

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO EN
HIERBABUENA (*Mentha piperita*) SOBRE POLIFENOLES
Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE INFUSIONES”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

GONZÁLEZ MENDOZA MAYRA ESTHELA

DIRIGIDA POR

M. en C. CLAUDIA IVETTE GAMBOA GÓMEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO EN HIERBABUENA
(*Mentha piperita*) SOBRE POLIFENOLES Y CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE DE INFUSIONES”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

GONZÁLEZ MENDOZA MAYRA ESHELA

DIRIGIDA POR

M. en C. CLAUDIA IVETTE GAMBOA GÓMEZ

SINODALES

M. en C. CLAUDIA IVETTE GAMBOA GÓMEZ

DIRECTOR

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO

SINODAL

Dr. IRINEO TORRES PACHECO

SINODAL

Dra. Ma. ESTELA VÁZQUEZ BARRIOS

SINODAL

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro por facilitar el uso de sus instalaciones y poder otorgarme mi formación profesional.

A la M. en C. Claudia Ivette Gamboa Gómez que en unos meses más será toda una Doctora, por su apoyo, paciencia y por compartirme gran parte de sus conocimientos, vivencias, por defenderme y en especial por ser una gran amiga.

A la Dra. Rosalía Reynoso Camacho por permitirme realizar mi trabajo experimental en su laboratorio y por apoyarme durante la realización de este.

A la Dra. Ma. Estela Vázquez Barrios por ser una de las mejores maestras que tuve durante mis estudios y por su apoyo durante la realización de mi trabajo, sus comentarios y aportaciones para la mejora de este.

Al Dr. Irineo Torres Pacheco por sus valiosas contribuciones y comentarios para el comienzo, desarrollo y mejora de este trabajo.

A mis amigos, compañeros de carrera por los buenos momentos que pasamos en estos cuatro años y medio.

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño.

A ti DIOS que me diste la oportunidad de vivir y de regalarme una familia maravillosa, y por permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

Con mucho cariño principalmente a mis padres que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento. Gracias por todo papá y mamá por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí, por ser los pilares más importantes de mi vida y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional sin importar nuestras diferencias de opiniones, por todo esto les agradezco de todo corazón el que estén conmigo a mi lado. Los quiero con todo mi corazón y este trabajo es para ustedes.

A mis hermanos Eneida, Jesús, y Eva gracias por estar conmigo y apoyarme siempre, los quiero mucho.

A mis sobrinos Jona, Estebitan, Moni y Fer los quiero muchísimo. Porque también me ayudaron con las plantitas, aquellos fines de semana que tocaba trabajar me alegraban el día.

A mi novio César, a quien quiero infinitamente, por compartir grandes momentos conmigo y por siempre estar dispuesto a escucharme y ayudarme en cualquier momento.

No hay que confundir nunca el conocimiento con la sabiduría. El primero nos sirve para ganarnos la vida; la sabiduría nos ayuda a vivir.

Sorcha Carey

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Radicales libres y estrés oxidativo	3
2.1.1. Sistemas de defensa antioxidante	8
2.2. Compuestos fenólicos	11
2.2.1. Fenoles simples y ácidos fenólicos	12
2.2.2. Flavonoides	13
2.2.3. Taninos	15
2.2.4. Biosíntesis de compuestos fenólicos en plantas	15
2.3. Fitohormonas y su relación con estrés en plantas	15
2.4. Tipos de estrés	20
2.4.1. Estrés hídrico	21
2.5. Infusiones	23
2.6. Hierbabuena (<i>Mentha piperita</i>)	24
2.6.1. Generalidades	24
2.6.2. Condiciones climáticas de crecimiento	25
2.6.3. Compuestos bioactivos en hierbabuena	26
2.6.4. Actividad antioxidante	28
3. JUSTIFICACIÓN	30

4. HIPÓTESIS	31
5. OBJETIVOS	32
5.1. General	32
5.2. Específicos	32
6. METODOLOGÍA	33
6.1. Materiales	33
6.1.1. Compuestos químicos	33
6.1.2. Material biológico	33
6.2. Metodología experimental	33
6.3. Cuantificación de compuestos fenólicos	36
6.3.1. Obtención de infusiones	36
6.3.2. Cuantificación de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu	36
6.3.3. Cuantificación de flavonoides	37
6.4. Determinación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH	38
6.5. Determinación de la capacidad antioxidante por el método de ABTS	39
6.6. Análisis estadístico	39
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
7.1. Condiciones ambientales	40
7.2. Cambios visuales en la planta de hierbabuena sometida a estrés hídrico	40
7.3. Contenido de compuestos fenólicos totales de infusiones de hierbabuena sometida a estrés hídrico	45
7.3.1. Concentración de fenoles totales en infusiones	45
7.3.2. Concentración de flavonoides totales en infusiones	49
7.4. Capacidad antioxidante de las infusiones	51
7.4.1. Determinación de la capacidad antioxidante por el método	51

DPPH	
7.4.2. Determinación de la capacidad antioxidante por el método	54
ABTS	
8. CONCLUSIONES	61
9. REFERENCIAS	62

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Cambios en la prevalencia de enfermedades crónico degenerativas en México entre 1994 y 2006	7
2	Clasificación de los antioxidantes	8
3	Compuestos fenólicos identificados en infusiones	28
4	Temperatura ambiental, humedad relativa y precipitación pluvial registrados en Querétaro durante el mes de mayo 2011 y enero 2012	40
5	Contenido de fenoles totales de infusiones de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i>) sometidas a estrés hídrico y posterior rehidratación	48
6	Contenido de flavonoides totales de infusiones de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i>) sometidas a estrés hídrico y posterior rehidratación	50
7	Capacidad antioxidante (DPPH) de infusiones de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i>) sometidas a estrés hídrico y posterior rehidratación	53
8	Capacidad antioxidante (ABTS) de infusiones de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i>) sometidas a estrés hídrico y posterior rehidratación	56
9	Correlaciones de Pairwise para las variables de contenido total de fenoles y contenido total de flavonoides y capacidad antioxidante medido por los ensayos de DPPH y ABTS de los diferentes tratamientos de estrés hídrico sobre hierbabuena	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Mecanismo de reacción del radical superóxido	5
2	Mecanismo de reacción de enzimas antioxidantes	9
3	Ácidos hidroxicinámicos	12
4	Flavonoides	14
5	Fitohormonas	16
6	Modelo de célula oclusiva	18
7	Ruta del ácido siquímico	20
8	Diversos tipos de estrés abiótico y biótico, así como los metabolitos derivados por estos	21
9	Mecanismos fisiológicos de adaptación y supervivencia de las plantas al estrés hídrico	23
10	Hierbabuena (<i>Mentha piperita</i>)	24
11	Contenido total de los compuestos fenólicos en especies de <i>Mentha</i>	27
12	Porcentaje de inhibición de radicales (a) ABTS y (b) DPPH de extractos etanólicos de cinco variedades de <i>Mentha</i>	29
13	Esquema de la metodología	35
14	Mecanismo de reacción de 2'-aminoetildifenilborato con la rutina	37
15	Cambios visuales en la planta de hierbabuena sometida a estrés hídrico y su posterior rehidratación	42
16	Tiempos determinados para inducir los porcentajes de estrés hídrico en las plantas de hierbabuena en la estación de primavera e invierno	43
17	Plantas de hierbabuena sometidas a condiciones óptimas	44

de humedad y después de los diferentes porcentajes de
estrés hídrico

RESUMEN

En la actualidad el consumo de bebidas funcionales ricas en antioxidantes como las infusiones ha incrementado debido a sus propiedades biológicas benéficas, las cuales se han atribuido principalmente a la presencia de compuestos fenólicos. La producción de polifenoles puede incrementarse por modificaciones ambientales al cultivo, como el estrés hídrico, el cual modifica la expresión génica en la planta, afectando a enzimas involucradas en la síntesis. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del estrés hídrico en hierbabuena (*Mentha piperita*) sobre polifenoles y capacidad antioxidante de infusiones. Se evaluaron diferentes condiciones de estrés hídrico: 8%, 15%, 22% y 35% de humedad y en rehidratación (5 días). Las condiciones ambientales de cultivo fueron parcialmente controladas en dos diferentes estaciones del año (primavera e invierno). Se prepararon las infusiones al 1% y se cuantificó el contenido de fenoles totales y flavonoides. La capacidad antioxidante se evaluó con los ensayos de DPPH y ABTS. Se obtuvo un mayor efecto en la producción de compuestos bioactivos para la condición de estrés que de rehidratación. Las infusiones preparadas con las hojas sometidas a estrés de 22% de humedad presentaron la mayor concentración de compuestos fenólicos y mayor capacidad antioxidante. La aplicación de estrés hídrico en la estación de primavera tuvo mayor efecto en la producción de polifenoles que en invierno (20%). Tratamientos severos de estrés hídrico no incrementan la síntesis de compuestos fenólicos. El estrés hídrico podría ser usado como una herramienta en el cultivo de hierbabuena para el incremento de compuestos bioactivos, permitiendo incrementar el valor agregado de este cultivo y de sus productos como las infusiones.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad en nuestro país existe un incremento y prevalencia de enfermedades crónico degenerativas, las cuales están estrechamente asociadas al estrés oxidativo. El estrés oxidativo es un desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de radicales libres (RL) provocando daño oxidativo a biomoléculas como proteínas, lípidos y DNA, causando alteraciones que conllevan al desarrollo de enfermedades como aterosclerosis, diabetes y/o cáncer. De manera normal el estrés oxidativo puede ser contrarrestado por defensas endógenas antioxidantes como las enzimas glutatión peroxidasa, catalasa, entre otras. Sin embargo cuando se tiene un desequilibrio y los RL se encuentran en exceso, el consumo de antioxidantes naturales se vuelve necesario.

Entre los antioxidantes de origen natural se encuentran los polifenoles, los cuales pueden actuar como atrapadores de especies reactivas de oxígeno, protegiendo la estructura y función de las biomoléculas.

Los polifenoles son los compuestos antioxidantes más abundantes en las plantas y son producto del metabolismo secundario de éstas. Diferentes estudios han demostrado que durante el cultivo se pueden modificar condiciones ambientales, incrementado la producción de polifenoles, dando un valor agregado a estos materiales vegetales. Dentro de las modificaciones que se pueden aplicar a un cultivo para el incremento de metabolitos secundarios se encuentra el tipo de luz, temperatura, elicitores y estrés hídrico. Este último, en estudios anteriores ha demostrado tener un efecto considerable en la expresión génica de las plantas, relacionado con la producción de enzimas involucradas en la síntesis de compuestos fenólicos con conocida actividad antioxidante.

Dentro de los alimentos que contienen compuestos fenólicos y que sus cultivos pudieran ser modificados con estrés hídrico se encuentran aquellos materiales vegetales utilizados para elaborar infusiones.

La hierbabuena es uno de los materiales vegetales más utilizados en México. Su ingesta está relacionada con su efecto benéfico a la salud, atribuido al contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante. El objetivo de este trabajo es evaluar la concentración de polifenoles y la capacidad antioxidante de infusiones de hierbabuena sometida a estrés hídrico durante dos estaciones del año (primavera e invierno).

II. ANTECEDENTES

2.1. Radicales libres y estrés oxidativo

El metabolismo oxidativo, proceso biológico normal, es capaz de generar radicales libres (RL) altamente reactivos.

El oxígeno está asociado a las condiciones de vida aerobia, representa la fuerza motriz para el mantenimiento del metabolismo y viabilidad celular al mismo tiempo que involucra un peligro potencial debido a las características paramagnéticas de este gas, responsable de la formación de intermediarios parcialmente reducidos y dotados de una reactividad alta conocidas como especies reactivas de oxígeno (EROS) (Fridovich, 1976).

Los EROS son radicales libres (RL) o precursores de radicales. En los orbitales, los electrones giran en pares con un espín particular, esto se conoce como máxima estabilidad natural; por tanto, si hay electrones desapareados en un orbital, se generan especies moleculares altamente reactivas que tienden a robar un electrón de cualquier otro átomo para compensar su deficiencia electrónica (Fridovich, 1976).

El oxígeno, es el principal radical libre, ya que tiene dos electrones desapareados.

Entre las ROS destacan:

- Radicales: ión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo (OH), alcoxilo (RO), peroxilo (ROO) y óxido de nitrógeno (NO)
- No radicales: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singulete O_2 y peroxinitrito.

Las EROS tienen un origen tanto endógeno, como exógeno. Entre las fuentes endógenas destacan:

1. La cadena respiratoria, donde la reducción monovalente de la molécula de oxígeno da lugar a la formación de la mayoría de las EROS.

2. Las células fagocitarias (neutrófilos, monocitos o macrófagos), utilizan el sistema de la NADPH oxidasa generando directamente al ión superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Por otra parte, como mecanismo de defensa, dichas células también generan óxido de nitrógeno (NO), por acción de la óxido-nítricosintasa sobre la arginina intracelular. La combinación del $O_2^{\bullet-}$ con el NO da lugar a la formación del $ONOO^-$ capaz de inducir peroxidación lipídica en las lipoproteínas.

3. La autooxidación de compuestos de carbono tales como aminoácidos, proteínas, lípidos, glicósidos y ácidos nucleicos dan lugar también a la formación de estos radicales.

4. La activación catalítica de diversas enzimas del metabolismo intermediario como la hipoxantina, xantina oxidasa, aldehído oxidasa, monoamino oxidasa y ciclooxigenasa, lipoxigenasa, son fuentes representativas de esta producción (Fridovich, 1976).

Estos radicales libres también pueden ser producidos por influencias externas cuando el organismo está expuesto a contaminantes, el ejercicio físico excesivo, los rayos ultravioletas solares, dietas desbalanceadas o pobres en nutrientes, dietas hipercalóricas y altas en grasas, entre otras (Finkel y Holbrook, 2000; Criado y Moya, 2009).

Los RL son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre, por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el RL ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un RL por quedar con un electrón desapareado,

iniciándose así una reacción en cadena que destruye nuestras células. La vida media biológica del RL es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando daño a moléculas, membranas celulares y tejidos (Criado y Moya, 2009).

Son muchas las EROS que actúan como oxidantes biológicos, pero el $O_2^{\bullet-}$ es el mayor reductor, la simple adición de un protón da lugar a la formación de HO_2^{\bullet} , convirtiéndose este en un agente oxidante muy activo. Estas transformaciones se resumen en la Figura 1:

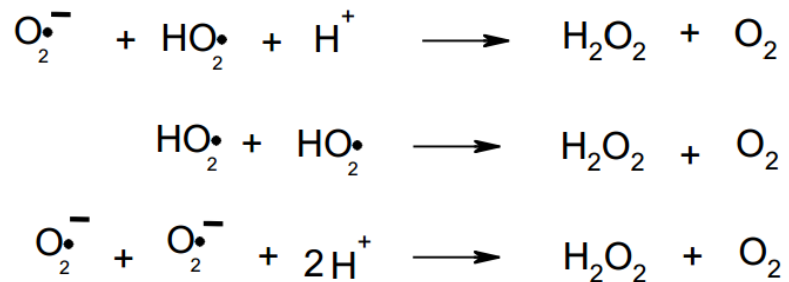


Figura 1. Mecanismo de reacción del radical superóxido.

Las EROS producen acciones diversas sobre el metabolismo de los principios inmediatos, que pueden ser el origen del daño celular:

1. Sobre los lípidos poliinsaturados de las membranas produciendo pérdida de fluidez y lisis celular como consecuencia de la peroxidación lipídica (PL).

2. Sobre los glicósidos, actúan alterando las funciones celulares tales como las asociadas a la actividad de las interleucinas y la formación de prostaglandinas, hormonas y neurotransmisores.

3. Sobre las proteínas produciendo inactivación y desnaturalización.

4. Sobre los ácidos nucleicos mediante la modificación de bases produciendo mutagénesis y carcinogénesis.

En el caso de los lípidos el ácido graso al oxidarse, se convierte en radical de ácido graso con capacidad de oxidar a otra molécula vecina, con lo que se propaga el proceso oxidativo. Este proceso es conocido como peroxidación lipídica, y genera numerosos subproductos, entre ellos el malondialdehído (MDA), cuya determinación en tejidos, plasma u orina es uno de los métodos para evaluar el estrés oxidativo (Avello y Suwalsky, 2006).

En el caso de las proteínas los aminoácidos fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina y metionina se oxidan preferentemente y como consecuencia se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos e impiden el desarrollo normal de sus funciones (transportadores iónicos de membranas, receptores y mensajeros celulares, enzimas que regulan el metabolismo celular, etc.) (Avello y Suwalsky, 2006).

Otra molécula que es dañada por los RL es el ADN; el daño a los ácidos nucleicos produce bases modificadas, lo que tiene serias consecuencias en el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis por una parte o la pérdida de expresión por daño al gen específico (Avello y Suwalsky, 2006).

Los RL y el conjunto de especies reactivas que se les asocian juegan un papel central en el equilibrio homeostático, esto es normal en el funcionamiento de los mecanismos de regulación que conservan el estado normal fisiológico de los organismos. En mamíferos son muchos los procesos fisiopatológicos causados por estas especies tales como los mecanismos patogénicos asociados a virus, bacterias, parásitos y células anormales, constituyendo un mecanismo de defensa

del organismo frente a estos agresores. Sin embargo el problema para la salud se produce cuando el organismo tiene un exceso de RL durante largos periodos, producidos mayormente por contaminantes externos. Cuando el aumento del contenido intracelular de EROS sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo, que ha sido relacionado con varias enfermedades como la aterosclerosis, la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, derrame cerebral, artritis, enfermedades inflamatorias crónicas, cáncer entre otras enfermedades degenerativas (Lini y col., 2011; Avello y Suwalsky, 2006).

La acción que las EROS tienen en el cuerpo humano ha aumentado debido a los cambios en los hábitos como la alimentación, exposición a contaminantes, etc. (Criado y Moya, 2009). Estos cambios significativos en la forma de vida también están relacionados con la elevada prevalencia de enfermedades crónico degenerativas, las cuales han aumentado en los últimos años (Cuadro 1) (Córdova, 2008).

Cuadro 1. Cambios en la prevalencia de enfermedades crónico degenerativas en México entre 1994 y 2006.

	<i>Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas 1994 (%)</i>	<i>Cambio porcentual 1994-2000 (%)</i>	<i>Encuesta Nacional de Salud 2000 (%)</i>	<i>Cambio porcentual 2000-2006 (%)</i>	<i>Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (%)</i>
Sobrepeso*	38	0.01	38.4	3.6	39.8
Obesidad‡	20.9	13.39	23.7	29.9	30.8
Hipertensión arterial	26.6	15.4	30.7	0.03	30.8
Colesterol-HDL <40 mg/dl	61	4.2	63.6	Aún no informado	Aún no informado
Triglicéridos >150 mg/dl	42.3	13.0	47.8	Aún no informado	Aún no informado
Síndrome metabólico§	26.6	27.8	34	Aún no informado	Aún no informado
Diabetes#	4.0	22	5.8	25	7

* Índice de masa corporal de 25 a 29.9 kg/m²

‡ Índice de masa corporal ≥ 30 kg/m²

§ Definido con base en los criterios del Programa Nacional de Educación en Colesterol 2001

Diagnóstico previo

Fuente: Córdova, 2008.

La prevalencia y aumento de estas enfermedades crónico degenerativas establece una necesidad de consumo de alimentos y/o bebidas ricas en antioxidantes para ayudar a contrarrestar la acción de los radicales libres.

2.1.1. Sistemas de defensa antioxidante

Los antioxidantes son sustancias que retardan o inhiben la oxidación de sustratos susceptibles a las especies reactivas del oxígeno ya que donan sus hidrógenos a estas moléculas protegiendo a las células contra el daño de los radicales libres (RL) (Munguía y col., 2011). Los antioxidantes se clasifican en endógenos, fabricados por la propia célula, y exógenos, que ingresan en el organismo a través de la dieta o de suplementos con formulaciones antioxidantes (Cuadro 2) (Criado y Moya, 2009).

Cuadro 2. Clasificación de los antioxidantes.

Exógenos	Endógenos
Vitamina E	Glutación
Vitamina C	Coenzima Q
Betacaroteno	Catalasa
Flavonoides	Glutación peroxidasa
Licopeno	Superóxido dismutasa

Fuente: Criado y Moya, 2009.

Sistema enzimático o endógeno: Los organismos aerobios han desarrollado enzimas antioxidantes tales como: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutación peroxidasa (GPx) y DT-diaforasa, que actúan tal y como se muestra en las ecuaciones siguientes (Figura 2).

Cuando dos o más antioxidantes se encuentran en un mismo sistema se produce sinergismo entre ellos, mostrando un efecto total superior al que se puede estimar por una simple adición de sus acciones individuales (Criado y Moya, 2009).

Las principales características de un compuesto o sistema antioxidante son, la prevención o detección de una cadena de propagación oxidativa, mediante la estabilización del radical generado y la regeneración del antioxidante radicalario ayudando así a reducir el daño oxidativo en el cuerpo humano (Namiki, 1990).

Gordon (1990) da una clasificación de los antioxidantes, mencionando que; hay dos tipos principales de antioxidantes, el "primario" (ruptura de la reacción en cadena, secuestradores de radicales libres) y el "secundario" o "preventivo". Los mecanismos antioxidantes "secundarios" pueden incluir la desactivación de metales, inhibición de los hidroperóxidos lipídicos interrumpiendo la producción de volátiles indeseables, la regeneración de antioxidantes "primarios", eliminar el oxígeno singulete, etc. Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado RL o hacia varios. La vitamina E, el betacaroteno y el licopeno actúan en el medio liposoluble de la célula y su absorción y transporte se hallan muy vinculados con el de los lípidos. La vitamina E es considerada el más importante protector de las moléculas lipídicas (Rodríguez, 2001); todos estos antioxidantes exógenos son adquiridos por el ser humano a través de su dieta.

Además de las propiedades nutricionales que brindan los alimentos naturales existen una gran cantidad de compuestos antioxidantes, en la actualidad es cada vez más común el consumo de antioxidantes derivados de productos naturales.

En México, durante los últimos años se ha incrementado el consumo de hierbas aromáticas, tanto como condimentos de las comidas, como en forma de infusiones o bebidas con fines terapéuticos, las cuales recientemente han sido identificadas como valiosa fuente de diversos fitoquímicos, que actúan como antioxidantes neutralizando los RL.

Existe una serie de alimentos naturales con poder antioxidante que aún no se han estudiado (Rodríguez, 2001). Dentro de estos alimentos se encuentran las infusiones preparadas a partir de plantas, cuyo consumo ha aumentado, debido a su aporte importante de agua, pero principalmente, por el efecto positivo a la salud que tienen sus fitoquímicos y micronutrientes, dichos beneficios han permitido incluir a este tipo de productos dentro de las bebidas funcionales (Munguía y col., 2011).

2.2. Compuestos fenólicos

En los alimentos existen diferentes compuestos denominados metabolitos secundarios, entre los que se encuentran los polifenoles, los cuales se localizan en plantas y frutos. Poseen actividad antioxidante, antiinflamatoria, antioxidativa, quimioprotectora, neuroprotectora, reguladora de la glucosa, moderadora del metabolismo de lípidos, entre otras (Munguía y col., 2011).

Los fenoles son productos sintetizados en las plantas que poseen la característica química de tener al menos un grupo fenol en su estructura molecular, los compuestos fenólicos en alimentos por lo general no se presentan libres sino en forma glicosilada. Su estructura varía desde moléculas simples como los ácidos fenólicos a compuestos altamente polimerizados como son los taninos (Bravo, 1998; Ho, 1992).

Los polifenoles se clasifican en tres grupos:

- Fenoles simples y ácidos fenólicos
- Flavonoides y
- Taninos

2.2.1. Fenoles simples y ácidos fenólicos

Se caracterizan por poseer un anillo aromático, un grupo hidroxilo y un grupo carboxilo. Se diferencian dos grupos principales de ácidos fenólicos: los ácidos benzoicos y los ácidos cinámicos.

1. Los ácidos benzoicos o derivados del ácido hidroxibenzoico, tienen una estructura básica C6-C1. Los principales son el ácido gálico, ácido salicílico, hidroxibenzoico, protocatéuico, vinílico y siríngico; su contenido es generalmente muy bajo en las partes comestibles de la planta a excepción de algunas frutas rojas (Manach y col., 2004).

2. Los ácidos cinámicos o derivados del ácido hidroxicinámico (Figura 3), se encuentran ampliamente distribuidos en vegetales en forma conjugada ya que raramente se les encuentra en forma libre. Casi exclusivamente son derivados de los ácidos caféico, cumárico y ferúlico. Las frutas rojas constituyen una fuente significativa de estos ácidos (Manach y col., 2004).

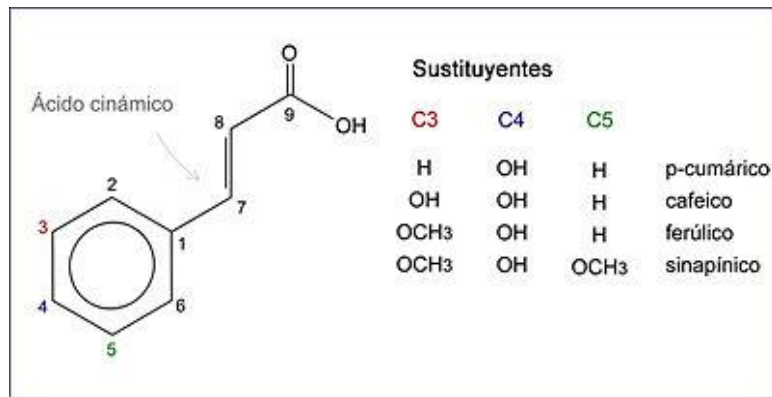


Figura 3. Ácidos hidroxicinámicos (Manach y col., 2004).

2.2.2. Flavonoides

Los flavonoides naturales se han clasificado en varias clases de acuerdo con las variantes que existen en su estructura química, éstos son chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides, pterocarpanos y rotenoides (Munguía y col., 2011).

La estructura común de los flavonoides (Figura 4) consiste en dos anillos aromáticos enlazados a través de 3 carbonos que usualmente forman un compuesto heterocíclico oxigenado. Los flavonoides se agrupan en antocianinas y antoxantinas. Las antocianinas son pigmentos rojos naranjas, azules y púrpura, presentes en las plantas cuya estructura fenólica les confiere una marcada actividad antioxidante por la donación de electrones ó transferencia de átomos de hidrógeno a RL. Las antoxantinas incluyen flavonoles, flavonas, e isoflavonas que son moléculas incoloras o de colores que oscilan desde blanco hasta amarillo (King y Young, 1999).

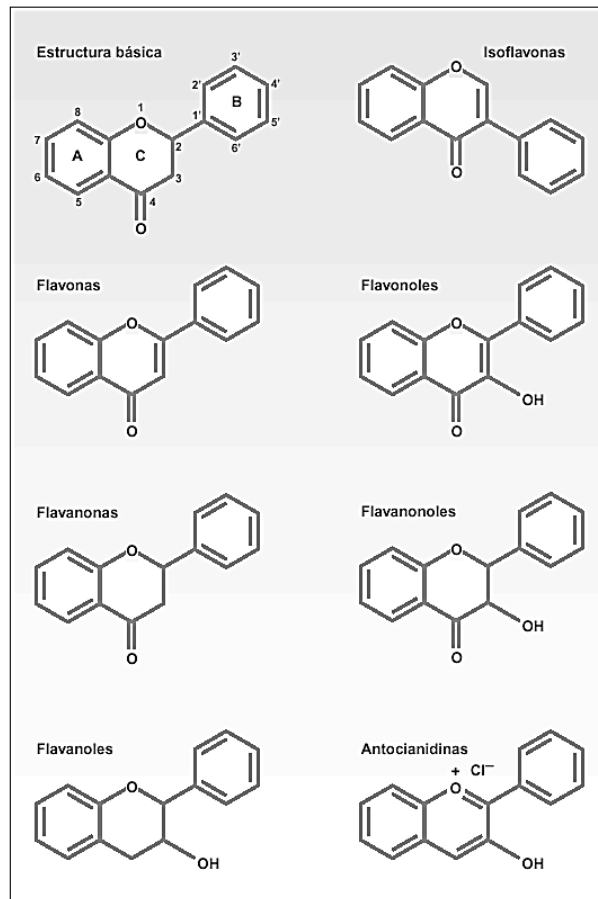


Figura 4. Flavonoides (Manach y col., 2004).

Los flavonoides pueden exhibir su actividad antioxidante de varias maneras:

(i) Actividad captadora hacia cualquiera de las especies reactivas (por ejemplo, especies reactivas de oxígeno: EROS) tales como OH, O₂•⁻, o hacia los radicales lipídicos como R•, RO•, y ROO•; generalmente se realiza a través de transferencia de un átomo de hidrógeno o donación electrones; (ii) quelan iones metálicos como el Fe³⁺, Cu²⁺ y Zn²⁺; y (iii) la interacción con otros antioxidantes (acciones cooperativas) (Reşat y col., 2007).

2.2.3. Taninos

Son compuestos que contienen gran número de grupos hidroxilo y otros grupos funcionales, Los taninos se clasifican en dos grupos: taninos hidrolizables o proantocianidinas, florotaninos y taninos condensados dependiendo de la vía biosintética en que se producen, son antidiarreicos, antioxidantes, antitumorales, antibacteriales y agentes hepatoprotectores, y estos se encuentran en plantas de las familias leguminosae, rosaceae, polygonaceae, fagaceae, ryzophoraceae, myrtaceae y melastomaceae (Munguía y col., 2011).

2.2.4. Biosíntesis de compuestos fenólicos en plantas

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés. Para defenderse del daño ocasionado por heridas y el ataque por insectos o microorganismos patógenos, ellas sintetizan las enzimas que degradan la pared celular de microorganismos. La composición y la estructura de la pared celular vegetal también cambian, formando una barrera más rígida y menos digerible para los insectos. Así mismo y como parte de la protección química, otra estrategia utilizada por las plantas es la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, en contra de herbívoros, o con actividad antioxidante (Sepúlveda y col., 2003).

2.3. Fitohormonas y su relación con estrés en plantas

Las hormonas vegetales son una serie de moléculas derivadas de diversas vías metabólicas esenciales. Estos compuestos son importantes reguladores del crecimiento de las plantas y median las respuestas al estrés.

En general, estos compuestos están presentes en concentraciones muy bajas y actúan de forma local, en o cerca del sitio de la síntesis, o en tejidos distantes. Algunas de las hormonas vegetales conocidas son el ácido abscísico (ABA), indol-

3-acético (IAA o auxina), brasinoesteroides (BRs), citoquininas, ácido giberélico (GA), etileno, ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (Figura 5). En conjunto, estos compuestos regulan todos los aspectos de la vida vegetal, de las respuestas a estrés (Santner, 2009).

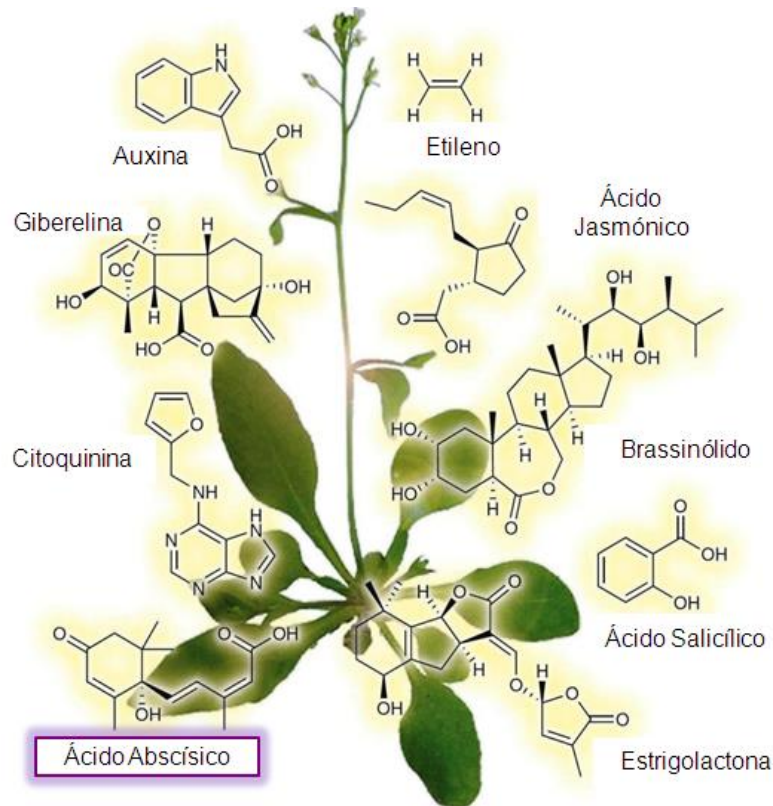


Figura 5. Fitohormonas (Santner, 2009).

El ABA se define como una hormona del estrés debido a su rápida acumulación en respuesta a las tensiones y su mediación de las respuestas de estrés.

En condiciones de estrés, la acumulación de ABA en respuesta a estrés hídrico o salino es un proceso de señalización celular, que abarca la percepción inicial de la señal de estrés, transducción de señales celulares y la regulación de la expresión de genes que codifican las enzimas clave en la biosíntesis de ABA (Zhang, 2006).

El ABA está involucrado en el proceso de adaptación de la planta a diferentes tipos de estrés ambiental, y se ha comprobado que durante estos estreses los niveles de ABA se incrementan en los tejidos vegetativos. Esta fitohormona produce una pérdida de iones K^+ (calculada en 4-8 veces de disminución, desde 400-800 mM hasta 100 mM) y de aniones Cl^- en las células estomáticas, que provoca una salida de agua del citoplasma, dando lugar al cierre del estoma (Moreno, 2009). El cierre de estomas está relacionado con una defensa de la planta para resistir condiciones de sequía, evitando la mayor pérdida de agua del citoplasma de las células vegetales. De tal manera que, cuando el organismo vegetal se encuentra en condiciones de sequedad, sus niveles de ABA aumentan hasta 40 veces.

En las células oclusivas parece que existen receptores específicos para ABA (Figura 6). Estos se encuentran sobre la superficie exterior de la membrana plasmática de dichas células y su unión con el ABA, regula la apertura de los canales iónicos de la membrana y la actividad de las bombas de protones (Squeo y León, 2007).

El ABA produce la apertura de los canales de Ca^{2+} , y una despolarización temporal de la membrana. Esta despolarización temporal promueve la apertura de los canales de Cl^- , que posteriormente despolarizan la membrana. El ABA incrementa los niveles de Inositol trifosfato (IP_3). El IP_3 abre los canales de Ca^{2+} dependientes de IP_3 , produciendo una liberación de calcio desde la vacuola. El incremento del calcio citosólico activa la apertura de los canales de salida de Cl^- e inhibe la de los canales de entrada de K^+ . Este flujo neto de cargas negativas se traduce en una gran despolarización de la membrana. El ABA causa un incremento en el pH citosólico. Este incremento de pH, produce la apertura de los canales de K^+ y la salida de K^+ al exterior. La turgencia de las células oclusivas disminuye por ello, y los estomas se cierran (Squeo y León, 2007; Kwak, y col. 2003; Song y col., 2008).

ha surgido como un mensajero secundario para mediar las acciones de respuesta a estrés (Song y col., 2008).

En las células estomáticas, las especies reactivas de oxígeno, en particular el ión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) son producidas por la activación, y/o fosforilación de la enzima NADPH oxidasa, localizada en la membrana plasmática. También se ha sugerido que estaría involucrada en la producción de peróxido de hidrógeno (Covarrubias, 2007). La producción de estas especies reactivas de oxígeno induce la acción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) la cual lleva a cabo la síntesis de compuestos fenólicos.

La biosíntesis de compuestos fenólicos naturales en las plantas se deriva de la vía del ácido siquímico (Figura 7) en la cual están directamente involucradas la molécula de ácido gálico y sus galotaninos poliméricos y elagitaninos derivados. Un producto de esta vía es el aminoácido fenilalanina; este aminoácido es el precursor de fenilpropanoides y más clases de compuestos fenólicos derivados de ellos. Estos son los flavonoides, isoflavonas, pterocarpanos, estilbenos, cumarinas, phenolamines, auronas, chalconas, lignanos y lignina.

La acción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) es fundamental para la fisiología de las plantas y por ello está estrictamente modulada. En general, la actividad de PAL aumenta cuando a las plantas se les somete a situaciones de estrés, como la falta de agua, infecciones fúngicas o bacterianas y radiaciones UV, otro factor que activa la enzima PAL es el frío (Cohen y Kennedy, 2010).

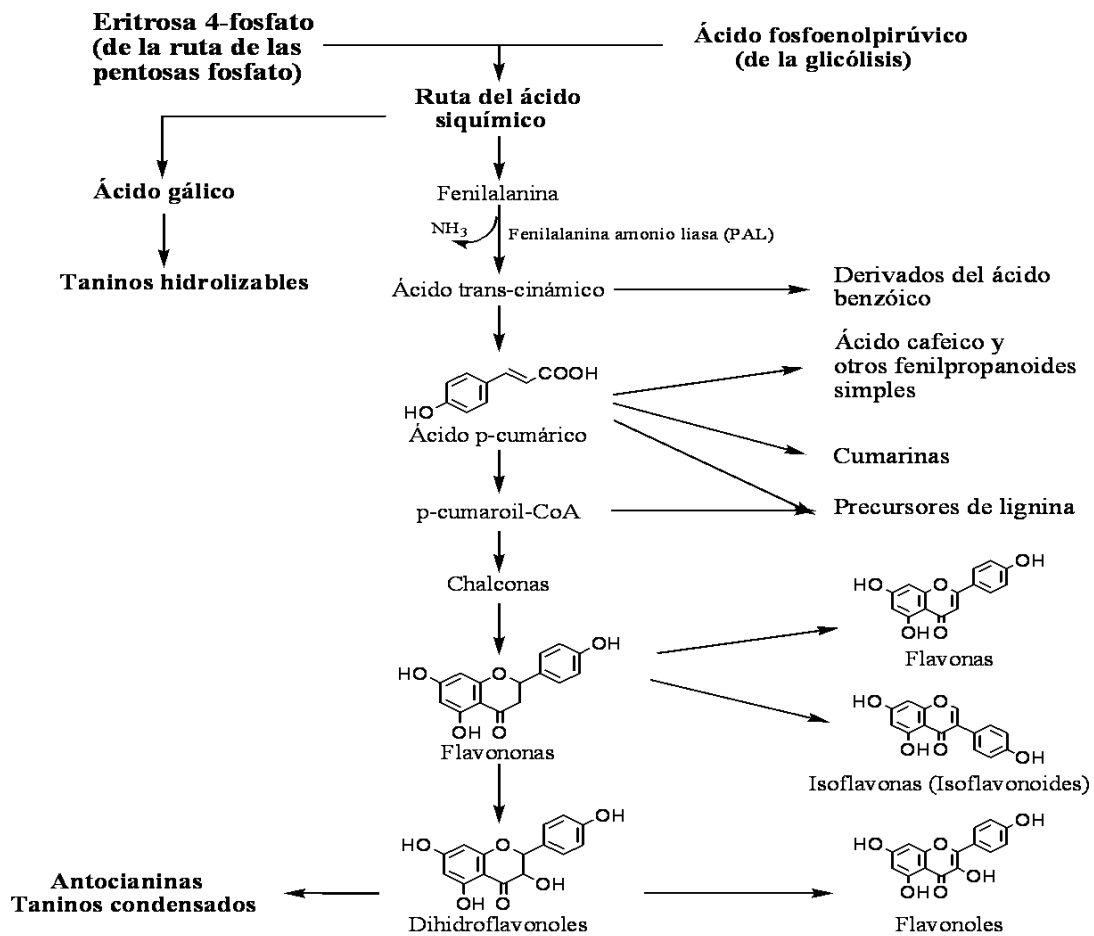


Figura 7. Ruta del ácido siquímico (Cohen y Kennedy, 2010).

2.4. Tipos de estrés

Las condiciones adversas (estrés) a las que son sometidas las plantas pueden ser clasificadas en dos grupos principalmente: estrés abiótico y estrés biótico (Figura 8). El estrés abiótico, se refieren a los cambios en el medio ambiente, es decir, aumento en la temperatura, exceso de humedad, la sequía, el incremento en la salinidad del suelo y el frío. El estrés biótico, por otro lado, se refiere al ocasionado por organismos vivos, como son microorganismos patógenos (hongos y bacterias), insectos y herbívoros (Reyes y col., 2007; Dixon y Palva, 1995).

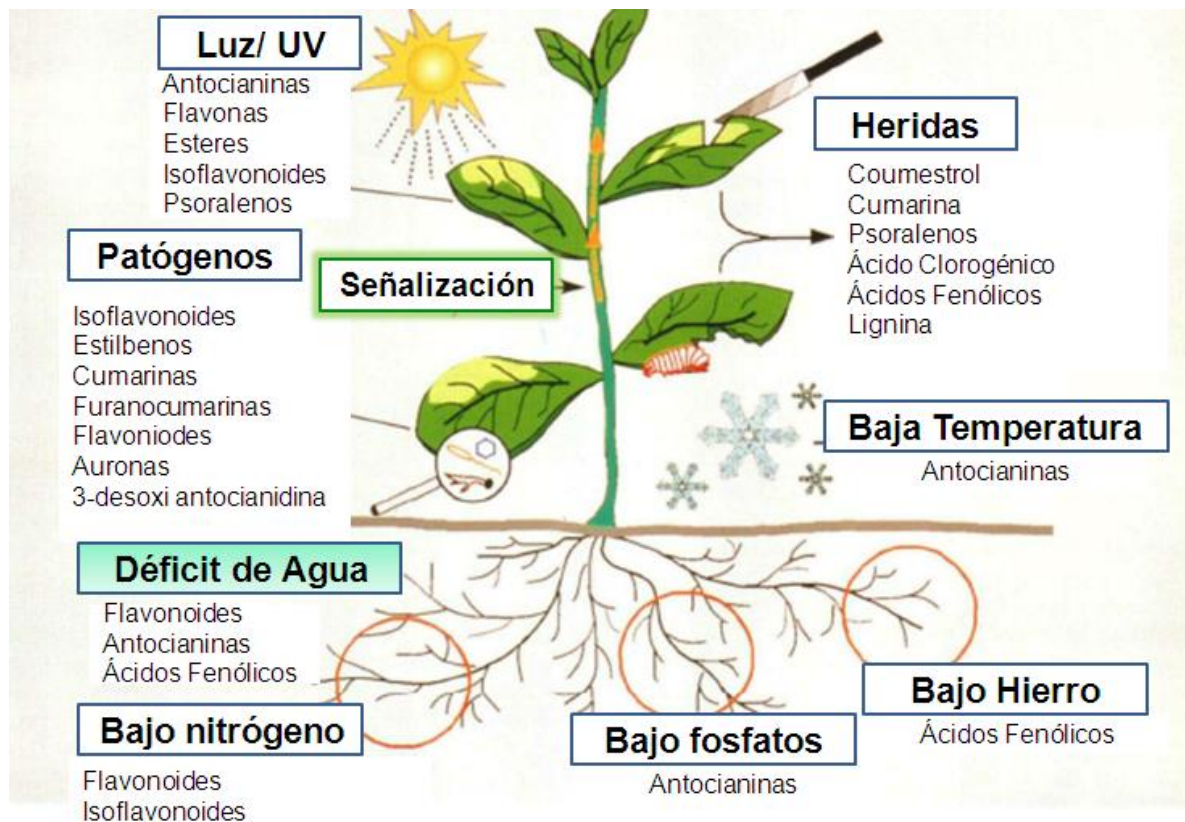


Figura 8. Diversos tipos de estrés abiótico y biótico, así como los metabolitos derivados por estos (Dixon y Palva, 1995).

2.4.1. Estrés hídrico

Las tensiones ambientales principalmente se dan en la planta por falta de agua. La disponibilidad de agua para sus funciones biológicas, como solvente, medio de transporte, como donante de electrones en reacciones, y como refrigerante de evaporación es a menudo afectada por las condiciones del medio ambiente (Bohnert y col., 1995).

Las plantas a lo largo de su desarrollo experimentan algún grado de estrés por déficit hídrico. En los sistemas naturales, un déficit de agua puede ser el resultado

de bajas precipitaciones, baja capacidad de retención de agua del suelo, excesiva salinidad, temperaturas extremas frías o calientes, baja presión de vapor atmosférica o una combinación de estos factores.

El estrés hídrico da lugar a la inducción de modificaciones postraduccionales; es decir, en modificaciones que alteran la funcionalidad de proteínas con diferentes actividades, ya sea quinasas, fosfatasas, transportadores de iones, fosfolipasas que degradan ciertos lípidos para producir segundos mensajeros como el inositol trifosfato (IP3), enzimas que hidrolizan el ATP (ATPasas) y que están implicadas en la generación del gradiente de protones necesario para la activación de transportadores, factores transcripcionales, etc. (Covarrubias, 2007). La expresión de los genes de respuesta dan como resultado la síntesis de proteínas necesarias para la producción de ciertos compuestos con actividad protectora, o bien directamente a la producción de proteínas con capacidad de proteger diferentes tipos de macromoléculas.

A pesar de que a la fecha se han sobre-expresado aproximadamente de 60 a 70 genes diferentes implicados en la respuesta a sequía, sólo en muy pocos casos, quizás 3 o 4, se han obtenido resultados alentadores en cuanto a las características de resistencia de las plantas a la sequía (Covarrubias, 2007).

La señal primaria en la aplicación de estrés será seguida por mensajeros secundarios y una cadena de señal activa induciendo la expresión de los genes, la transcripción de las enzimas y la formación y almacenamiento de los metabolitos (Figura 9).

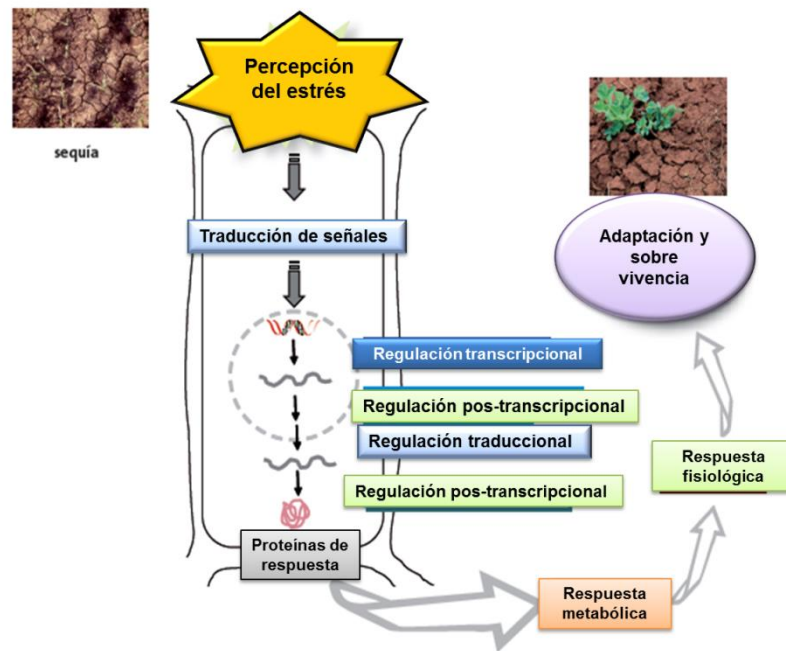


Figura 9. Mecanismos fisiológicos de adaptación y supervivencia de las plantas al estrés hídrico (Covarrubias, 2007).

2.5. Infusiones

Una infusión es una bebida obtenida de las hojas secas, partes de las flores o de los frutos, a las cuales se les vierte o se los introduce en agua a una temperatura mayor a la ambiente, pero sin llegar a hervir.

Los efectos de las infusiones se asocian principalmente a la acción antioxidante de sus componentes, ya que pueden actuar como atrapadores de especies reactivas de oxígeno, protegen la estructura de los ácidos nucleicos, de las proteínas y de los lípidos (Wolfram, 2005).

El té verde es la infusión más estudiada hasta el momento, presenta importantes beneficios a la salud. Sin embargo, para la población mexicana, el consumo de té

verde es aún poco común, ya que el mayor porcentaje de la población consume infusiones de hierbas locales, por lo que se requieren estudios que demuestren los posibles beneficios atribuibles a productos cultivados y elaborados en nuestro país y de esta manera contribuir con bases científicas para disminuir el riesgo de enfermedades crónico degenerativas. Entre las infusiones procesadas más consumidas por la población se encuentran la de hierbabuena (*Mentha piperita*).

2.6. Hierbabuena (*Mentha piperita*)

2.6.1. Generalidades

El género *Mentha* pertenece a la familia de las Lamiaceae, consiste de alrededor de 32 especies. La más conocida es la *Mentha piperita*, (Figura 10) ya que tiene un alto valor comercial; principalmente de ella se extrae el mentol, sustancia que se emplea en la fabricación de medicamentos, dulces, licores, cigarrillos y otros productos (Díaz y col., 2003).



Figura 10. Hierbabuena (*Mentha piperita*).

Las especies pueden ser comercializadas frescas o secas. En el caso del secado de la menta, éste es un método efectivo que incrementa la vida media del producto ya que retarda el crecimiento de microorganismos y previene ciertas reacciones bioquímicas que pueden alterar las características organolépticas. Sin embargo, el secado puede provocar cambios en el producto, principalmente asociados con el olor y la apariencia, aunque la naturaleza química exacta de estos cambios no es clara (Díaz y col., 2003).

La preparación de las hojas de la planta y su aceite esencial son usados en la medicina tradicional. Tomada como infusión, estimula la digestión, el sistema nervioso y el organismo en general. Es útil en los catarros, facilita la expectoración, fortifica el estómago, disuelve los gases, tonifica el organismo, calma los nervios y las palpitations del corazón, alivia el vómito y la náusea, ayuda a mitigar los dolores menstruales y expulsa las lombrices. En infusión con vino y agua, a partes iguales, tomada durante varios días, elimina la fetidez del aliento. En infusiones con leche, mitiga los dolores del vientre y elimina gases (Hoffman, 2005).

2.6.2. Condiciones climáticas de crecimiento

La hierbabuena, *Mentha piperita*, es una planta cuyo cultivo, poco extendido, sólo se realiza en pequeños huertos. Se encuentra también espontáneamente, en ribazos y zonas húmedas.

Se trata de una planta herbácea, las hojas, opuestas y sencillas, son pecioladas y con los bordes aserrados. Tienen forma ovalada y terminan en punta. Las flores, típicas de las labiadas, se agrupan en glomérulos. Son de color rosa o púrpura y desprenden un olor agradable.

La hierbabuena es una planta que crece en climas húmedos y templados para su desarrollo normal. Requiere espacios bien iluminados. Aunque es muy sensible al

frío y se hiela fácilmente, resiste mejor las bajas temperaturas que los grandes calores. Por estar dotada de raíces superficiales, no resiste la sequía (Quintero, 1985).

La plantación al aire libre suele hacerse normalmente durante los meses de marzo y abril. En algunas zonas suelen hacerse también plantaciones de otoño.

En zonas frías, el cultivo en superficies muy reducidas, tiene que realizarse en invernadero (Quintero, 1985).

2.6.3. Compuestos bioactivos en hierbabuena

Los principales constituyentes químicos reportados para la hierbabuena son los siguientes:

- Aceites volátiles: mentol, mentona, acetato de mentilo, neomentol, isomentona, mentofurano, limoneno, pulegona, alfa y beta pineno.
- Monoterpenos
- Ácido caféico
- Flavonoides y
- Taninos

El contenido de polifenoles totales de hojas en hierbabuena es de aproximadamente 19-23% (flavonoides 12%), que incluye 59-67% eriocitrina y ácido rosmarínico, 7-12% luteolina 7-O-rutinósido, 6-10% hesperidina (McKay y Jeffrey, 2006).

Nickavar y col. (2008) determinaron el contenido de compuestos fenólicos de diferentes especies de *Mentha* en extracto etanólico, mediante el método Folin-Ciocalteu, reportando una variación en el contenido de polifenoles ante el método variaron entre cada especie, siendo mayor el contenido de compuestos para la

especie de *Mentha piperita*, la cual es la más usada para la elaboración de infusiones (Figura 11).

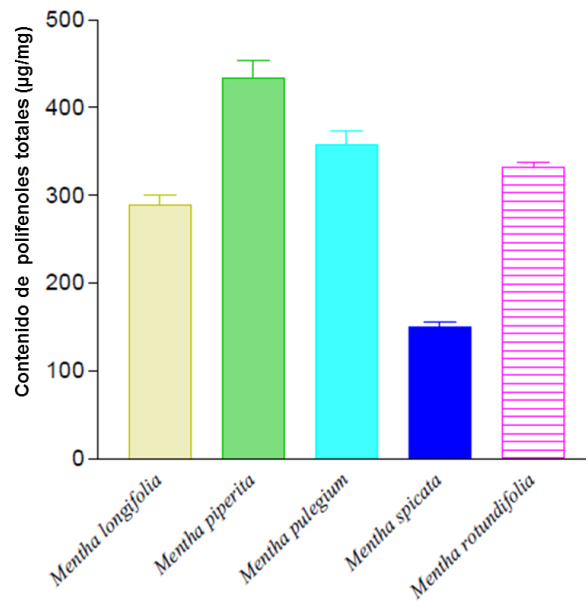


Figura 11. Contenido total de los compuestos fenólicos en especies de *Mentha* (Nickavar y col., 2008).

Kuli y col., (2008) realizaron la determinación de compuestos fenólicos de diferentes infusiones, entre los cuales se encontraba la infusión de hierbabuena. En el Cuadro 3 se muestra los compuestos fenólicos identificados para infusión de hierbabuena mediante análisis de HPLC-PDA.

Entre los compuestos fenólicos, se identificó la presencia de ácido rosmarínico, el ácido gálico, luteonina, eriocitrina en infusión de hierbabuena. El ácido ferúlico se detectó en pequeñas concentraciones en todas las infusiones.

Cuadro 3. Compuestos fenólicos identificados en infusiones.

Compuesto	Hierbabuena
trans-Resveratrol	0.03±0.0010
(+)-Catequina	2.76±0.1340
Ácido gálico	5.37±0.2150
Ácido vinílico	n.d.
Vanilina	n.d.
trans-4-Ácido cumárico	0.57±0.0290
Ácido ferúlico	1.30±0.0051
trans-Ácido cinámico	0.03±0.0010
o-Ácido hidroxicinámico	0.46±0.0020
Ácido neoclorogénico	n.d.
3-p-Ácido cumaroquínico	n.d.
Ácido clorogénico	n.d.
Ácido rosmarínico	13.28±1.0573
Ácido cafeíco	1.02±0.1598
Luteolina	n.d.
Luteolina 7-O-glucósido	4.07±0.2394
Eriocitrina	6.25±0.7710
Quercetina 3-galactósido	n.d.
Quercetina 3-arabinósido	n.d.
Quercetina 3-rutinósido	n.d.
Quercetina 3-ramnósido	n.d.

Fuente: Kuli y col., (2008).

2.6.4. Actividad antioxidante

Nickavar y col. (2008) evaluaron la propiedad para estabilizar radicales libres de cinco especies de *Mentha* (Figura 12), en extracto etanólico, entre las cuales se encontraba *Mentha piperita*, usando los ensayos de DPPH y ABTS. Estos autores reportaron que la especie *M. piperita* exhibió la mayor actividad antioxidante evaluada por el ensayo DPPH. Por otro lado, también reportaron que todos los

extractos estabilizaron el radical $ABTS\cdot^-$ sin diferencia estadística significativa entre especies. Esta diferencia observada entre ensayos y entre especies de *Mentha* fue atribuida principalmente a las características propias de cada ensayo y a la composición de compuestos fenólicos y otros compuestos en la mezcla que pueden ejercer un efecto sinérgico.

De igual manera Nickavar y col. (2008) concluyeron que los constituyentes fenólicos presentes en las especies de *Mentha* son, al menos en parte, responsable de las actividades de captación de radicales libres y de la capacidad antioxidante de estas plantas.

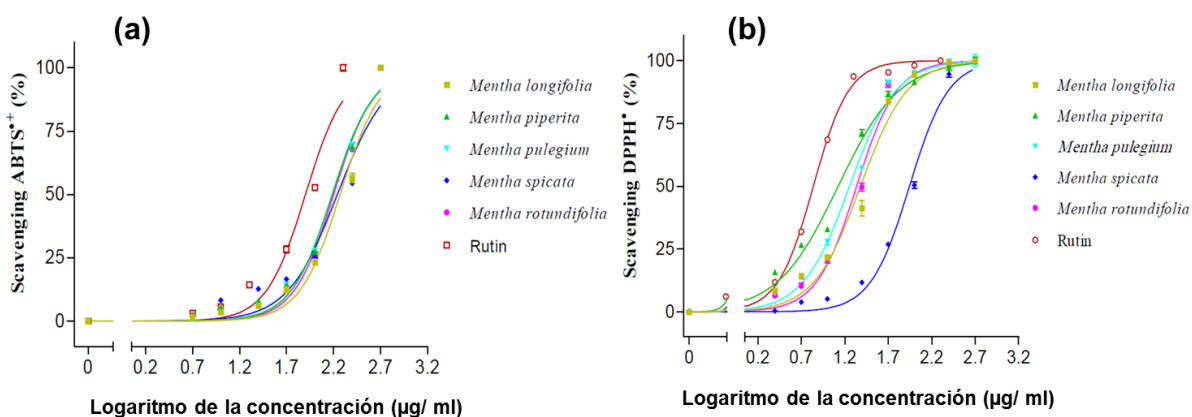


Figura 12. Porcentaje de inhibición de radicales (a) ABTS y (b) DPPH de extractos etanólicos de cinco variedades de *Mentha* (Nickavar y col., 2008).

En base a lo anteriormente mencionado la infusión de hierbabuena presenta propiedades benéficas a la salud que pueden ser incrementadas al someter la planta al estrés hídrico.

III. JUSTIFICACIÓN

En México existe un incremento y prevalencia de enfermedades crónicas degenerativas como diabetes, enfermedades cardiovasculares y el cáncer, constituyendo a las primeras causas de muerte en nuestro país. Todas estas enfermedades crónicas degenerativas están estrechamente relacionadas con el estrés oxidativo, el cual es un desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de radicales libres que producen daño a las biomoléculas como proteínas, lípidos y DNA causando alteración y pérdida de su función.

En los últimos años se ha incrementado el consumo de alimentos y bebidas naturales con propiedades antioxidantes que ayudan a contrarrestar el daño causado por los radicales libres. Así mismo, existe una permanente búsqueda de mejoras a estas fuentes exógenas de antioxidantes naturales, teniendo como una alternativa incrementar la producción de metabolitos secundarios como los polifenoles. Entre estas nuevas alternativas, se encuentra el estrés hídrico en plantas, el cual modifica la expresión génica relacionada con la producción de enzimas involucradas en la síntesis de compuestos fenólicos con conocida actividad antioxidante.

La hierbabuena es la planta más usada en México para la preparación de infusiones, debido a su sabor y a sus propiedades benéficas para la salud.

El incremento en la síntesis de polifenoles en respuesta al factor de estrés hídrico en hierbabuena, la cual es usada para elaborar bebidas funcionales como las infusiones, puede proporcionar un valor agregado no solo a los cultivos, sino en los productos originados de este material vegetal, los cuales pueden ser una alternativa auxiliar en el control de enfermedades crónicas degenerativas relacionadas con estrés oxidativo.

IV. HIPÓTESIS

Las infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita*) elaboradas con plantas sometidas a condiciones de estrés hídrico presentan mayor contenido de polifenoles y capacidad antioxidante.

V. OBJETIVOS

5.1. General

Evaluar el efecto del estrés hídrico en hierbabuena (*Mentha piperita*) sobre polifenoles y capacidad antioxidante de infusiones.

5.2. Específicos

- Establecer condiciones de estrés hídrico en plantas de hierbabuena en dos diferentes estaciones del año (primavera e invierno) que aseguren el crecimiento de la planta.
- Cuantificar la concentración de compuestos polifenólicos en infusiones de hierbabuena a diferentes condiciones de estrés hídrico.
- Evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* en infusiones de hierbabuena a diferentes condiciones de estrés hídrico.

VI. METODOLOGÍA

6.1. Materiales

6.1.1. Compuestos químicos

Ácido gálico marca Aldrich, reactivo de Folin Ciocalteu, (+)-catequina y ABTS marca Sigma, carbonato de sodio marca Sigma ultra, persulfato de potasio marca Sigma-Aldrich, hidróxido de sodio, metanol y demás reactivos fueron obtenidos de la marca J. T. Baker.

6.1.2. Material biológico

Se obtuvieron 120 plántulas de hierbabuena (*Mentha piperita*) de la empresa Floraplan S.A de C.V. Las cuales fueron sembradas en macetas de plástico y se mantuvieron en condiciones ambientales parcialmente controladas y a cielo abierto.

6.2. Metodología experimental

Las plantas fueron cultivadas en macetas de plástico de capacidad de 2 L con tierra Sunshine Mix No. 3 (Mezcla profesional para cultivos a base de musgo, utilizada como sustituto de suelo) en el invernadero de la Facultad de Química, con un porcentaje de humedad en suelo del 70% (la humedad en suelo fue medida mediante un higrómetro) y se dejaron crecer de 2 a 3 meses para que las plantas llegaran a su crecimiento óptimo, en esta etapa las plantas también se aclimataron a las condiciones ambientales y a su entorno.

Una vez que las plantas de hierbabuena llegaron a su crecimiento óptimo se iniciaron los tratamientos de estrés hídrico (Figura 13), se clasificaron

homogéneamente en 4 grupos de 30 unidades experimentales cada uno, denominados:

- Estrés 8%
- Estrés 15%
- Estrés 22%
- Estrés 35%

Para iniciar el experimento las plantas de cada grupo tenían una humedad del 70%, cuando se encontraron homogéneas se tomaron las muestras control para cada grupo, correspondientes a la humedad óptima de crecimiento para las hierbabuenas.

El estrés hídrico en las hierbabuenas se indujo limitando el suministro de agua. Se midió la humedad en suelo de cada maceta todos los días mediante un higrómetro (Kelway soil modelo HB-2). Se colectaron muestras de cada grupo cuando las 30 plantas correspondientes se encontraron en el porcentaje de humedad de cada tratamiento (estrés 8%, estrés 15%, estrés 22% y estrés 35%).

Posterior al estrés se llevó a cabo la rehidratación de las plantas de cada tratamiento por 5 días; al quinto día se tomaron las correspondientes muestras denominadas:

- Rehidratación 8%
- Rehidratación 15%
- Rehidratación 22%
- Rehidratación 35%

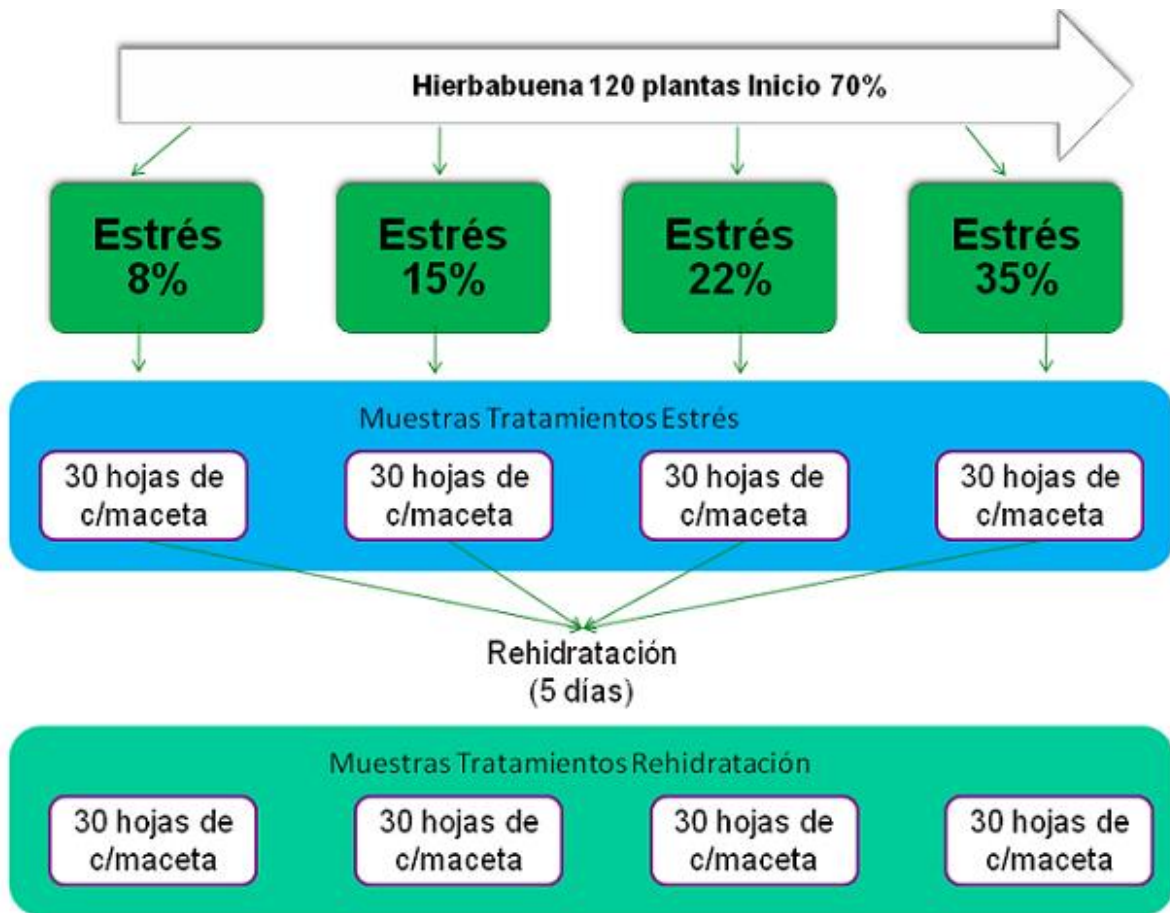


Figura 15. Esquema de la metodología.

Para la obtención de material vegetal (muestras) se tomaron al azar treinta hojas de cada maceta correspondientes al tratamiento; se realizó sujetando el tallo y tomando la hoja para jalar en sentido contrario al crecimiento, de esta forma la hoja se separó del tallo sin causarle daño a la planta.

Se llevó a cabo el secado del material vegetal en estufa a una temperatura de 50 °C. Posteriormente se realizó una molienda de las hojas para obtener un tamaño de partícula aproximado de 1-1.5 mm de acuerdo al tamaño reportado en industria para infusiones comerciales. El material vegetal seco y se guardó para su posterior análisis.

6.3. Cuantificación de compuestos fenólicos

6.3.1. Obtención de infusiones

Al momento de preparar las infusiones se agregó 1 g de material seco a 100 mL de agua en ebullición. Posteriormente se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente, las infusiones se filtraron con filtros de cafetera comerciales y se dejaron protegidas de la luz. La concentración de las infusiones fue al 1%.

6.3.2. Cuantificación de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu

Para la determinación de polifenoles totales se utilizó el método de Folin y Ciocalteu (1927), descrito por Singleton y col. (1999). Dicho método cuantifica la concentración total de grupos hidroxílicos fenólicos presentes en la muestra que se está analizando. Este método se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes (Julkunen-Titto, 1985).

Se tomó una alícuota de 20 μL de cada una de las infusiones, la cual se colocó en un vial de vidrio y se completó a 250 μL con agua destilada, se adicionó 125 μL del reactivo de Folin Ciocalteu 1N, se agitó en vórtex por 5 minutos, posteriormente se agregó 625 μL de Na_2CO_3 al 20% y se dejó reposar dos horas en la oscuridad, transcurrido este tiempo se tomó la medición de la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm, los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico por mL de muestra. La cuantificación se realizó por interpolación de los resultados en una curva estándar de ácido gálico, y se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco (mg eq EAG/g de peso seco).

6.3.3. Cuantificación de flavonoides

El compuesto 2-aminoetildifenil borato reacciona en metanol con el grupo hidroxilo de los flavonoides en la posición 2' del anillo B para formar el 2'-difenilborato del flavonoide correspondiente, estos compuestos presentan una coloración amarilla, (Figura 14) La presencia de ese compuesto, se determina a partir de espectrofotometría a una longitud de onda de 404 nm. La rutina pertenece al grupo de los flavonoles y se usa rutinariamente como estándar en esta técnica. Cabe señalar que la determinación de flavonoides se hace en un medio neutro (Robertson y Hall, 1989).

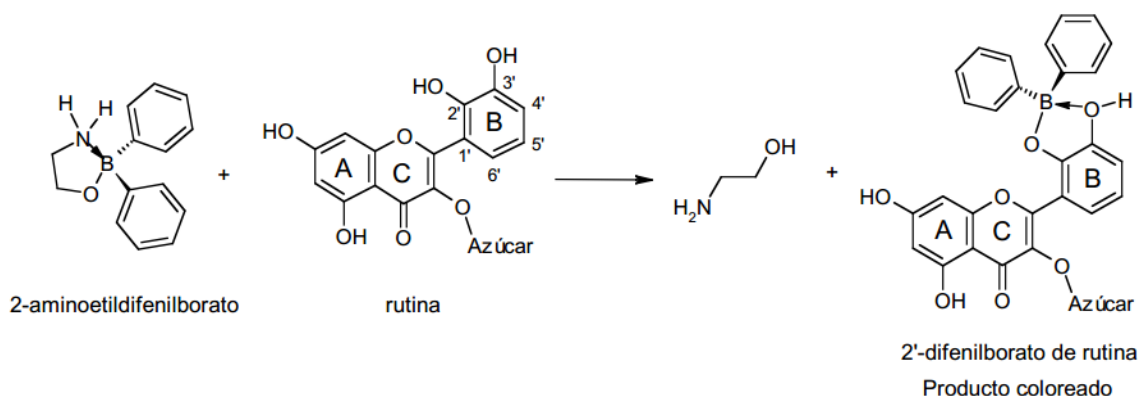


Figura 14. Mecanismo de reacción de 2'-aminoetildifenilborato con la rutina.

Para la determinación de estos compuestos en las infusiones de hierbabuena, se tomaron 50 μ L de cada infusión y se le adicionaron 180 μ L de agua destilada, posteriormente se agregó 20 μ L de la solución 2-aminoetildifenilborato al 1%, inmediatamente después se midió la absorbancia a 404 nm, los resultados fueron expresados como mg equivalentes de rutina por mL de muestra. La cuantificación se realizó por interpolación de los resultados en una curva estándar de rutina, y se expresaron como mg equivalentes de rutina por gramo de peso seco (mg eq. rutina/g de peso seco).

6.4. Determinación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH

Brand-Williams y col., (1995) evaluaron la actividad de compuestos específicos o extractos usando el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) en una solución metanólica. La reducción del DPPH• se monitorea por la disminución en la absorbencia a una longitud de onda característica. En su forma de radical libre, el DPPH• absorbe a 515 nm y cuando sufre reducción por un antioxidante, esta absorción desaparece. En consecuencia, la desaparición del DPPH• proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales. El modelo que explica la actividad de un compuesto como antirradical se ejemplifica con la siguiente ecuación:



Donde AH es un antioxidante que actúa como antirradical donando átomos de hidrógeno, dando como resultado radicales con estructuras moleculares estables que detendrán la reacción en cadena, tal es el caso de los fenoles. El nuevo radical formado (A) puede interactuar con otro radical para formar moléculas estables (DPPH-A, A-A).

Se preparó una solución 0.1 mM de DPPH• (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) en metanol, 1 mL de esta solución se adicionó a las diferentes infusiones a diferentes concentraciones a un volumen de 50 µL. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente y protegido de la luz, se leyó la absorbencia de la mezcla a 517 nm. La actividad para secuestrar radicales de las infusiones se determinó en base a la disminución de los valores de absorbencia, y posteriormente los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición de la formación del radical DPPH. Para el cálculo de IC₅₀ se graficó el logaritmo de la concentración contra el porcentaje de reducción de la oxidación, y se realizó una comparación con un estándar de (+)-catequina.

6.5. Determinación de la capacidad antioxidante por el método de ABTS

A diferencia del radical DPPH, el radical ABTS•+ tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP). Con este ensayo se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, además el radical ABTS tiene un espectro máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm (Fogliano y col., 1999).

Para la evaluación de la capacidad antioxidante por el ensayo ABTS se siguió la metodología descrita por Re y col. (1999). La obtención del radical se realizó mezclando una solución 7 mM de ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-6 ácido sulfónico) y una solución 2.45 mM de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$), para producir el radical ABTS•+. Posteriormente la solución concentrada del radical ABTS•+ se diluyó con buffer de fosfatos salino (PBS), pH 7.4, hasta obtener una absorbancia final de 0.7 ± 0.02 a una longitud de onda de 734 nm. Después se adicionó 20 μ L de las diferentes infusiones a diferentes concentraciones con el fin de evaluar la concentración inhibitoria media en 990 μ L de la dilución antes mencionada de ABTS. Después de 6 minutos se midió la absorbancia a la misma longitud de onda (734 nm). Los resultados son expresados como porcentaje de inhibición de la formación del radical. Para el cálculo de IC_{50} se graficó el logaritmo de la concentración contra el porcentaje de reducción de la oxidación, y se realizó una comparación con un estándar de (+)-catequina.

6.6. Análisis estadístico

Los resultados fueron reportados como la media \pm error estándar. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. Para la comparación entre todos los tratamientos se realizó la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05. También se realizó un análisis de correlación de Pairwise. Los datos se analizaron con el paquete estadístico JMP 5.0.1.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Condiciones ambientales

Debido a que el cultivo de las plantas se llevó a cabo a cielo abierto en condiciones semi-controladas, uno de los factores que se tomó en consideración fue el medio ambiente. Los cambios presentados durante el experimento se muestran en el Cuadro 4. Los datos son reportados por la estación meteorológica: 766250 (MMQT) Latitud: 20.58 | Longitud: -100.38 | Altitud: 1813 para Mayo 2011 y Enero 2012.

Cuadro 4. Temperatura ambiental, humedad relativa y precipitación pluvial registrados en Querétaro durante el mes de mayo 2011 y enero 2012.

Primavera (Mayo 2011)					Invierno (Enero 2012)				
T	TM	Tm	H	PP	T	TM	Tm	H	PP
23	33	13.9	36.9	9.41	13.8	24	5.1	51.8	7.11

*Los datos representan la media mensual

T = Temperatura media (°C), TM = Temperatura máxima (°C), Tm = Temperatura mínima (°C), H = Humedad relativa media (%), PP = Precipitación total de lluvia (mm).

El promedio de la temperatura media registrada durante el trabajo experimental durante la época de primavera fue de 23 °C y para invierno 13.8 °C. El promedio de la humedad relativa ambiental fue de 36.9 y 51.8% respectivamente. Estas diferencias son propias de la estación.

7.2. Cambios visuales en la planta de hierbabuena sometida a estrés hídrico

Cuando una planta se encuentra sometida a condiciones significativamente diferentes de las óptimas para su desarrollo y mantenimiento se dice que está

sometida a estrés, si bien las diferentes especies o variedades difieren en sus requerimientos óptimos y por tanto a su susceptibilidad a un determinado estrés (Hsiao, 1973; Levitt, 1980).

El alto grado de organización de los seres vivos, incluyendo las plantas, supone la presencia de relaciones complejas y múltiples en relación al ambiente.

La influencia ambiental sobre una planta estará determinada tanto por la intensidad como por la duración del correspondiente factor en interacción con los rasgos genéticos característicos de la planta. Para cada uno de los numerosos procesos fisiológicos que constituyen un sistema viviente existe siempre un “límite de estabilidad” (Zlatev y col., 2003) a partir del cual una determinada variable ambiental o factor abiótico generan estrés en un organismo.

En sistemas biológicos se ha adoptado el concepto físico de tensión-deformación (stress-strain) para analizar los procesos que ocurren cuando una planta se encuentra sometida a una situación de estrés (Valladares y col. 2004). Así, el estrés biológico sería cualquier factor ambiental capaz de producir una deformación (strain) potencialmente nociva en un organismo (Levitt, 1980). La deformación o strain sería la respuesta a una tensión o estrés determinado al que está sometido la planta, mismo que se puede observar en la Figura 15, donde el cambio o strain ocasionado a la planta debido al estrés hídrico al cual fue sometida es claro en las hojas de hierbabuena. Al momento en que la planta percibe el déficit de agua genera una respuesta a nivel tanto fisiológico como metabólico. Al término del estrés las plantas fueron rehidratadas observándose una recuperación y reparación del daño causado, es decir, una disminución del estado de strain.

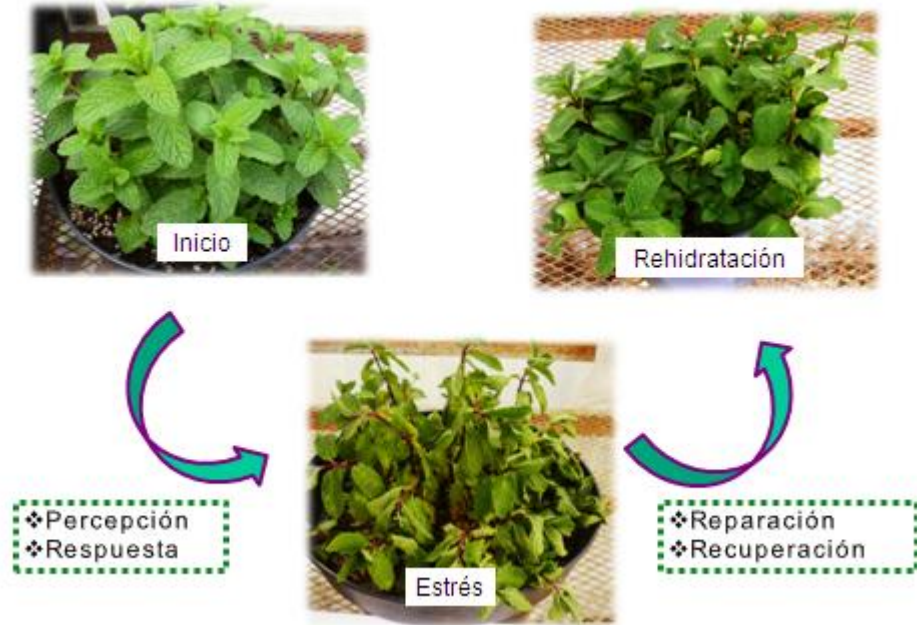


Figura 15. Cambios visuales en la planta de hierbabuena sometida a estrés hídrico y su posterior rehidratación.

Las plantas se sometieron al déficit hídrico hasta lograr los porcentajes de 35, 22, 15 y 18%, en la Figura 16 se observan los días que se necesitaron para que las 30 plantas llegaran al porcentaje de humedad indicado para cada estrés.

En primavera las hierbabuenas tardaron menos días para los correspondientes tratamientos respecto a invierno, esto debido a que los días en invierno son menos cálidos; cuando la temperatura media ambiental es más alta como en el caso de primavera la planta tiene mayores requerimientos hídricos, por lo que se estresan con más rapidez.

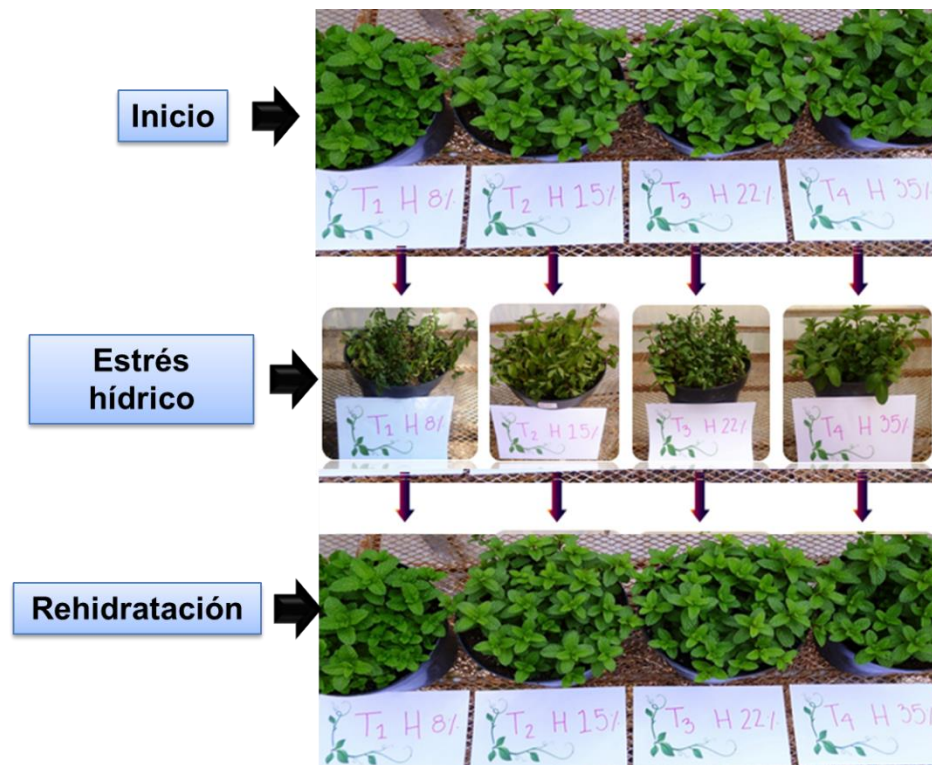


Figura 17. Plantas de hierbabuena sometidas a condiciones óptimas de humedad y después de los diferentes porcentajes de estrés hídrico.

Al someter a estrés hídrico a las plantas, pasan por un marchitamiento incipiente caracterizado por cierre de estomas, marchitamiento temporario con manifestaciones macroscópicas (flacidez, hojas dobladas, etc.) hasta el marchitamiento permanente, situación donde aun cuando el vegetal cuente con agua no puede recuperarse. Con el cierre de estomas la planta se previene de la pérdida de agua a través de las hojas y para poder soportar las necesidades hídricas de la planta (Squeo y León, 2007).

Esta respuesta fisiológica se observó en todos los tratamientos, siendo mayor el fenómeno en las plantas sometidas a una humedad de 8%, presentando un mayor número de hojas enrolladas debido al cierre de estomas, esto debido a que era el tratamiento más severo. Sin embargo al momento del proceso de rehidratación

todas las plantas recuperaron sus condiciones ideales, de tal manera que el estrés más severo no es considerado un estrés fulminante para la planta.

7.3. Contenido de compuestos fenólicos totales de infusiones de hierbabuena sometida a estrés hídrico

7.3.1. Concentración de fenoles totales en infusiones

El contenido de fenoles totales expresados como mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra seca (mg eq. ac. gálico/ g de muestra seca) se muestran en el Cuadro 5. En el caso de la muestra control (inicio) se obtuvieron concentraciones aproximadas de 56.83 ± 0.26 mg eq. ac. gálico/g de muestra seca sin diferencia estadística significativa entre tratamientos. Morales y col., (2008) determinaron el contenido de compuestos fenólicos en infusiones de menta, hierbabuena, té verde entre otras, donde la hierbabuena fue una de las muestras que presentaron el mayor contenido de compuestos fenólicos. De igual manera estos autores reportan una concentración de polifenoles totales para hierbabuena de aproximadamente 35 mg eq. ac. gálico/g de muestra seca, menor al obtenido en este trabajo. Horacio-Gúzman y col., (2005) reportan un contenido de fenoles totales en infusión de hierbabuena de 52 mg eq. ac. gálico/g de muestra seca el cual es similar al encontrado en este trabajo en las plantas en su estado óptimo y antes de aplicar el estrés, cuando las plantas fueron sometidas a diferentes condiciones de estrés hídrico se puede observar que hay un incremento estadísticamente significativo de fenoles totales en todos los tratamientos. Kayoko y col., (2010) demostraron que en una variación de factores como humedad afecta el contenido de fenoles totales.

En cuanto al estrés el tratamiento bajo una humedad en suelo de 22% en la estación de primavera obtuvo la mayor concentración de polifenoles totales siendo esta de 107.71 ± 0.98 mg eq. ac. gálico/g de muestra seca, de igual manera para

rehidratación el tratamiento 22% obtuvo el mayor contenido siendo este de 70.48 ± 0.35 mg eq. ac. gálico/g de muestra seca.

Ayaz y col., (1999) estudiaron el estrés hídrico en *Calatea rosea* (*Ctenanthe setosa*) donde las plantas se dejaron sin riego para inducir enrollamiento de las hojas (estrés). Después de 35 días de tratamiento observaron un enrollamiento general, y un incremento en la concentración de compuestos fenólicos.

Como se observa en el Cuadro 5, los mejores resultados en cuanto al contenido de compuestos fenólicos en infusiones fueron aquellas plantas con un estrés hídrico intermedio, cuando las plantas fueron sometidas a un mayor estrés no se llevó a cabo una mayor síntesis de compuestos comparado con el control. Algunos autores como Said-Al y col., (2009) estudiaron el efecto del estrés hídrico en orégano (80, 60 y 40% de humedad disponible en el suelo) sobre la producción de aceite esencial de plantas de orégano, ellos observaron que una condición de tensión media (tratamiento 60% de humedad en suelo) acelera la producción del metabolito de interés, mientras que las condiciones de estrés severo debido al déficit de agua (tratamiento 40% de humedad en suelo) disminuyen la biosíntesis de este metabolito. Resultados similares son reportados por Said-Al y Omer (2009) para *Dracocephalum moldavica* L. Sin embargo en estudios realizados en plantas de La vid, Ojeda y col. (2001) encontraron una mayor biosíntesis de polifenoles en el déficit hídrico severo que en un déficit hídrico moderado. De tal forma que este fenómeno puede estar relacionado con el tipo de planta a la cual se somete a estrés hídrico y su resistencia al mismo, es decir que en el caso de hierbabuena al encontrarse en condiciones muy severas su estado de síntesis de cualquier metabolito (aunque sea de defensa) disminuye al no ser viable las funciones vitales de la planta.

Para la estación de invierno, se observó el mismo comportamiento que primavera, sin embargo los valores obtenidos son menores a los que se obtuvieron en

primavera. Como ha sido observado por otros investigadores, el contenido fenólico foliar aumenta durante la primavera y verano, lo que se atribuye a que la mayoría de estos compuestos cumplen funciones de defensa contra depredadores, patógenos e irradiación solar, característicos en esta estación; mientras que su disminución durante el otoño-invierno se atribuye a la moderación de esos factores (Salminen y col., 2004). Y esto pudiera estar relacionado con los resultados de concentraciones de polifenoles entre las plantas para las diferentes estaciones.

El contenido de fenoles totales proporciona información relevante sobre la posible acción biológica que pudieran presentar las infusiones analizadas. Algunos autores reportan que alimentos y bebidas con compuestos polifenólicos además de su capacidad antioxidante pueden tener un efecto antiinflamatorio, antiobesigénico, hepatoprotector, antimicrobiano, antiviral, así como retardar la progresión de aterosclerosis y reduciendo la incidencia de enfermedades cardiovasculares, previniendo estrés oxidativo (Gil y col., 2000, Aviram y col., 2004).

Cuadro 5. Contenido de fenoles totales de infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita*) sometidas a estrés hídrico y posterior rehidratación.

Fenoles totales (mg eq. ac. gálico/g de muestra seca)						
	Primavera			Invierno		
	Inicio	Estrés	Rehidratación	Inicio	Estrés	Rehidratación
T 8%	56.83 ± 0.26 ^{Baz}	83.44 ± 0.28 ^{Acx}	73.03 ± 0.29 ^{Bay}	63.26 ± 0.95 ^{Aaz}	79.59 ± 0.14 ^{Bbx}	77.3 ± 0.49 ^{Aay}
T 15%	56.84 ± 0.25 ^{Baz}	89.22 ± 1.47 ^{Abx}	67.54 ± 0.17 ^{Acy}	63.27 ± 0.94 ^{Aaz}	81.47 ± 0.30 ^{Bbx}	65.61 ± 0.41 ^{Bcy}
T 22%	56.83 ± 0.26 ^{Baz}	107.71 ± 0.98 ^{Aax}	70.48 ± 0.35 ^{Aby}	63.27 ± 0.95 ^{Aaz}	87.02 ± 1.40 ^{Bax}	70.74 ± 0.37 ^{Aby}
T 35%	56.82 ± 0.24 ^{Baz}	62.66 ± 0.89 ^{Bdx}	60.03 ± 0.19 ^{Bdy}	63.28 ± 0.96 ^{Aay}	66.68 ± 0.46 ^{Acx}	63.96 ± 0.21 ^{Ady}

Cada valor representa la media ± EE.

A, B Indica diferencia estadística significativa (α 0.05) entre estaciones con la prueba de Tukey.

a, b, c, d Indica diferencia estadística significativa (α 0.05) entre renglones de la misma estación con la prueba de Tukey.

x, y, z Indica diferencia estadística significativa (α 0.05) entre columnas de la misma etapa con la prueba de Tukey.

7.3.2. Concentración de flavonoides totales en infusiones

Los flavonoides tienen la propiedad de donar electrones y átomos de hidrógeno, así como quelar metales, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Martínez y col., 2002). Los resultados obtenidos para el contenido de flavonoides en las infusiones de hierbabuena a diferentes condiciones de estrés fueron expresados en mg equivalentes de rutina/g de muestra seca (mg eq. rutina/ g) y se muestran en el Cuadro 6. Como se puede observar, los resultados para inicio primavera e invierno muestran diferencia estadística significativa entre tratamientos, de igual manera para el contenido entre estaciones. Los mejores tratamientos en cuanto a flavonoides totales fueron las infusiones realizadas con las muestras de primavera 8% de humedad e invierno 8% de humedad, las cuales obtuvieron una concentración de 15.29 ± 0.10 y 20.50 ± 0.14 mg eq. rutina/g respectivamente.

Esto nuevamente puede ser debido a la influencia ejercida del medio ambiente característico de la estación, que a pesar de observarse un incremento en estos compuestos en las diferentes condiciones de estrés en cada estación del año, tanto la temperatura como la humedad del medio ambiente ejerce un efecto sobre la síntesis de flavonoides. Sin embargo se podría decir que aunado a las condiciones climáticas la aplicación de un periodo corto de estrés hídrico producirá un incremento de flavonoides en este material vegetal.

También se puede observar que las infusiones que obtuvieron mayor concentración de polifenoles totales no fueron aquellas que obtuvieron mayor concentración en flavonoides. Algunos autores como Bedascarrasbure y col., 2004 reportan que el contenido de flavonoides, antocianinas y compuestos fenólicos no flavonoides están relacionado con el contenido de fenoles totales, sin embargo un mayor contenido de fenoles totales no necesariamente determina un mayor contenido de flavonoides.

Cuadro 6. Contenido de flavonoides totales de infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita*) sometidas a estrés hídrico y posterior rehidratación.

Flavonoides totales (mg eq. rutina/g de muestra seca)						
	Primavera			Invierno		
	Inicio	Estrés	Rehidratación	Inicio	Estrés	Rehidratación
T 8%	10.82 ± 0.20 ^{Baz}	15.29 ± 0.10 ^{Bax}	11.59 ± 0.09 ^{Baby}	20.19 ± 0.15 ^{Aax}	20.50 ± 0.14 ^{Aay}	16.40 ± 0.05 ^{Abz}
T 15%	10.81 ± 0.25 ^{Bay}	14.35 ± 0.09 ^{Bbx}	11.25 ± 0.35 ^{Bby}	20.20 ± 0.25 ^{Aax}	16.58 ± 0.17 ^{Abz}	18.14 ± 0.07 ^{Aay}
T 22%	10.82 ± 0.23 ^{Baz}	13.11 ± 0.04 ^{Bcx}	12.02 ± 0.04 ^{Bay}	20.18 ± 0.16 ^{Aax}	15.17 ± 0.10 ^{Acz}	16.14 ± 0.10 ^{Aby}
T 35%	10.80 ± 0.20 ^{Bay}	12.42 ± 0.06 ^{Bdx}	12.04 ± 0.25 ^{Bax}	20.19 ± 0.15 ^{Aax}	16.62 ± 0.20 ^{Abz}	18.47 ± 0.15 ^{Aay}

Cada valor representa la media ± EE.

A, B Indica diferencia estadística significativa (α 0.05) entre estaciones con la prueba de Tukey.

a, b, c, d Indica diferencia estadística significativa (α 0.05) entre renglones de la misma estación con la prueba de Tukey.

x, y, z Indica diferencia estadística significativa (α 0.05) entre columnas de la misma etapa con la prueba de Tukey.

7.4. Capacidad antioxidante de las infusiones

La medida de la capacidad antioxidante en productos alimenticios es una determinación de cuestionamientos interesantes, porque puede proveer una variedad de información, tal como la resistencia a la oxidación, contribución cuantitativa de sustancias antioxidante o la actividad antioxidante que ellos pueden presentar dentro del organismo cuando es consumido (Zuleta y col., 2009). Numerosos estudios han conducido a evaluar la capacidad antioxidante de los productos alimenticios, sin embargo no hay un método oficial estandarizado y por lo tanto es recomendado que cada evaluación se realice con varias condiciones de oxidación y diferentes métodos (Frankel y Meyer, 2000). Para evaluar la capacidad antioxidante de las infusiones, se usaron las técnicas DPPH^{*} y ABTS^{**}, cuyo mecanismo de acción se basa en la transferencia de electrones.

7.4.1. Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH

Los métodos para determinar capacidad antioxidante se basan en comprobar que un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable el cual es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante, por lo que esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto (Frankel y Meyer, 2000). La concentración inhibitoria media es una herramienta importante para medida de la capacidad antioxidante, ya que establece la concentración de una sustancia, (infusiones) que es necesaria y efectiva para la obtención de un 50% de un máximo efecto de inhibición del radical que está provocando el daño. De manera que valores menores en la IC₅₀ reflejarían una mayor capacidad antioxidante de la muestra.

Los resultados de la concentración inhibitoria media (IC₅₀) para el ensayo de DPPH se muestran en el Cuadro 7. Se puede observar que las infusiones de los tratamientos primavera con estrés hídrico del 22%, invierno estrés 8%, 22%, 35% y

rehidratación 15% fueron las que obtuvieron una menor concentración, incluso menor que el estándar utilizado, esto puede ser debido a que los compuestos que están presentes en las infusiones podrían actuar de forma sinérgica, ya que como reportan algunos autores como Frankel y Meyer (2000), Sánchez (2002) y Aruoma (2003), la capacidad antioxidante total de una muestra está determinada por interacciones sinérgicas entre los diferentes compuestos, y no solamente por el método de acción específico de cada uno de ellos. De tal manera que este sinergismo puede incrementar dicha capacidad antioxidante, la cual puede ser superior incluso al de estándar usado, el cual de manera general es un compuesto puro.

Para el caso de las demás infusiones de hierbabuena estas muestran un mayor valor de IC_{50} , lo cual nos puede indicar que los compuestos que están otorgando esta capacidad antioxidante no son tan efectivos como los encontrados en el resto de las infusiones esto podría ser debido a la estructura química de los compuestos, algunos de ellos tiene una mayor o menor capacidad de donar átomos de hidrogeno o electrones, es posible inferir que las muestras contienen diferentes compuestos con potencial antioxidante.

Cuadro 7. Capacidad antioxidante (DPPH) de infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita*) sometidas a estrés hídrico y posterior rehidratación.

	DPPH* (IC ₅₀)					
	Primavera			Invierno		
	Inicio	Estrés	Rehidratación	Inicio	Estrés	Rehidratación
T 8%	36.69 ± 0.70 ^{Aax}	31.97 ± 0.25 ^{Aby}	31.07 ± 0.98 ^{Aaby}	35.87 ± 0.15 ^{Aax}	25.38 ± 0.10 ^{Bcz}	30.54 ± 0.10 ^{Aby}
T 15%	36.68 ± 0.71 ^{Aax}	29.47 ± 0.15 ^{Bcy}	29.99 ± 0.58 ^{Aby}	35.86 ± 0.15 ^{Aax}	34.08 ± 0.18 ^{Aay}	27.28 ± 0.05 ^{Bcz}
T 22%	36.67 ± 0.70 ^{Aax}	25.19 ± 0.40 ^{Adz}	31.25 ± 0.30 ^{Aaby}	35.87 ± 0.16 ^{Aax}	23.18 ± 0.25 ^{Bdz}	30.69 ± 0.94 ^{Aby}
T 35%	36.68 ± 0.70 ^{Aax}	34.7 ± 0.38 ^{Aaxy}	33.56 ± 0.86 ^{Aay}	35.88 ± 0.15 ^{Aax}	23.76 ± 0.11 ^{Bdz}	33.81 ± 0.21 ^{Aay}
(+)-Catequina						
	31.96 ± 1.33 ^{Ab}	31.96 ± 1.33 ^{Ab}	31.96 ± 1.33 ^{Aab}	31.96 ± 1.33 ^{Ab}	31.96 ± 1.33 ^{Ab}	31.96 ± 1.33 ^{Aab}

Cada valor representa la media ± EE.

A, B Indica diferencia estadística significativa (α 0.05) entre estaciones con la prueba de Tukey.

a, b, c, d Indica diferencia estadística significativa (α 0.05) entre renglones de la misma estación con la prueba de Tukey.

x, y, z Indica diferencia estadística significativa (α 0.05) entre columnas de la misma etapa con la prueba de Tukey.

7.4.2. Determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS

Los resultados de la concentración inhibitoria media (IC_{50}) para ABTS se muestran en el Cuadro 8. Se puede observar que todas las infusiones presentan capacidad antioxidante debido a que inhiben el radical ABTS, sin embargo la infusión del tratamiento con hierbabuena sometido al estrés hídrico 22% durante la primavera es la que tiene un menor IC_{50} siendo este de 9.70 ± 0.09 ; el análisis estadístico nos muestra que entre las muestras y el estándar existe diferencia significativa, esta información nos indica que los componentes de la hierbabuena que le confieren la capacidad antioxidante pueden estar actuando de manera sinérgica incrementando la capacidad antioxidante.

Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico (Anolovich y col., 2002). De tal manera que algunos de los compuestos presentes en las infusiones como son los flavonoides son de carácter hidrofílico, por lo cual se expresan su mayor actividad en microambientes ideales, de tal manera que las infusiones lograron una mayor inhibición del radical ABTS. El método de DPPH detecta solo aquellos antioxidantes que se disuelven en solventes orgánicos, como alcoholes (Arnao, 2000). Una desventaja de este método es la inaccesibilidad de DPPH estérico (es decir las moléculas pequeñas pueden tener una mejor oportunidad de acceder a los radicales dando valores más altos para la capacidad antioxidante), además de un estrecho rango lineal de la absorbancia frente a la concentración. Roginsky y Lissi (2005) analizaron las diferencias entre ABTS y DPPH encontrando que este último no reacciona con flavonoides carentes de grupos hidroxilos en el anillo B, ni con ácidos aromáticos que contengan un solo grupo hidroxilo. De manera que los antioxidantes pueden actuar por múltiples mecanismos dependiendo del sistema de reacción o la fuente radicalaria u antioxidante (Prior y col., 2005). Con el fin de conocer las diferencias en cuanto a mecanismos y tipos de compuestos que están presentes en las infusiones es de

suma importancia analizar esta actividad biológica con diferentes metodologías que permitan ampliar el margen de conocimiento sobre los materiales de análisis.

Rodríguez y col. (2006) estudiaron la actividad antioxidante de la hierbabuena (*Mentha spicata* L.), menta (*Mentha piperita* L.), entre otras, las cuales exhiben actividades antioxidantes diferentes, de acuerdo con los valores estimados por el ensayo de ABTS, observaron que tanto la hierbabuena como la menta se distinguen por su elevado poder antirradical.

Cuadro 8. Capacidad antioxidante (ABTS) de infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita*) sometidas a estrés hídrico y posterior rehidratación.

	ABTS ^{•+} (IC ₅₀)					
	Primavera			Invierno		
	Inicio	Estrés	Rehidratación	Inicio	Estrés	Rehidratación
T 8%	18.45 ± 0.16 ^{Aax}	15.79 ± 0.28 ^{Aay}	10.84 ± 0.17 ^{Abz}	13.91 ± 0.10 ^{Bax}	13.38 ± 0.06 ^{Bbx}	10.55 ± 0.25 ^{Acy}
T 15%	18.44 ± 0.17 ^{Aax}	12.53 ± 0.08 ^{Abz}	14.31 ± 0.19 ^{Aay}	13.92 ± 0.12 ^{Bax}	10.86 ± 0.09 ^{Bcy}	13.86 ± 0.17 ^{Aax}
T 22%	18.44 ± 0.16 ^{Aax}	9.70 ± 0.09 ^{Bcz}	14.10 ± 0.27 ^{Aay}	13.91 ± 0.10 ^{Bax}	14.16 ± 0.10 ^{Aax}	12.58 ± 0.17 ^{Bby}
T 35%	18.43 ± 0.18 ^{Aax}	12.66 ± 0.17 ^{Bby}	11.57 ± 0.22 ^{Bbz}	13.93 ± 0.11 ^{Bax}	14.48 ± 0.24 ^{Aax}	12.63 ± 0.36 ^{Aby}
(+)-Catequina	7.54 ± 0.15 ^{Ab}	7.54 ± 0.15 ^{Ad}	7.54 ± 0.15 ^{Ac}	7.54 ± 0.15 ^{Ab}	7.54 ± 0.15 ^{Ad}	7.54 ± 0.15 ^{Ad}

Cada valor representa la media ± EE.

A, B Indica diferencia estadística significativa (α 0.05) entre estaciones con la prueba de Tukey.

a, b, c, d Indica diferencia estadística significativa (α 0.05) entre renglones de la misma estación con la prueba de Tukey.

x, y, z Indica diferencia estadística significativa (α 0.05) entre columnas de la misma etapa con la prueba de Tukey.

Los mejores resultados en cuanto a capacidad antioxidante (IC_{50}) fueron los obtenidos para el tratamiento estrés hídrico 22% primavera, con valores de 25.19 ± 0.40 para DPPH y 9.70 ± 0.09 para ABTS, estas diferencias pueden deberse a la naturaleza del ensayo. Los métodos como ABTS y DPPH para la evaluación de la capacidad antioxidante presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias (Antolovich y col., 2002). El ABTS es una técnica que se lleva a cabo en medio acuoso (mayor polaridad), mientras que DPPH se realiza en un medio orgánico. La diferencia entre estos ensayos puede ser atribuida a factores como las condiciones de reacción y solubilidad, además de que los antioxidantes son dependientes de diversos factores como la polaridad del medio, la temperatura, el tipo de sustrato, las condiciones de oxidación, el estado físico del sistema y la presencia de otros compuestos, que pueden ejercer relaciones contrarias o sinérgicas con las moléculas evaluadas (Arnao, 2000; Roginsky y Lissi, 2005).

Con el fin de observar una relación entre el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de las infusiones preparadas con hojas de plantas de hierbabuena sometidas a diferentes condiciones de estrés hídrico y posterior rehidratación se realizó un análisis estadístico de correlación, mostrando los resultados tanto para la estación de primavera como de invierno en el Cuadro 9. Se puede observar que la mayor relación fue para el experimento realizado en la estación de primavera que en invierno, esto puede ser debido a que en esta estación se produjo una mayor síntesis de estos compuestos viéndose reflejado en una mayor capacidad antioxidante medida por la estabilización del radical ABTS y DPPH.

En el caso de condición de estrés hídrico y de rehidratación, fue mayor la correlación observada para condición de estrés, especialmente para radical ABTS. Esto pudiera estar relacionado con las características del radical y del compuesto sintetizado a causa del estrés hídrico. Okawa y col., (2001) menciona que la mayor capacidad antioxidante de una muestra está relacionado con la características

propias del antioxidante, es decir, a la posición del grupo hidroxilo de los fenoles presentes en la solución. De manera que esto pudiera explicar una mayor correlación en radical ABTS que en DPPH.

En el caso de rehidratación se muestra una relación positiva menor que en condición de estrés, lo cual pudiera estar relacionado a que se observó un menor contenido de síntesis de compuestos ya que la planta estaba fuera de estrés y no requería activar esta vía como defensa.

Cuadro 9. Correlaciones de Pairwise para las variables de contenido total de fenoles y contenido total de flavonoides y capacidad antioxidante medido por los ensayos de DPPH y ABTS de los diferentes tratamientos de estrés hídrico sobre hierbabuena.

	Tratamiento 8%					Tratamiento 15%			
	Primavera		Invierno			Primavera		Invierno	
	ABTS ³	DPPH ³	ABTS ³	DPPH ³		ABTS ³	DPPH ³	ABTS ³	DPPH ³
Inicio					Inicio				
Fenoles ¹	0.40	0.98	0.19	0.19	Fenoles ¹	0.40	0.98	0.19	0.19
Flavonoides ²	0.32	0.49	0.35	0.40	Flavonoides ²	0.32	0.49	0.35	0.40
Estrés					Estrés				
Fenoles ¹	0.84	0.80	0.68	0.66	Fenoles ¹	0.93	0.50	0.16	0.72
Flavonoides ²	0.27	0.22	0.07	0.71	Flavonoides ²	0.27	0.60	0.15	0.60
Rehidratación					Rehidratación				
Fenoles ¹	0.78	0.70	0.44	0.70	Fenoles ¹	0.11	0.89	0.06	0.58
Flavonoides ²	0.61	0.62	0.57	0.69	Flavonoides ²	0.31	0.96	0.34	0.13

	Tratamiento 22%					Tratamiento 35%			
	Primavera		Invierno			Primavera		Invierno	
	ABTS ³	DPPH ³	ABTS ³	DPPH ³		ABTS ³	DPPH ³	ABTS ³	DPPH ³
Inicio					Inicio				
Fenoles ¹	0.40	0.98	0.19	0.19	Fenoles ¹	0.40	0.98	0.19	0.19
Flavonoides ²	0.32	0.49	0.35	0.40	Flavonoides ²	0.32	0.49	0.35	0.40
Estrés					Estrés				
Fenoles ¹	0.95	0.65	0.16	0.59	Fenoles ¹	0.96	0.93	0.47	0.36
Flavonoides ²	0.20	0.40	0.38	0.51	Flavonoides ²	0.52	0.49	0.46	0.45
Rehidratación					Rehidratación				
Fenoles ¹	0.62	0.79	0.03	0.59	Fenoles ¹	0.38	0.30	0.30	0.72
Flavonoides ²	0.46	0.65	0.67	0.36	Flavonoides ²	0.43	0.51	0.36	0.20

¹Resultados expresados en mg eq. ac. gálico/ g de muestra seca.

²Resultados expresados en mg eq. rutina/ g de muestra seca.

³Resultados expresados como IC₅₀ (µg/g de muestra seca).

VIII. CONCLUSIONES

-Tratamientos severos de estrés hídrico (8%) afecta el crecimiento de las plantas y no aumentan la síntesis de compuestos fenólicos.

-El estrés hídrico 22% incrementa la producción de metabolitos secundarios como los polifenoles en hierbabuena, aumentando a su vez la capacidad antioxidante de infusiones preparadas con hojas de plantas sometidas a estas condiciones.

-Las condiciones climáticas afectan la producción de fenoles, siendo mejor la respuesta de la planta de hierbabuena durante la estación de primavera.

-Se observó una menor síntesis de compuestos polifenólicos en condición de rehidratación, lo cual se atribuyó al hecho de que la planta recuperaba su estado ideal para su mantenimiento, inhibiendo así cualquier vía de defensa.

-El estrés hídrico representa una herramienta importante para el incremento de compuestos con actividad biológica como los polifenoles en hierbabuena. Permitiendo incrementar el valor agregado de este cultivo y de sus productos como son las infusiones, las cuales se pueden considerar como una fuente exógena de compuestos bioactivos con alta capacidad antioxidante.

IX. REFERENCIAS

- Antolovich**, M., Prenzler, R., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K. Methods for testing antioxidant activity, *Analyst.*, **2002**;127: 183-198.
- Arnao**, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case; *Trends Food Sci. Technol.*, **2000**; 11: 419-421.
- Aruoma**, O.I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods; *Mutation research*, **2003**; 523-24: 9-20.
- Avello**, M., Suwalsky, M. Radicales libres, Antioxidantes naturales y mecanismos de protección, **2006**.
- Aviram**, M., Rosenblat, M., Gaitini, D., Nitecki, S., Hoffman, A., Dornfeld, L., Volkova, N., Presser, D., Attias, J., Liker, H., Hayek, T. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clin Nutr.*, **2004**; 23(3):423–433.
- Ayaz**, F. A., Kadioglu, A., Turgut, R. Water stress effects on the content of low molecular weight carbohydrates and phenolic acids in *Ctenanthe setosa* (Rosc.) Eichler, *Canadian journal of plant science*, **1999**.
- Bedascarrasbure**, E., Maldonado, L., Álvarez, A., Rodríguez E. Contenido de Fenoles y Flavonoides del Propóleos Argentino, *Acta Farm. Bonaerense*, **2004**; 23 (3): 369-72.
- Bohnert**, H., Nelson, D., Jensen, R. Adaptations to Environmental Stresses. *The Plant Cell*, American Society of Plant Physiologists. Department of Molecular and Cellular Biology. Arizona, **1995**; vol. 7.
- Brand-Williams**, W., Cuvelier, M., Berset, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **1995**; 22:25-30.
- Bravo** L. Polyphenol: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr Rev*, **1998**; 56:317-333.

Cohen, S., Kennedy, J. Plant Metabolism and the Environment: Implications for Managing Phenolics. Department of Food Science and Technology. USA, **2010**; 50:620-643.

Córdova-Villalobos, J., Barriguete-Meléendez J., Lara-Esqueda A., Barquera S., Rosas-Peralta M., Hernández-Ávila M., De León-May M., Aguilar-Salinas C. Chronic non-communicable diseases in Mexico: epidemiologic synopsis and integral prevention. *Salud Publica Mex*, **2008**; 50:419-427.

Covarrubias, A. Sobrevivir al estrés: cómo responden las plantas a la falta de agua. *Biotecnología*, **2007**.

Criado, C., Moya, M. Vitaminas y antioxidantes. Actualizaciones del Medico, Grupo Saned, **2009**.

Díaz, M., Pérez, M., González, V., Dolores, C. Influence of drying on the flavor quality of spearmint (*Mentha spicata* L.). *J. Agric. Food Chem*, **2003**; 51:1265-1269.

Dixon, R., Palva, N. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. American Society of Plant Physiologists. *The Plant Cell*, **1995**; vol. 7:1085-1097.

Finkel, T., Holbrook, N. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, **2000**; 408:239-247.

Frankel, E.N., Meyer, A.S. Review. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2000**; 80: 1925-41.

Fridovich, I. Free radicals in Biology, Academic Pres, **1976**. Vol.1.

Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., Ritieni, A. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **1999**; 47: 1035-1040.

Gordon M.H. The mechanism of antioxidant action *in vivo*. *Food Antioxidants*, Elsevier, London, **1990**;1-18.

Gil, M.I., Tomás, F.A., Hess, B., Holcroft, D.M., Kader, A.A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing, *J Agric Food Chem*, **2000**; 48:4581-4589.

Ho, C. Phenolic compounds in food and their effects on health. Analysis, occurrence and chemistry. Ho, Lee and Huang (Eds). American Society, Washintong, **1992**; 1:7.

Hoffman, P. Herbolaria y nutrición natural. Ed. Pax. México. México, **2005**; 121-122.

Horacio-Guzman, S., Torres-Pacheco, I., Mora- Avilés, A., Acosta- Gallegos, A., Miranda- López, R., Guevara- Lara, R. Potencial de plantas de uso común en México como fuente de compuestos fenólicos, hierro y vitamina C. Agricultura Técnica en México, **2005**; 31: 115-113.

Hsiao, T. Plant responses to water stress. Ann. Rev. Plant Physiol., **1973**; 24: 519-570.

Julkunen-Titto, R. Phenolic constituents in the leaves of Nothern willows: Methods for the analysis of certain phenolics, Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 33 No.2, **1985**, 213-217.

Kayoko, K., Saiko, A., Mitsuhiro, N., Shizo, I., Masao, H. Major Water-soluble polyphenols, proanthocyanidins, in leaves of perssimon (*Dyospiros kaki*) and their α -Amylase Inhibitory Activity, Biosci. Biotechnol. Biochem., **2010**; 74(7):1380-1385.

King A, Young G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. J. Am. Diet Assoc, **1999**; 99:214.

Kuli, T., Vinja, K., Dragovi Uzelac, V., Ljubenkov, I., Kriko, A., Dejanovi B., Juki, M., Politeo, O., Pifat, G., Milo, M. Antioxidant and Acetylcholinesterase Inhibiting Activity of Several Aqueous Tea Infusions *in vitro*. Food Technol. Biotechnol, **2008**; 46:368-375.

Kwak, J., Mori, I., Pei, Z., Leonhardt, N., Torres, M., Dangl, D., Bloom, R., Bodde, S., Jones, J., Schroeder, J. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. The EMBO Journal, **2003**; vol. 22 No. 1:2623-2633.

Levitt, J. Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, New York. **1980**.

Lini, H., Rumei L., Peiyuan L., Yanfang L., Rui C., Chaocheng D., Chengsheng L., Xiangyong W., Yaohua L. Antioxidant activity, total phenolic, and total flavonoid of extracts from the stems of *Jasminum nervosum* Lour. *Grasas y aceites*, **2011**; 2:149-154.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin Nutr*, **2004**; 79:727-47.

Martínez, F., González, G., Culebras, M., Tunón, J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*, **2002**; 6:271-278.

Muñiz, P., Sáez, G., Valls, V. Función y mecanismos antioxidantes. Importancia durante la transición feto-neonato. Radicales libres y estrés oxidativo en biomedicina importancia y utilidad de los antioxidantes en la prevención de procesos fisiopatológicos relacionados. *Fundación Valenciana de Estudios Avanzados*, **2000**; 63-70.

McKay, D., Jeffrey B. A Review of the Bioactivity and Potential Health Benefits of Peppermint Tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research* *Phytother*, **2006**; 20:619–633.

Moraes de Souza, R., Oldoni, T., Regitano, M., Alencar, S. Antioxidant Activity and Compounds Phenolic composition of herbal infusions consumed in Brazil. *Ciencia y Tecnología Alimentaria. Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos. México*, **2008**; vol. 6:41-47.

Moreno, L. Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, **2009**; 27:179-191.

Munguía, A., Cardoso, M., Inungaray, M. Antioxidantes: La magia de lo natural". *Revista Académica de Investigación*, **2011**.

Namiki, M. Antioxidants/antimutagens in food *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **1990**; 29, 273-300.

Nickavar, B., Alinaghi, A., Kamalinejad, M. Evaluation of the Antioxidant Properties of Five *Mentha* Species. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **2008**; 7 (3): 203-209.

Ojeda, H., Andary, C., Kraeva E., Carbonneau A., Deloire A. Influence of Pre- and Postveraison Water Deficits on Synthesis and Concentration of Skin Phenolic Compounds during Berry Growth of *Vitis vinífera* cv. Shiraz. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**; 53, 261-267 pp.

Okawa, M., KINJO, J., NOHARA, K., ONO, M. DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) Radical Scavenging Activity of Flavonoids Obtained from Some Medicinal Plants. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* Vol. 24, **2001**; No. 10 P 1202-1205.

Prior, R.L. Huang, D., B. The chemistry behind antioxidant capacity assays, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**; 53:1841-1856.

Quintero, J. Cultivo de Perejil y de la Hierbabuena. Publicaciones de extensión agraria. Madrid, **1985**.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggene, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, **1999**; 26:1231-1237.

Reyes, H., Beltrán, E., García, E., Pardo, M., Soriano, E. La Bioquímica y la Biología Molecular: Su relevancia en el estudio de los mecanismos de defensa y desarrollo de las plantas. *Cuerpo Académico de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas*, **2007**; No. 48.

Reşat A., Kubilay G., Birsen D., Mustafa Ö., Saliha E., Burcu B., Berker K., Dilek Ö. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay". *Molecules*, **2007**; 12:1496-1547.

Robertson, A. and Hall M.N. A critical investigation into the flavognot method for thea. *Food Chem*, **1989**; 34, 57-70.

Rodríguez, P., Menendez, J., Trujillo, Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cub Med Mil*, **2001**; vol. 30.

Rodríguez, J. L., Valdés, O., Alemán, A. "Evaluación de la actividad antioxidante de cinco hierbas aromáticas, Instituto de investigaciones para la industria alimenticia", *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, **2006**; vol. 16, no. 1.

Roginsky, V, Lissi E. Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. *Food Chem*, **2005**; 92(2): p. 235 - 254.

Said-Al Ahl, H. A. H., Omer, E. A., Naguib N.Y. Effect of water stress and nitrogen fertilizer on herb and essential oil of oregano, *Int. Agrophysics*, **2009**, 23, 269-275.

Said-Al Ahl, H. A. H., Abdou, M. A. A. Impact of water stress and phosphorus fertilizer on fresh herb and essential oil content of dragonhead, *Int. Agrophysics*, **2009**, 23, 403-407.

Salminen, J., Roslin, T., Karonen, M., Sinkkonen, J., Pihlaja, K., Pulkkinen, P. Seasonal variation in the content of hydrolyzable tannins, flavonoid glycosides, and proanthocyanidins in oak leaves, *Journal of Chemical Ecology*, **2004**; Vol. 30, No. 9.

Sánchez, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems, *Food Science and Technology International*, **2002**; 8(3): 121-39.

Santner, A., Calderon, L., Estelle, M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature chemical biology*, **2009**; vol. 5, No. 5.

Sepúlveda, G., Porta, H., Rocha, M. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. México, **2003**; vol. 21, No. 3:355-363.

Singleton, VL., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **1999**; 29:152-78.

Song, W., Zhang, Z., Shao, H., Guo, X., Cao, H., Zhao, H., Fu, Z., Hu, X. Relationship between calcium decoding elements and plant abiotic-stress resistance. *International Journal of Biological Sciences*, **2008**; 4(2):116-125.

Squeo, F., León, M. Transpiración. *Fisiología Vegetal*. Ediciones Universidad de La Serena. Chile, **2007**; 3:67-84.

Valladares, F., Vilagrosa, A., Peñuelas, J., Ogaya, R., Camarero, J., Corcuera, L., Sisó, S., Gil-Pelegrín, E. Estrés hídrico: ecofisiología y escalas de la sequía. **2004**.

Wolfram, S., Raederstorff, D., Wang, Y., Teixeira, S., Elste, V., Weber, P. TEAVIGO (epigallocatechingallate) supplementation prevents obesity in rodents by reducing adipose tissue mass. *Annals of Nutrition & Metabolism*, **2005**; 49:54-63.

Zuleta A., Esteve M., Frígola A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, **2009**; 114: p. 310 - 316.

Zlatev, Z., Berova, M., Stoeva, N., Vassilev, A. Use of physiological parameters as stress indicators. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, **2003**; 4 (4), 841-849.

Zhang, J., Jia, W., Yang, J., Ismail, A. Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research*, **2006**; 111–119.