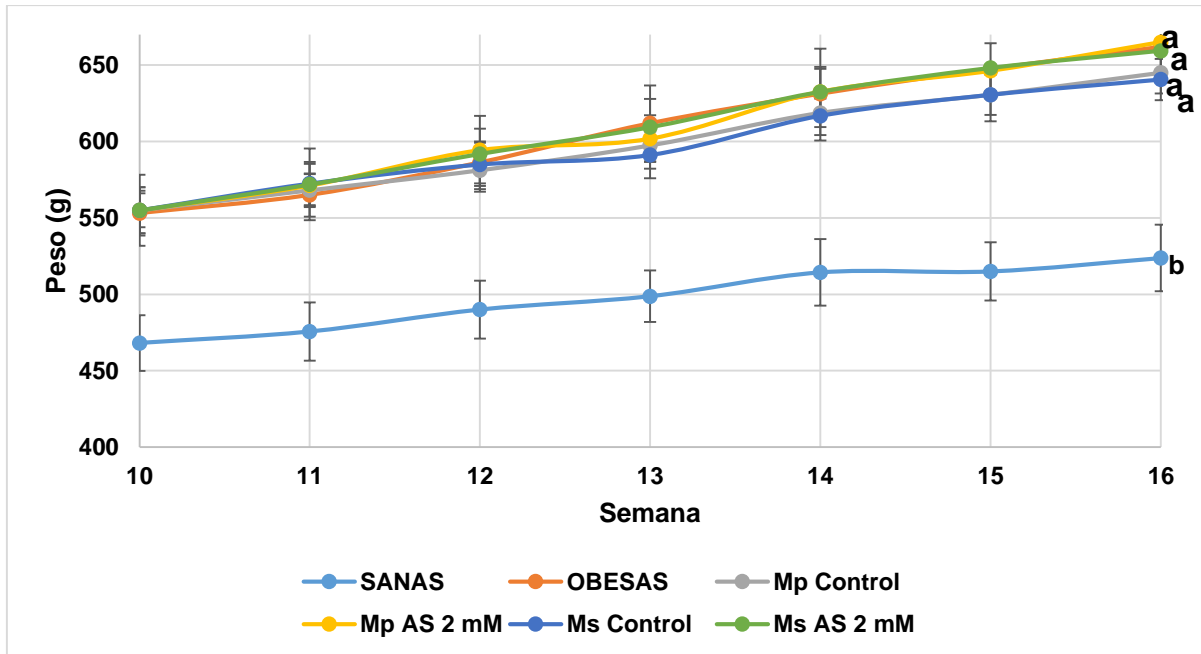


Figura 15. Efecto del consumo de infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) tratada con ácido salicílico 2 mM sobre la ganancia de peso de ratas macho Wistar obesas. Resultados son expresados como la media \pm EE (n=4). Letras diferentes indican diferencia entre tratamiento ($\alpha=0.05$, prueba de Tukey).

6.7 Efecto de las infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) tratada con ácido salicílico sobre concentración de lípidos en suero de ratas obesas

El perfil de lipídico en sangre es un factor importante a medir, el cual puede asociarse con alteraciones metabólicas de riesgo para la salud. En el presente estudio se determinó el efecto del consumo de infusiones de hierbabuena (Mp y Ms) tratada con ácido salicílico (AS) 2 mM sobre la concentración de colesterol total, LDL-c, HDL-c y triglicéridos en suero de ratas macho Wistar obesas inducidas con dieta alta en grasa y fructosa (Cuadro 17). Se lograron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de todos los parámetros medidos, entre las ratas del grupo sano y las ratas del grupo obeso, esto nos indica que se logró alterar el metabolismo de las ratas de los grupos obesos con la dieta alta en grasa y fructosa.

Respecto al colesterol total, se observó un incremento de 60.5% en las ratas obesas comparado con las sanas, mientras que las infusiones control de ambas variedades mostraron una disminución significativa de colesterol total en suero del 64% dado por las infusiones de Mp y 58% por las infusiones de Ms, esto comparado contra las ratas obesas no tratadas. De igual manera las infusiones de hierbabuena, de ambas variedades, tratada con AS 2 mM mostraron disminución de colesterol del 46 y 47% para Mp y Ms respectivamente, mostrando diferencia contra el grupo obeso pero no contra los grupos obesos tratados con sus infusiones de plantas no tratadas. Por lo tanto no se potenció el efecto de las infusiones al tratar las plantas de hierbabuena con ácido salicílico 2 mM.

Por otro lado, en la cuantificación de lipoproteínas de baja densidad (LDL-c) también se encontró diferencia significativa entre el grupo sano y el grupo obeso, pero ninguno de los tratamientos mostró efecto significativo sobre este parámetro. Mientras que en la cuantificación de lipoproteína de alta densidad (HDL-c) se observó un descenso en el grupo obeso del 33.8% respecto al grupo sano, los tratamientos de Mp control y Ms control mostraron un aumento estadísticamente significativo del 27.5 y 29.4% con respecto al grupo obeso, mientras que los

tratamientos con infusiones de hierbabuena tratada con AS 2 mM no mostraron diferencia estadística significativa, mostrando un 18.2% para la Mp y 22.4% para Ms.

En la concentración de triglicéridos, el grupo obeso presentó niveles más alto, hasta de un 38.2%, respecto al grupo sano, mientras que el tratamiento que mostró mayor diferencia fue la infusión de Ms control, disminuyendo un 38% este parámetro, seguido por el tratamiento Ms AS 2 Mm con una disminución del 25% y Mp AS 2 mM con un 20%, el tratamiento Mp control no mostró diferencia significativa. Figueroa-Pérez y colaboradores (2015) reportaron el efecto hipotrigliceridémico de las infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita*) elicitada con ácido salicílico 2 mM, mostrando en su estudio que esta disminuye la concentración sérica de triglicéridos hasta un 44% comparada contra un control diabético, en un modelo de diabetes inducida con estreptozotocina.

El efecto hipolipidémico de hierbabuena se puede atribuir a compuestos fenólicos como la hesperidina que disminuye la absorción de lípidos a nivel de intestino (Kawaguchi *et al.*, 1997). Sin embargo, en este estudio, los tratamientos que contenían más hesperidina no son los que mostraron mayor efecto; por lo tanto, dicho efecto podría estar asociado a otro tipo de compuestos como ácido rosmarínico dímero.

Cuadro 17. Efecto del consumo de infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) tratada con ácido salicílico 2 mM sobre el contenido de lípidos en suero de ratas macho wistar obesas.

			<i>Mentha piperita</i>		<i>Mentha spicata</i>	
	Sanas	Obesas	Control	AS 2 mM	Control	AS 2mM
Colesterol	30.1±6.6 ^b	76.3±6.1 ^a	27.3±4.2 ^b	41.02±12.2 ^b	40.6±13.4 ^b	31.4±3.8 ^b
LDL-c	24.3±5.2 ^b	53.33±8.2 ^a	28.57±1.25 ^{ab}	32.11±8.0 ^{ab}	51.3±15.6 ^{ab}	43.9±12.1 ^{ab}
HDL-c	26.3±1.3 ^a	17.4±0.9 ^b	24.02±1.5 ^a	21.3±1.1 ^{ab}	24.6±2.4 ^a	22.4±1.2 ^{ab}
Triglicéridos	57.1±2.2 ^c	92.4±7.1 ^a	81.7±7.5 ^{abc}	73.3±7.7 ^{bc}	57.3±7.4 ^c	68.9±7.2 ^{bc}

Resultados son expresados como la media ± EE (n=6). mg dL⁻¹. Diferentes letras por renglón representan diferencia significativa entre tratamientos ($\alpha=0.05$, prueba de Tukey).

6.8 Efecto de las infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) tratada con AS sobre la glicemia en suero de ratas obesas y resistencia a la insulina

La obesidad puede dar paso a resistencia a la insulina, la cual es considerada un factor de riesgo para padecer diabetes mellitus tipo 2, directamente relacionada con la actividad de las células beta del páncreas. Por lo tanto es importante la cuantificación de parámetros como la concentración de glucosa e insulina en suero, y a partir de estas evaluar la resistencia a la insulina. El acrónimo HOMA-IR representa las siglas en inglés del modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina (“homeostatic model assessment”), este valora si existe un bloqueo periférico a la acción de la insulina y evalúa indirectamente la función de las células beta del páncreas.

En el Cuadro 18 se muestran los resultados de estos parámetros. En el cual se puede observar que existe un aumento de glucosa significativo del grupo obeso del 29.04% con respecto al grupo sano. También nos muestra que la concentración de glucosa solo fue reducida por las infusiones de Mp, disminuyendo un 30 y 33% los tratamientos de Mp AS 2mM y Mp control respectivamente, esto comparado contra el grupo obeso, dicho efecto también demostrado por Figueroa-Pérez y colaboradores (2015) quienes reportaron una reducción de glucosa sérica de 25% comparada con un grupo diabético, efecto obtenido por infusiones de Mp tratada con ácido salicílico sobre ratas macho Wistar diabéticas inducidas con estreptozotocina.

De igual manera se muestra la concentración de insulina, la cual tuvo diferencia significativa del 84% entre los grupos obeso y sano, pero no mostró diferencias entre los tratamientos y el grupo obeso, es decir los tratamientos no mostraron efecto sobre el contenido de insulina en suero de ratas obesas.

El índice HOMA fue 87.7% mayor en los animales con sobrepeso comparado con los animales control. Los tratamientos con infusiones de hierbabuena Mp Control y Mp AS 2 mM disminuyeron este parámetro un 33% y 24% respectivamente, mientras que las infusiones de Ms tratada redujeron un 25% índice el HOMA-IR, estas reducciones no fueron estadísticamente significativas, pero

biológicamente sí podrían serlo, al reducir este parámetro se puede decir que se redujo el grado de resistencia a la insulina que mostraban las ratas del modelo experimental.

Cuadro 18. Cuantificación de glucosa e insulina en suero de ratas obesas y determinación de HOMA-IR

			<i>Mentha piperita</i>		<i>Mentha spicata</i>	
	Sanas	Obesas	Control	AS 2 mM	Control	AS 2mM
Glucosa^A	94.8±9.4 ^b	133.6±6.0 ^a	89.8±5.6 ^b	92.9±14.2 ^b	109.37±9.5 ^{ab}	112.5±9.0 ^{ab}
Insulina^B	0.74±0.0 ^b	4.77±0.3 ^a	4.46±0.2 ^a	4.15±0.3 ^a	5.10±0.9 ^a	3.79±0.6 ^a
HOMA-IR	0.30±0.0 ^b	2.44±0.1 ^a	1.63±0.0 ^a	1.84±0.1 ^a	2.28±0.4 ^a	1.82±0.3 ^a

Resultados son expresados como la media ± EE (n=6). A: [mg dL⁻¹] y B: [ng dL⁻¹]. Diferentes letras por renglón representan diferencia significativa entre tratamientos ($\alpha=0.05$, prueba de Tukey).

Se ha mostrado que los metabolitos secundarios de las plantas, principalmente compuestos fenólicos, ejercen su efecto hipolipidémico e hipoglicémico a través de diferentes mecanismos (Gómez Juaristi, 2015), y como se mostró anteriormente, los tratamientos con elicitores durante el cultivo de las plantas de hierbabuena pueden aumentar la concentración de alguno de estos compuestos como ácido rosmarínico, hesperidina y naringenina presentes en las infusiones, de igual manera se reportó que la aplicación de elicitores aumenta la concentración de otros compuestos como saponinas y alcaloides a los cuales también se les atribuyen estos efectos (Figueroa-Pérez *et al.*, 2015).

6.9 Efecto de las infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) tratada con ácido salicílico 2 mM sobre la esteatosis hepática

La esteatosis hepática no alcohólica es una de las enfermedades del hígado con mayor prevalencia en México. Se caracteriza por la acumulación de triglicéridos en el hígado e incluye un amplio espectro de daño histopatológico que va desde hígado graso simple, esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis y finalmente a la cirrosis que puede progresar a carcinoma hepatocelular y conducir a la muerte.

En este estudio se trabajó con un modelo de obesidad inducido con dieta alta en grasa y fructosa ya que la esteatosis hepática no alcohólica está

cercanamente relacionada con el síndrome metabólico y la resistencia a la insulina (Kucera y Cervinkova, 2014).

Los análisis histopatológicos son el mejor estándar para evaluar con precisión el grado de esteatosis hepática. En la Figura 16 se muestran una fotografía (300X) representativa por grupo del estudio histopatológico realizado.

El grupo sano mostró grado de esteatosis 0, es decir, no hubo acumulación de triglicéridos mayor al 5% en los hepatocitos de este grupo. Por otro lado el grupo obeso tuvo grado de esteatosis de 4, presentando una acumulación de triglicéridos mayor al 66% de hepatocitos en las ratas de este grupo, demostrando que la dieta administrada produjo un grado significativo de esteatosis (Figura 16 a y b). Mientras que las infusiones de Mp mostraron grado de esteatosis de 3 para la infusión de plantas control (Figura 16 c) y de 2 para la infusión de plantas tratadas con ácido salicílico 2 mM (Figura 16 d). El tratamiento que mostró un mayor efecto protector sobre este parámetro fue el de las infusiones de hierbabuena Ms tratada con ácido salicílico 2 mM (Figura 16 f), el cual mostró un grado de esteatosis 1, que es referente a un 33% de acumulación de triglicéridos en hepatocitos, la infusión de plantas control de este tratamiento (Ms Control) tuvo un grado de esteatosis de 2 (Figura 16 e). Para esta alteración se observó una mejoría con las plantas elicidadas con ácido salicílico comparada con las hierbabuenas control.

La esteatosis hepática comienza con la acumulación de triglicéridos en el hígado. Estos lípidos fueron determinados en tejido hepático y en la Figura 17 se muestra los resultados obtenidos. Primeramente se observa que el grupo sano tiene una diferencia estadísticamente significativa contra el grupo obeso del 66% teniendo 31.87 y 93.89 mg/g de tejido hepático respectivamente. Todas las infusiones de hierbabuena redujeron la concentración de triglicéridos en tejido hepático dando como resultado una disminución del 38.3 y 33.0% para las infusiones de Mp control y tratada con AS 2 mM respectivamente y por otro lado las infusiones de Ms control disminuyeron un 29.8% y las tratadas con AS 2 mM un 43.0%, siendo estas últimas las que mostraron una mayor reducción.

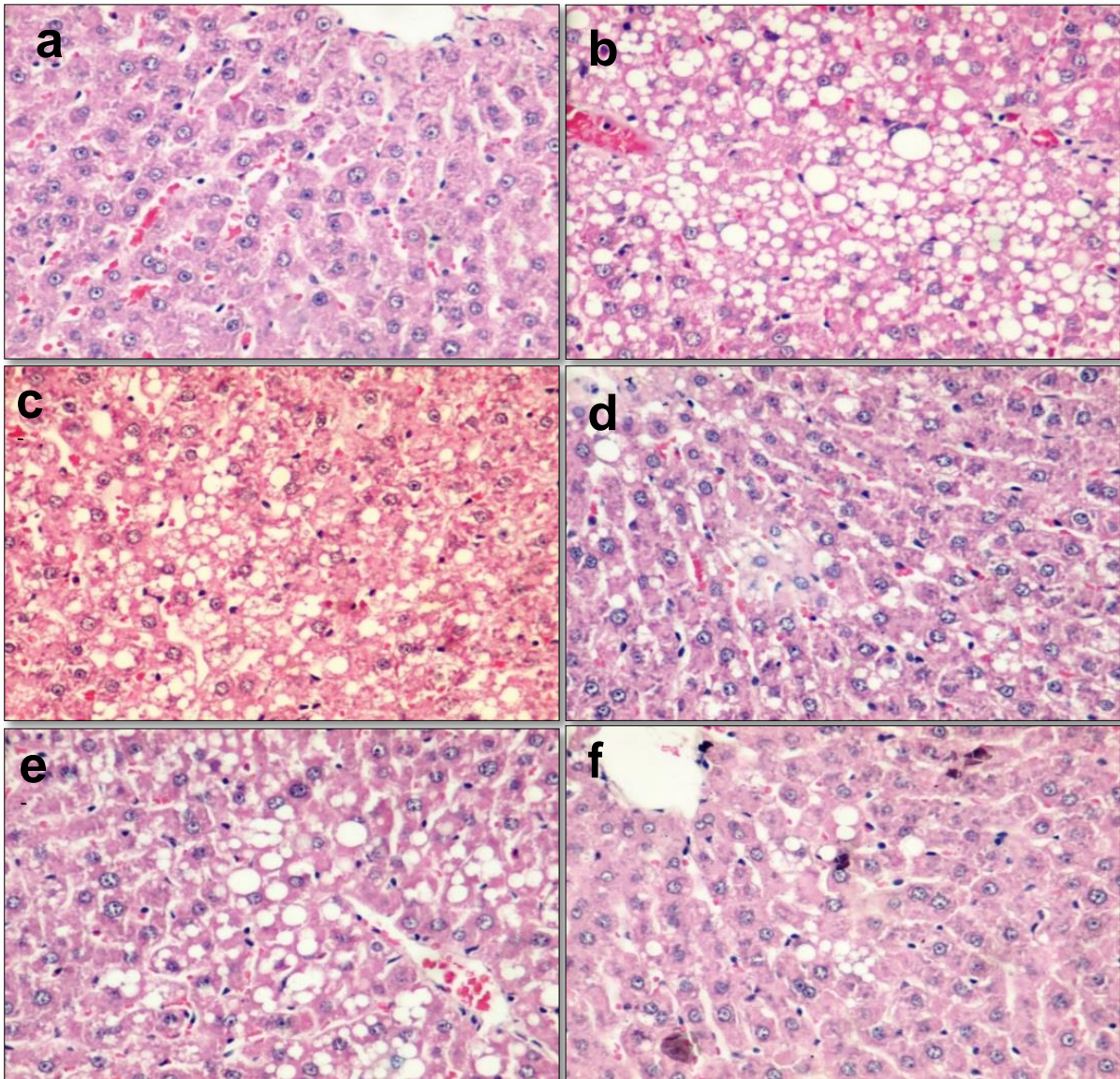


Figura 16. Cambios histológicos en el tejido hepático: a) Sanas, b) Obesas, (c) Obesas con infusión *Mentha piperita* control, (d) Obesas con infusión *Mentha piperita* ácido salicílico 2 mM, (e) Obesas con infusión *Mentha spicata* control, (f) Obesas con infusión *Mentha spicata* ácido salicílico 2 mM.

Estos resultados pueden estar relacionados con la capacidad reportada para las infusiones de hierbabuena de disminuir triglicéridos, y esto se ha asociado con los compuestos de la hierbabuena como lo son algunas saponinas y flavonoides como la hesperidina y la naringenina, a estos compuestos se les atribuyen diferentes mecanismos de acción como lo son la capacidad de inhibir la lipasa pancreática y por lo tanto, la absorción de triglicéridos en los intestinos o debido a su efecto para

formar micelas con sales biliares (Kawaguchi *et al.*, 1997; Das *et al.*, 2012; Figueroa-Pérez *et al.*, 2015).

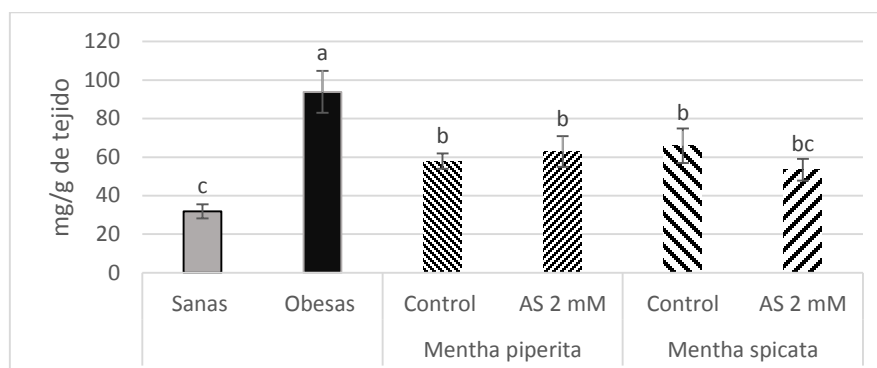


Figura 17. Efecto del consumo de infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) tratada con ácido salicílico (AS) 2 mM sobre el contenido de triglicéridos en hígado de ratas macho Wistar obesas. Resultados son expresados como la media \pm EE (n=4) ($\alpha=0.05$, prueba de Tukey).

7. CONCLUSIONES

1. La aplicación foliar de soluciones de quitosano y ácido salicílico no afecta el crecimiento de las plantas de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) cultivadas en invernadero.
2. La aplicación foliar de AS 2 mM a las plantas de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) cultivadas en invernadero fue el mejor tratamiento para la inducción de algunos compuestos fenólicos y flavonoides, presentando una mejor respuesta las plantas de *Mentha spicata*, la inducción de estos compuestos podría estar relacionado a la mejora de las infusiones para neutralizar radicales peroxilo (ensayo ORAC).
3. Las infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) control y tratadas con AS 2 mM, en concentración de 1%, no disminuyen la ganancia de peso corporal de las ratas obesas, pero si mejoran la esteatosis hepática, siendo la infusión de Ms AS 2 mM la que mostró los mejores beneficios.
4. *Mentha piperita* control mejoró la resistencia a insulina y *Mentha spicata* los triglicéridos en sangre, estos efectos no fueron potenciados por el tratamiento de infusiones de las plantas tratadas con AS 2 mM.
5. El tratamiento con ácido salicílico y quitosano sobre las plantas de hierbabuena bajo las condiciones del cultivo utilizadas en este estudio, no favorecen la inducción de compuestos fenólicos que mejoren los beneficios a la salud relacionados con obesidad y algunas de sus complicaciones, presentando únicamente mejoría sobre la esteatosis hepática.

8. REFERENCIAS

Abd, F Gharib, L. (2007). Effect of salicylic acid on the growth, metabolic activities and oil content of basil and marjoram. *International Journal of Agriculture & Biology*, 9:2.

Amaya-Cruz, D. M., Rodríguez-González, S., Pérez-Ramírez, I. F., Loarca-Piña, G., Amaya-Llano, S., Gallegos-Corona, M. A., & Reynoso-C amacho, R. (2015). Juice by-products as a source of dietary fibre and antioxidants and their effect on hepatic steatosis. *Journal of Functional Foods*, 17, 93-102.

Areias, F. M., Valentao, P., Andrade, P. B., Ferreres, F., & Seabra, R. M. (2001). Phenolic fingerprint of peppermint leaves. *Food chemistry*, 73(3), 307-311.

Apostolidis, E., Kwon, Y. I., & Shetty, K. (2007). Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(1), 46-54.

Akdogan, M., KWIWnc, I., Oncu, M., Karaoz, E., & Delibas, N. (2003). Investigation of biochemical and histopathological effects of *Mentha piperita L.* and *Mentha spicata L.* on kidney tissue in rats. *Human & experimental toxicology*, 22(4), 213-219.

Akdogan, M., Ozguner, M., Aydin, G., & Gokalp, O. (2004). Investigation of biochemical and histopathological effects of *Mentha piperita L. abiatae* and *Mentha spicata Labiatae* on liver tissue in rats. *Human & experimental toxicology*, 23(1), 21-28.

Badal, R. M., Badal, D., Badal, P., Khare, A., Shrivastava, J., & Kumar, V. (2011). Pharmacological action of *Mentha piperita* on lipid profile in fructose-fed rats. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 10(4), 843.

Barbalho, S. M., Spada, A. P. M., Oliveira, E. P. D., Paiva-Filho, M. E., Martuchi, K. A., Leite, N. C., ... & Oshiiwa, M. (2009). *Mentha piperita* effects on wistar rats plasma lipids. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(5), 1137-1143.

Barbalho, S. M., Damasceno, D. C., Spada, A. P. M., Silva, V. S. D., Martuchi, K. A., Oshiiwa, M., & Mendes, C. G. (2011a). Metabolic profile of offspring from diabetic Wistar rats treated with *Mentha piperita* (peppermint). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.

Barbalho, S. M., Machado, F. M. V. F., Oshiiwa, M., Abreu, M., Guiger, E. L., Tomazela, P., & Goulart, R. A. (2011b). Investigation of the effects of peppermint (*Mentha piperita*) on the biochemical and anthropometric profile of university students. *Food Science and Technology (Campinas)*, 31(3), 584-588.

Benavente-Garcia, O., & Castillo, J. (2008). Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6185-6205

Bhaskaran, M., Reddy, K., Radhakrishanan, N., Franki, N., Ding, G., & Singhal, P. C. (2003). Angiotensin II induces apoptosis in renal proximal tubular cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 284(5), F955-F965.

Bohn T. (2014). Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews*, 72:429-452.

Boque, N. (2014). Investigación de extractos ricos en polifenoles con actividad protectora frente al desarrollo de la obesidad: mecanismos nutrigenómicos implicados.

Bravo L. (1998) Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56(11):317-333.

Browning, J. D.; Szczepaniak, L. S.; Dobbins, R.; Horton, J. D.; Cohen, J. C.; Grundy, S. M. y Hobbs, H. H. (2004). Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*, 40:1387-1395.

Cao, H., Cheng, W. X., Li, C., Pan, X. L., Xie, X. G., & Li, T. H. (2005). DFT study on the antioxidant activity of rosmarinic acid. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 719(1), 177-183.

Chang, J. H.; J. H. Shin, I. S. Chung and H. J. Lee. (1998). Improved menthol production from chitosan-elicited suspension culture of *Mentha piperita*. *Biotechnology Letters* 20: 1097–1099.

Clarke G, Ting KN, Wiart C, Fry J. (2013). High Correlation of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging, Ferric Reducing Activity Potential and Total Phenolics Content Indicates Redundancy in Use of All Three Assays to Screen for Antioxidant Activity of Extracts of Plants from the Malaysian Rainforest. *Antioxidants*, 2:1-10.

Coutinho, M. A., Muzitano, M. F., & Costa, S. S. (2009). Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual de Química*, 1(3), 241-256.

Das, T. K., Banerjee, D., Chakraborty, D., Pakhira, M. C., Shrivastava, B., & Kuhad, R. C. (2012). Saponin: Role in Animal system. *Veterinary World*, 5(4).

Duband, F., Carnat, A. P., Carnat, A., Petitjean-Freytet, C., Clair, G., & Lamaison, J. L. (1992). Aromatic and polyphenolic composition of infused peppermint, *Mentha x piperita* L. In *Annales pharmaceutiques francaises* (Vol. 50, No. 3, pp. 146-155).

Eckel, R. H. (1989). Lipoprotein lipase. *New England Journal of Medicine*, 320(16), 1060-1068.

Edreva, A., Velikova, V., Tsonev, T. Gürel, A. Aktas, L. y Gesheva, E. (2008) Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms *Gen. Appl. Plant Physiology*, 34:1, 67-78.

Elmarakby, A. A., Williams, J. M., Imig, J. D., Pollock, J. S., & Pollock, D. M. (2007). Synergistic actions of enalapril and tempol during chronic angiotensin II-induced hypertension. *Vascular Pharmacology*, 46(2), 144-151.

Elmarakby, A. A., & Imig, J. D. (2010). Obesity is the major contributor to vascular dysfunction and inflammation in high-fat diet hypertensive rats. *Clinical Science*, 118(4), 291-301.

ENGASTO- Encuesta Nacional de Gastos de los Hogares (2013). Catálogo de bienes y servicios de consumo. Instituto Nacional de Estadística y Geografía.

ENSANUT MC-Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino (2016). Informe final de resultados. Instituto Nacional de Salud Pública (Mx), 31 de octubre de 2016.

Fabbrini, E., & Magkos, F. (2015). Hepatic steatosis as a marker of metabolic dysfunction. *Nutrients*, 7(6), 4995-5019.

Ferrari, S. (2010). Biological elicitors of plant secondary metabolites: mode of action and use in the production of nutraceuticals. In *Bio-Farms for Nutraceuticals* (pp. 152-166). Springer US.

Ferreira, P. S. (2014). Atividade anti-inflamatória y antioxidante de flavonoides cítricos em camundongos submetidos a dieta indutora do estado pró-inflamatório.

Figueroa-Pérez .M. G., Rocha-Guzmán, N. E., Mercado-Silva, E., Loarca-Piña, G., & Reynoso-Camacho, R. (2014). Effect of chemical elicitors on peppermint (*Mentha piperita*) plants and their impact on the metabolite profile and antioxidant capacity of resulting infusions. *Food Chemistry*, 156, 273-278.

Figueroa-Pérez, M. G., Gallegos-Corona, M. A., Ramos-Gomez, M., & Reynoso-Camacho, R. (2015). Salicylic acid elicitation during cultivation of the peppermint plant improves anti-diabetic effects of its infusions. *Food & Function*, 6(6), 1865-1874.

Gómez C. P. L., Mora L.O., Vargas C.C.,. (2000). Lipoproteínas plasmáticas: Quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad. Programa de salud y nutrición humana. Centro de Investigación en Palma de Aceite.

Gómez Juaristi, M (2015). Metabolismo de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos de la dieta. Estudios de transporte "in vitro" y de biodisponibilidad en humanos. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Departamento de nutrición y bromatología. Madrid España

González Chávez, A. (2013). Posición de consenso sobre las bebidas con edulcorantes no calóricos y su relación con la salud. *Revista Mexicana de Cardiología*, 24(2), 55-68.

Guzmán, G. M. (2011). El mercado de las infusiones y las tisanas en México. [en línea] Consejería Agrícola de Chile en México. Disponible en: <http://www.consejagri.mx/images/boletininteligenciapdf/tes%20y%20tizanas%202011.pdf> [Acceso el 27 de abril 20016]

Halberg, N., Wernstedt-Asterholm, I., & Scherer, P. E. (2008). The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 37(3), 753-768.

Hu FB, Malik VS. (2010). Sugar-sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: epidemiologic evidence. *Physiol Behav*, 100: 47-54.

Hurtado Garay C, Meneses Garibay J, Reséndiz Castellanos J. (2012). Proyecto de investigación: Tés e infusiones. Facultad de Contaduría y Administración. Universidad Autónoma de México.

Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food chemistry*.

Kamijo, A., Kimura, K., Sugaya, T., Yamanouchi, M., Hase, H., Kaneko, T., ... & Omata, M. (2002). Urinary free fatty acids bound to albumin aggravate tubulointerstitial damage. *Kidney International*, 62(5), 1628-1637.

Kandra L, Zajacz A, Remenyik J, Gyemant G. (2005) Kinetic investigation of a new inhibitor for human salivary alpha-amylase. *Biochem Biophys Res Commun*, 334: 824-828.

Kang, G., Li, G., & Guo, T. (2014). Molecular mechanism of salicylic acid-induced abiotic stress tolerance in higher plants. *Acta physiologiae plantarum*, 36(9), 2287-2297.

Katiyar, D., Hemantaranjan, A., & Singh, B. (2015). Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. *Indian Journal of Plant Physiology*, 20(1), 1-9.

Kawaguchi, K., Mizuno, T., Aida, K., & Uchino, K. (1997). Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and *Pseudomonas*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61(1), 102-104.

Khan, M. I. R., Fatma, M., Per, T. S., Anjum, N. A., & Khan, N. A. (2015). Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Frontiers in plant science*, 6.

Khan, W., Prithviraj, B., & Smith, D. L. (2003). Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *Journal of Plant Physiology*, 160(8), 859-863.

Kucera, O., & Cervinkova, Z. (2014). Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(26), 8364–8376. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i26.8364>

Landi, L., Feliziani, E., & Romanazzi, G. (2014). Expression of defense genes in strawberry fruits treated with different resistance inducers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(14), 3047-3056.

Langhans, W. (1996). Role of the liver in the metabolic control of eating: what we know and what we do not know. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 20(1), 145-153.

Lee, S.; H. Choi, S. Suh, I. S. Doo, K. Y Oh, E. Choi, A. T. Schroeder, P. S. Low and Y. Lee. (1999). Oligogalacturonic Acid and Chitosan Reduce Stomatal Aperture by Inducing the Evolution of Reactive Oxygen Species from Guard Cells of Tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiology* 121: 147–152.

Lomelí de la R. S. A. (2011). Efecto de infusiones herbales comerciales y naturales sobre alteraciones en el metabolismo de lípidos y estrés oxidativo en un modelo de obesidad. Tesis profesional. Universidad Autónoma de Querétaro. México. 126 p.

Maliakal, P. P.; Wanwimolruk, S. (2001). Effect of herbal teas on hepatic drug metabolizing enzymes in rats. *J Pharm Pharmacol*, 53:1323–1329.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79:727-47.

Mani Badal, R., Badal, D., Badal, P., Khare, A., Shrivastava, J., & Kumar, V. (2011). Pharmacological Action of *Mentha piperita* on Lipid Profile in Fructose-Fed Rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 10(4), 843–848.

Manzur, F., Alvear, C., & Alayón, A. N. (2010). Adipocytes, visceral obesity, inflammation and cardiovascular disease. *Revista Colombiana de Cardiología*, 17(5), 207-213.

McDougall, G. J., Kulkarni, N. N., & Stewart, D. (2009). Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity in vitro. *Food Chemistry*, 115(1), 193-199.

McKay, D. L., & Blumberg, J. B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research*, 20(8), 619-633.

Moreno-Aliaga, M. J., & Martínez, J. A. (2002). El tejido adiposo: órgano de almacenamiento y órgano secretor.

Murillo, E. (2010). Estudio Antioxidantes de Bebidas. Actividad antioxidante de bebidas de frutas y de té comercializadas en Costa Rica. Instituto de Alimentación y Nutrición. Universidad de Panamá.

Nge, K. L.; N. Nwe, S. Chandkrachang and W. F. Stevens. (2006). Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. *Journal of Plant Science* 170: 1185-1190.

NOM-008-SSA3-2010 NORMA Oficial Mexicana, LA OBESIDAD, S. Y., & GENERAL, C. D. S. Para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad. Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.-Secretaría de Salud. *NORMA*, 52(999), 923-3325.

O'Hara, M., Kiefer, D., Farrell, K. Y Kemper, K. (1998). A Review Of 12 Commonly Used Medicinal Herbs. *Arch Fam Med*, 7:523-536.

Organización Mundial de la Salud (OMS), 2012.

Organización Mundial de la Salud (OMS), 2015.

Parnham, M. J., & Kesselring, K. (1985). Rosmarinic acid. *Drugs Future*, 10(9), 756-7.

Petersen, M., & Simmonds, M. S. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62(2), 121-125.

Pearce, R. B. and J. P. Ride. (1982). Chitin and related compounds as elicitors of the lignification response in wounded wheat leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 20: 119–123.

Profeco (2008). Bebidas que reaniman: Té o café (comparativo de precios). Procuraduría Federal del Consumidor. Recuperado de: <http://www.profeco.gob.mx/encuesta/brujula/pdf-2008/Bebidas%20que%20reaniman.pdf>

Raskin, I. (1992). Role of salicylic acid in plants. *Annual review of plant biology*, 43(1), 439-463.

Rivera JA, Muñoz-Hernandez O, Rosas-Peralta M, Aguilar-Salinas CA, Popkin BM, Willett W. (2008). Consumo de bebidas para una vida saludable: recomendaciones para la población mexicana. *Salud Pub Mex.* 50: 172-94.

Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food chemistry*, 66(4), 401-436.

Roesch-Dietlen, F., Dorantes-Cuéllar, A., Carrillo-Toledo, M. G., Martínez-Sibaja, C., Rojas-Carrera, S., Bonilla-Rojas, S., ... & León-Valdivieso, J. (2006). Frecuencia del hígado graso no alcohólico en un grupo de pacientes con síndrome metabólico estudiado en la ciudad de Veracruz. *Rev Gastroenterol Mex*, 71(4), 446-52.

Sasser, J. M., Pollock, J. S., & Pollock, D. M. (2002). Renal endothelin in chronic angiotensin II hypertension. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 283(1), R243-R248.

Savage, D. B., & **Semple**, R. K. (2010). Recent insights into fatty liver, metabolic dyslipidaemia and their links to insulin resistance. *Current opinion in lipidology*, 21(4), 329-336.

Shams-Ardekani MR, Hajimahmoodi M, Oveisi MR, Sadeghi N, Jannat B, Ranjbar AM, Gholam N, Moridi T. (2011). Comparative antioxidant activity and total flavonoid content of Persian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10:519-24.

Sheridan, M. A. (1988). Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 90(4), 679-690.

Singleton V, Orthofer R, Lamuela R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of the Folin-Ciocalteu reagent. *Meth Enzymol.* 299:152-178.

Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, Hatcher B, Cox CL, Dyachenko A, Zhang W, McGahan JP, Seibert A, Krauss RM, Chiu S, Schaefer EJ, Ai M, Otokozawa S, Nakajima K, Nakano T, Beysen C, Hellerstein MK, Berglund L, Havel PJ. (2009). Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Inv*, 119:1322.

SSA-Secretaria de Salud. (2008). Prevención y diagnóstico de sobrepeso y obesidad en niños y adolescentes en el primer nivel de atención. *México*, 1: 1-27.

Van den Berg R, Haenen GRMM, van den Berg H, Bast A. (1999) Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, 66:511-517.

Velásquez, C. L. (2008). Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola*, 8(1), 1-22.

Vitalini, S., Ruggiero, A., Rapparini, F., Neri, L., Tonni, M., & Iriti, M. (2014). The application of chitosan and benzothiadiazole in vineyard (*Vitis vinifera* L. cv Gropello Gentile) changes the aromatic profile and sensory attributes of wine. *Food Chemistry*, 162, 192-205.

Wang, C., Zhang, S., Wang, P., Hou, J., Qian, J., Ao, Y., ... & Li, L. (2011). Salicylic acid involved in the regulation of nutrient elements uptake and oxidative stress in *Vallisneria natans* (Lour.) Hara under Pb stress. *Chemosphere*, 84(1), 136-142.

Wang, Z., & Nakayama, T. (2010). Inflammation, a link between obesity and cardiovascular disease. *Mediators of Inflammation*.

Wellen, K. E., & Hotamisligil, G. S. (2003). Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1785.

Who, J., & Consultation, F. E. (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 916(i-viii).

Xu, C., Zhang, Y., Zhu, L., Huang, Y. y Lu, J. (2011). Influence of Growing Season on Phenolic Compounds and Antioxidant Properties of Grape Berries from Vines Grown in Subtropical Climate. *J Agric Food Chem*, 9, 1078–1086.

Yamagishi, S. I., Inagaki, Y., Okamoto, T., Amano, S., Koga, K., Takeuchi, M., & Makita, Z. (2002). Advanced glycation end product-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor and monocyte chemoattractant protein-1 in human-cultured mesangial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(23), 20309-20315.

Zheng, W; Wang, S.Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs; *J Agric Food Chem*, 49: 5165– 5170.