



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EFECTO DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO EN LA  
PRODUCCIÓN DE FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES Y  
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN CUATRO DIFERENTES  
PLANTAS MEDICINALES”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

**MARÍA ISABEL NIETO RAMÍREZ**

DIRIGIDA POR

**DR. JUAN FERNANDO GARCÍA TREJO**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, DEL 2016.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EFECTO DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO EN LA  
PRODUCCIÓN DE FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES Y  
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN CUATRO DIFERENTES  
PLANTAS MEDICINALES”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

**MARÍA ISABEL NIETO RAMÍREZ**

DIRIGIDA POR

**DR. JUAN FERNANDO GARCÍA TREJO**

SINODALES

Dr. JUAN FERNANDO GARCÍA TREJO  
DIRECTOR

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO  
SINODAL

Dr. RAMÓN GERARDO GUEVARA GONZÁLEZ  
SINODAL

Dra. EMMA FABIOLA MAGALLÁN HERNÁNDEZ  
SINODAL

## ÍNDICE GENERAL

| Contenido                               | Página |
|-----------------------------------------|--------|
| ÍNDICE GENERAL                          | i      |
| ÍNDICE DE CUADROS                       | iii    |
| ÍNDICE DE FIGURAS                       | iv     |
| RESUMEN                                 |        |
| 1. ANTECEDENTES                         | 1      |
| 1.1 Planta Medicinal                    | 1      |
| 1.1.1 Importancia y usos                | 1      |
| 1.1.2 Consumo                           | 1      |
| 1.1.3 Producción Nacional               | 2      |
| 1.2 Plantas medicinales                 | 2      |
| 1.3 Compuestos Fenólicos                | 4      |
| 1.4 Biosíntesis de compuestos fenólicos | 5      |
| 1.5 Ácido Salicílico                    | 7      |
| 2. HIPÓTESIS                            | 9      |
| 3. OBJETIVOS                            | 10     |
| 3.1 General                             | 10     |
| 3.2 Específicos                         | 10     |
| 4. METODOLOGIA                          | 11     |
| 4.1 Materiales                          | 12     |
| 4.1.1 Material biológico                | 12     |

|        |                                              |    |
|--------|----------------------------------------------|----|
| 4.2    | Método                                       | 13 |
| 4.2.1  | Determinación de la calidad del agua         | 13 |
| 4.2.2  | Aplicación de elicitores                     | 13 |
| 4.2.3  | Muestreo                                     | 13 |
| 4.2.4  | Análisis del material vegetal                | 13 |
| 4.2.5  | Porcentaje de humedad                        | 14 |
| 4.2.6  | Extracción de compuestos fenólicos           | 14 |
| 4.2.7  | Determinación de fenoles totales             | 14 |
| 4.2.8  | Determinación de flavonoides totales         | 15 |
| 4.2.9  | Determinación de capacidad antioxidante DPPH | 15 |
| 4.2.10 | Determinación de capacidad antioxidante FRAP | 15 |
| 4.3    | Diseño experimental                          | 15 |
| 4.3.1  | Análisis estadístico                         | 16 |
| 5.     | RESULTADOS                                   | 17 |
| 5.1    | Calidad del agua                             | 17 |
| 5.2    | Porcentaje de humedad de materia vegetal     | 18 |
| 5.2.1  | Monitoreo climático                          | 18 |
| 5.3    | Compuestos bioactivos                        | 20 |
| 5.3.1  | Compuestos fenólicos                         | 20 |
| 5.3.2  | Flavonoides totales                          | 26 |
| 5.4    | Capacidad Antioxidante                       | 31 |
| 5.4.1  | Método DPPH                                  | 31 |
| 5.4.2  | Método FRAP                                  | 36 |
| 6.     | DISCUSIÓN                                    | 42 |
| 7.     | CONCLUSIONES                                 | 46 |
| 8.     | REFERENCIAS                                  | 47 |

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

Página

1 Promedio de las concentraciones (mg/L) de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y fósforo ( $\text{PO}_4^-$ ) en agua de cada sistema de riego durante el experimento.

17

## ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1 Ruta para la biosíntesis de Compuestos Fenólicos (González, 2010)                                                                                                                                                                                                                        | 6      |
| 2 Biosíntesis de Flavonoides, Taninos, Lignanós, Ligninas y Cutina (González, 2010)                                                                                                                                                                                                        | 6      |
| 3 Ruta bioquímica para la síntesis de Ácido Salicílico (Rangel y col., 2010).                                                                                                                                                                                                              | 8      |
| 4 Diagrama de bloques que conceptualiza el desarrollo de las actividades para obtener el efecto de las condiciones de cultivo en la producción de fenoles, flavonoides totales y capacidad antioxidante de las plantas medicinales.                                                        | 11     |
| 5 Diseño experimental de acuerdo al método factorial aleatorio.                                                                                                                                                                                                                            | 16     |
| 6 Temperatura ambiental en los dos tipos de cultivo (invernadero y cielo abierto) en un ciclo de 24 horas.                                                                                                                                                                                 | 19     |
| 7 Porcentaje de humedad relativa registrada en los dos tipos de cultivo (invernadero y campo) durante 24 horas de experimentación.                                                                                                                                                         | 19     |
| 8 Concentración de fenoles totales (mg/g eq. Á. Gálico) en plantas de árnica cultivadas en dos diferentes cultivos de cultivo y riego con la aplicación de un elicitador a diferentes concentraciones durante dos tiempos de aplicación. Los resultados se presentan en el error estándar. | 21     |
| 9 Concentración promedio de compuestos fenólicos (mg/g eq. Á. Gálico) en plantas de hierbabuena cultivadas en dos diferentes cultivos con dos sistemas de riego y elicitadas con ácido salicílico a diferentes concentraciones.                                                            | 23     |
| 10 Concentraciones promedio de fenoles totales (mg/g eq. Á. Gálico) de las plantas de orégano cultivadas en diferente tipo de cultivo,                                                                                                                                                     |        |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| con dos sistemas de riego y elicidadas con ácido salicílico a diferentes concentraciones.                                                                                                                                                                                                           | 24 |
| 11 Concentración promedio de compuestos fenólicos (mg/g eq. Á. Gálico) en plantas de toronjil que fueron cultivadas de dos formas distinta tratadas con dos diferentes tipos de riego y elicidadas con ácido salicílico a diferentes concentraciones. Los resultados se expresan en error estándar. | 25 |
| 12 Concentración de flavonoides totales (mg/g eq. Catequina) en plantas de árnica cultivadas en campo e invernadero con dos tipos de riego y elicidadas a dos concentraciones diferentes de ácido salicílico.                                                                                       | 27 |
| 13 Concentración de flavonoides totales (mg/g eq. Catequina) en las plantas de hierbabuena cultivadas en campo e invernadero, regadas con dos tipos de cultivo y elicidadas a dos concentraciones de ácido salicílico.                                                                              | 28 |
| 14 Concentración de flavonoides totales (mg/g eq. Catequina) en plantas de orégano cultivadas en dos diferentes tipos de cultivo (Campo e invernadero), con dos diferentes tipos de riego y elicidadas a diferentes concentraciones de ácido salicílico.                                            | 29 |
| 15 Concentración de flavonoides totales (mg/g eq. Catequina) en plantas de toronjil cultivadas en invernadero y campo, con dos sistemas de riego y dos concentraciones de elicitación con ácido salicílico.                                                                                         | 31 |
| 16 Capacidad antioxidante analizada por el método FRAP en plantas de árnica cultivadas en invernadero y campo con dos diferentes tipos de riego y elicitación a diferentes concentraciones de ácido salicílico.                                                                                     | 32 |
| 17 Capacidad antioxidante DPPH en plantas de hierbabuena que fueron cultivadas en campo e invernadero, regadas con solución nutritiva y agua acuícola y elicidadas a dos diferentes concentraciones de ácido salicílico.                                                                            | 34 |

- 18 Capacidad antioxidante DPPH en plantas de orégano cultivadas en invernadero y campo regadas con agua acuícola y solución nutritiva con la elicitación de ácido salicílico a dos diferentes concentraciones. 35
- 19 Capacidad antioxidante DPPH en plantas de toronjil cultivadas en invernadero y campo regadas con agua proveniente de un cultivo acuícola y solución nutritiva, con un elicitación con ácido salicílico a dos concentraciones. 36
- 20 Capacidad antioxidante analizada por el método FRAP en plantas de árnica cultivadas en campo e invernadero con dos tipos de riego y la elicitación de ácido salicílico a dos concentraciones distintas. 37
- 21 Capacidad antioxidante por el método FRAP en plantas de hierbabuena cultivadas en invernadero y campo regadas con agua acuícola y solución nutritiva elicidadas con ácido salicílico a dos concentraciones distintas. 38
- 22 Capacidad antioxidante por el método FRAP en plantas de orégano cultivadas en invernadero y campo regadas con agua acuícola y solución nutritiva, elicidadas son ácido salicílico a dos concentraciones diferentes. 39
- 23 Capacidad antioxidante FRAP en plantas de toronjil cultivadas en campo e invernadero regadas con agua proveniente de un cultivo acuícola y elicidadas con ácido salicílico a dos concentraciones diferentes. 41



## RESUMEN

El estudio de los antioxidantes, como los compuestos fenólicos, va en aumento debido a que se ha documentado que están involucrados en diversos mecanismos para la prevención y tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. La cantidad de estos compuestos puede ser modificada por medio de cambios en factores bióticos y abióticos, como la temperatura, humedad relativa, cantidad de CO<sub>2</sub>, etc. El objetivo de este trabajo es comparar el efecto de las condiciones de cultivo en la producción de fenoles y flavonoides totales y capacidad antioxidante en cuatro diferentes plantas medicinales; Árnica (*Heterotheca inuloides* Cass), Hierbabuena (*Mentha spicata*), Orégano (*Lippia graveolens* Kunth), y Toronjil (*Agastache mexicana* subsp. *mexicana*). El diseño experimental fue factorial de bloques aleatorios. Las plantas fueron obtenidas comercialmente, con un periodo de aclimatación vegetal de cinco días, se colocaron de acuerdo al método teniendo catorce plantas de cada especie en invernadero y catorce en cultivo a cielo abierto. En cada tipo de cultivo se tuvieron dos tipos de riego, agua potable con solución nutritiva y agua proveniente de un cultivo acuapónico. Se realizaron dos aplicaciones de ácido salicílico con 14 días entre cada una, a dos concentraciones diferentes, 0.5 mM, 1.0 mM y el control. La humedad relativa y temperatura en los dos tipos de cultivo fue monitoreada. Se determinó la calidad del agua. Estas evaluaciones se realizaron con el fin de obtener cambios en la cantidad de compuestos fenólicos, flavonoides totales y la capacidad antioxidante en las plantas de acuerdo a las variables en cada cultivo.

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1 Planta Medicinal**

Las plantas medicinales según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se definen como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (Schlaepfer y Mendoza, 2010). También se pueden definir como cualquier planta que en una o más de sus partes (hojas, flores, corteza, raíz, etc.) contiene sustancias que la hacen útil para mejorar la salud de las personas o los animales. Se caracterizan por aportar al organismo múltiples principios activos que al tratarse de moléculas orgánicas se absorben en general más fácilmente y su efecto depende de la acción conjunta de varias sustancias que se potencian y equilibran mutuamente pudiendo beneficiar a diferentes órganos o funciones del organismo (Cruz, 2007).

#### **1.1.1 Importancia y usos**

En México las plantas medicinales constituyen uno de los principales recursos terapéuticos tanto en el medio rural como en el suburbano, siendo los terapeutas tradicionales la única alternativa médica para más de 40 % de la población mexicana (Fernández y col., 2008).

En los últimos años el interés por las hierbas aromáticas y medicinales se ha incrementado en los recolectores, productores, industrias transformadoras, instituciones públicas y/o privadas y consumidores, ya que obedecen a las características aromáticas, terapéuticas. Es importante destacar que los principales sectores industriales que utilizan hierbas aromáticas y medicinales son de orden: medicinales y herbolario, alimentario y perfumero-cosmético (Juárez y col., 2013).

#### **1.1.2 Consumo**

En el ámbito nacional la comercialización de plantas medicinales y aromáticas endémicas por tradición funciona en mercados locales y puede ser de gran importancia económica en el ámbito internacional por la amplia gama de principios activos. Se estima que en el “mercado sonora” de la ciudad de México, se venden

diariamente 10 toneladas de plantas curativas y 116 toneladas a nivel nacional, a consecuencia de la alta demanda de plantas medicinales, la recolección de éstas se ha convertido en una actividad de alta rentabilidad.

En lo que se refiere a la recolección de plantas aromáticas y medicinales se ha documentado que más del 85 % de las especies que se comercializan en los mercados locales y tiendas naturistas provienen de la recolección silvestre. Otras de las características del mercado nacional de las plantas aromáticas y medicinales y sus derivados es que el 75 % de ellas provienen de comunidades indígenas y rurales de la región centro-sur de la República Mexicana. Estas condiciones hacen que el cultivo de especies con utilidad aromática y medicinal sea cada vez más necesario (Juárez y col., 2013).

### 1.1.3 Producción Nacional

A pequeña escala se cultivan hierbas aromáticas y medicinales en jardines, patios, traspatios y terrazas. Hasta el año 2009 no existían registro oficiales de la superficie dedicada a la producción comercial de plantas aromáticas, pero debido a la creciente demanda de este tipo de productos, en el año 2011 aparecieron los datos de la superficie sembrada del año 2010 en el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) dependiente de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Algunos de los estados como Morelos, Baja California Sur, Baja California, Estado de México, Nayarit, Oaxaca, Puebla y Tlaxcala, sobresalen como los principales productores de hierbas aromáticas de exportación que cumplen con los protocolos de Buenas Prácticas Agrícolas o certificación orgánica (Juárez y col., 2013).

## 1.2 Plantas medicinales

Árnica (*Heterotheca inuloides* Cass.); Es una planta perenne o anual, perteneciente a la familia Compositae con una altura de 1 m que crece abundantemente en las regiones frías y templadas de México, ampliamente en Puebla, México, Veracruz, Oaxaca, Jalisco, Michoacán y en menor proporción en Guanajuato, Morelos, Hidalgo, Querétaro, entre otros. Se caracteriza por tener hojas inferiores sobre los peciolos

de 2 a 8 cm de largo, con la parte media y superior sésiles, reduciéndose paulatinamente de tamaño (Amado, 2007). Se usa principalmente para lesiones en la piel, anti-inflamatorio, analgésico así como con propiedades citotóxicas contra ciertas líneas celulares (Coballase y col., 2010). Sus principales componentes químicos son flavonoides y sesquiterpenoides, como inulodin y 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalin (Kamatani y col., 2014). Se desarrolla en sustrato ligero, no debe tener un alto nivel de salinidad, debe permitir la aireación de la raíz, con un pH alrededor de 6-6.5, con capacidad de retención de nutrientes, debe presentar materia orgánica con alta capacidad de intercambio iónico (Amado, 2007).

Hierbabuena (*Mentha spicata*); Planta herbácea, risomatosa, perenne y con un crecimiento no mayor de 40-130 cm. Pertenece a la familia de Lamiaceae y es nativa de África, parte de Asia y de Europa (Kedia y col., 2014). Sus hojas tienen la superficie rugosa, de color verde brillante, opuestas y ovaladas. Se compone químicamente de limoneno, carvona, pineno, carveol, bourboneno, dihidro-carvona, entre otros (Tsitsiki y Sosa, 2010). Las propiedades medicinales para las que es usada son como antimicrobiano, antifúngico, antiespasmódico, entre otros (Mezzomo, et al., 2011). Es una planta que prefiere los climas húmedos y templados, con espacios bien iluminados. Requiere suelos ligeros ricos en materia orgánica y con cierta humedad (Japon, 1895).

Orégano (*Lippia graveolens* Kunth); Esta planta perenne que pertenece a la familia Verbenaceae se distribuye principalmente en la parte sur y central de América y en África Tropical (Funari y col., 2012) . Es un arbusto aromático que mide de 45 cm hasta 1.80 m de alto, con hojas opuestas ovales y anchas de entre 2-5 cm de largo. Su condición de clima es preferentemente el tipo seco y semiseco de regiones áridas y semiáridas, con el suelo pedregoso a pH 7.3-8.5 de textura franco-arenosa (Villavicencio y col., 2010), que además de usarse en la gastronomía también se utiliza remedio herbal para el tratamiento gastrointestinal, disentería, diarrea, desordenes respiratorios, anti-séptico, digestivo, anti-inflamatorio, anti-espasmódico, y con propiedades abortivas, incluso en México se utiliza para el control de diabetes

(Rastrelli y col., 1998, Soto y col., 2012). El aceite esencial de esta planta presenta mayoritariamente fenoles como Timol y Carvacrol (Tezara y col., 2014, Villavicencio y col., 2010).

Toronjil (*Agastache mexicana* subsp. *mexicana*); Es una planta perenne, autógena, que presenta hojas lanceoladas y de flores oscuras (Estrada y col., 2004). Es endémica de México perteneciente a la familia Lamiaceae dividida en dos subespecies: *A. mexicana* subespecie *mexicana* y la *A. mexicana* subespecie *xolocotziana* que en la medicina tradicional se les conoce como toronjil morado y toronjil blanco respectivamente. Comúnmente se usa en infusión para tratar problemas gastrointestinales, para los nervios y para padecimientos cardiacos. Sus componentes químicos principales son flavonoides, chavicol, limoleno (González y col., 2012).

### 1.3 Compuestos Fenólicos

Las plantas producen miles de compuestos orgánicos que son tradicionalmente divididos en dos clases; metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos primarios son esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas mientras que los secundarios actúan como moléculas de defensa y protección en diferentes condiciones por lo que no están involucrados en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Las propiedades antioxidantes de las plantas son de alta demanda porque tienen un gran beneficio en la salud. Estas propiedades en la actualidad se conocen como los compuestos fenólicos (Santos y col., 2014). Los principales compuestos que tienen actividad anti-oxidante son: carotenoides, fosfolípidos, tocoferoles (Vitamina E), vitamina C, pigmentos, así como los compuestos fenólicos (González, 2010).

Los compuestos fenólicos interfieren con el proceso de oxidación al reaccionar con radicales libres, que quelan metales catalíticos y capturan el oxígeno (González, 2010). Se caracterizan por el anillo aromático en su estructura química que contiene uno o más grupos hidroxilo y se encargan de la coloración de las flores y frutos, así

también confieren protección contra patógenos, entre otras características (Valares, 2011).

Los fenoles pueden ser moléculas simples como los flavonoides o tan complejos como polifenoles; ligninas o taninos. Los flavonoides son los fenoles más ampliamente conocidos y distribuidos en las plantas. Se ha demostrado que la exposición a la luz o a la temperatura de las plantas o vegetales puede influir en la síntesis positiva de flavonoides (Santos y col., 2014), así como le confieren protección a los tejidos vegetales contra los rayos UV (Petinatti y col., 2012). Se dividen en diferentes familias, flavonas, isoflavonas, flavanas, flavonoles, flavanoles y antocianidinas.

#### 1.4 Biosíntesis de compuestos fenólicos

El aminoácido Fenilalanina es el principal precursor de los compuestos fenólicos (Figura 1). Para la síntesis de estos compuestos se activa la ruta bioquímica del ácido shikimico, ruta que se presenta en plantas, hongos y bacterias. La enzima fenilalanina amonio liasa (FAL) cataliza la formación del ácido cinámico por la eliminación de una molécula de amonio de la fenilalanina (Figura 2). Las reacciones siguientes a ésta son adiciones de grupos hidroxilo y otros sustituyentes (Ávalos y col., 2009). Los flavonoides se forman de la vía de condensación del fenilpropano, con la participación de 3 moléculas de malonil coenzima A, la cual permite la formación de chalconas, que posteriormente se ciclan en condiciones ácidas. Esta vía se muestra en la Figura 2 (González, 2010).

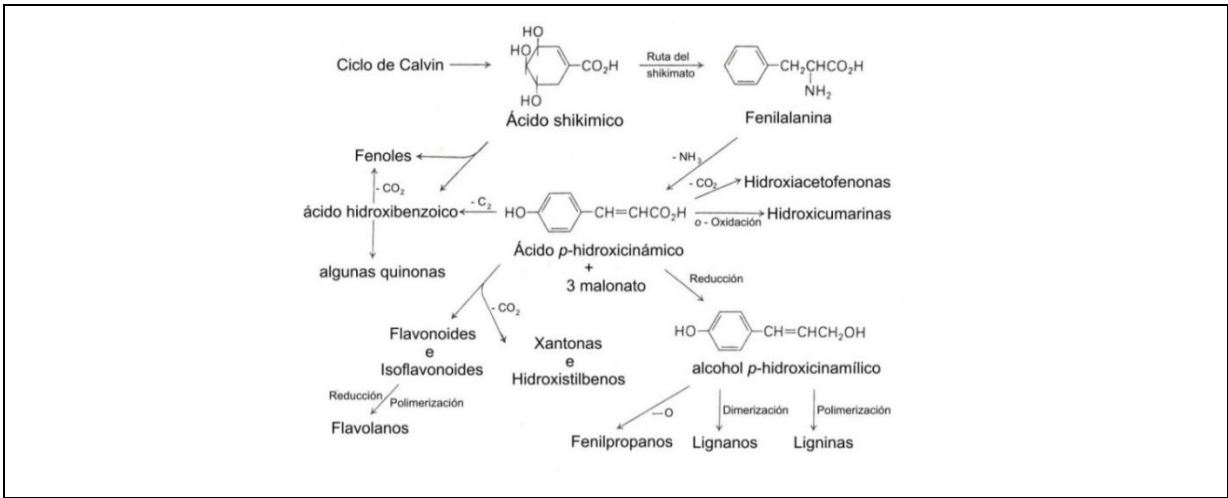


Figura 1. Ruta para la biosíntesis de Compuestos Fenólicos (González, 2010)

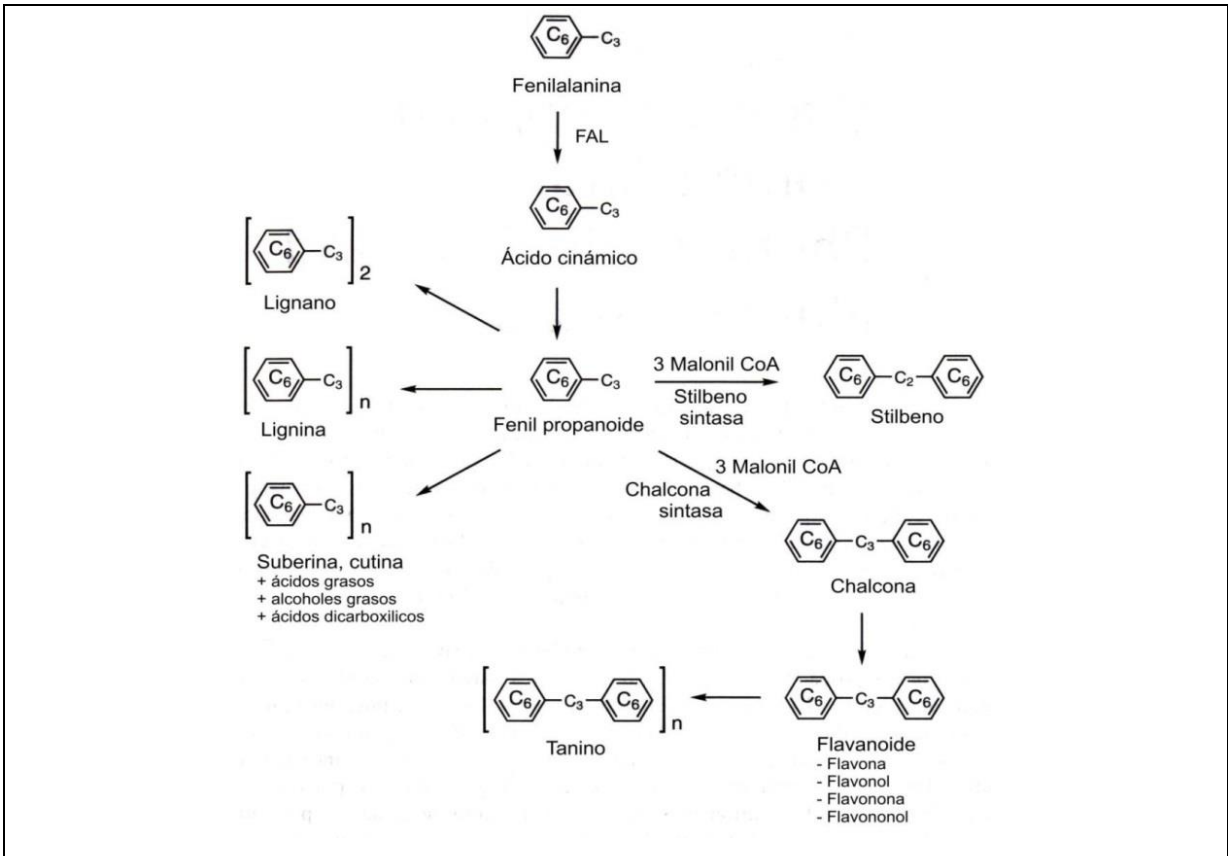


Figura 2. Biosíntesis de Flavonoides, Taninos, Lignanos, Ligninas y Cutina (González, 2010)

## 1.5 Ácido Salicílico

El ácido salicílico o también llamado ácido orto-hidroxy benzoico (Hayat y col., 2010), es una fitohormona fenólica producida en las plantas mediante la vía de los fenilpropanoides, actúa como una molécula de señalización importante ya que juega un rol crítico en las plantas para la defensa contra bacterias, hongos y patógenos virales, también participa en procesos como la germinación de semillas, crecimiento celular, respiración, cierre de estomas, expresión de genes asociados a senescencia, respuesta a estrés abiótico (Rangel y col., 2014). Este ácido al ser asperjado disminuye la susceptibilidad al daño por parte de patógenos y estrés abiótico, además incrementa la tolerancia de los frutos al daño por frío y extiende la vida de anaquel (Vázquez y col., 2012).

La síntesis del ácido salicílico en las plantas se realiza a partir del ácido cinámico por dos posibles vías, a través de una serie de reacciones enzimáticas inicialmente catalizadas por la enzima Fenilalanina Amonio Liasa (FAL). Una de las vías involucra la descarboxilación de una parte de la cadena del ácido cinámico para la formación del ácido benzoico, donde sufre una 2-deshidroxilación hasta formar el ácido salicílico. La otra vía propuesta para la biosíntesis de ácido salicílico involucra una 2-deshidroxilación del ácido cinámico para formar ácido o-cumárico el cual después es descarboxilado hasta ácido salicílico y la reacción es catalizada por una enzima trans-cinamato-4-hidroxilasa (Figura 3). A su vez, el corismato puede también ser convertido en ácido salicílico vía isocorismato, en un proceso de dos pasos que implica la participación de las enzimas Isocorismato Sintasa (ICS) e Isocorismato Piruvato Liasa (IPL). La mayoría del ácido salicílico en la planta es convertido a ácido salicílico O-  $\beta$ .glucósido (ASG) por medio de la enzima llamada AS glucosil transferasa (ASGT) inducible por patógenos. El salicilato de metilo (SMe), es otro derivado del ácido salicílico y/o su forma glucosilada (SMeG) también puede acumularse en niveles relativamente altos (Hayat y col., 2010, Rangel y col., 2010).

Esta hormona fue encontrada para mejorar la actividad de enzimas antioxidantes, CAT, peroxidasa (POX) y la superóxido dismutasa (SOD), esto se presentó cuando es asperjado exógenamente en plantas *L. esculentum* con estrés hídrico, o en



plantas *B. juncea* con estrés salino. Se ha reportado que la aplicación exógena del ácido salicílico mejora también la actividad de otras enzimas antioxidantes como la ascorbato peroxidasa (APX) y (SOD) con una disminución en la actividad de CAT en plantas de maíz (Hayat y col., 2010).

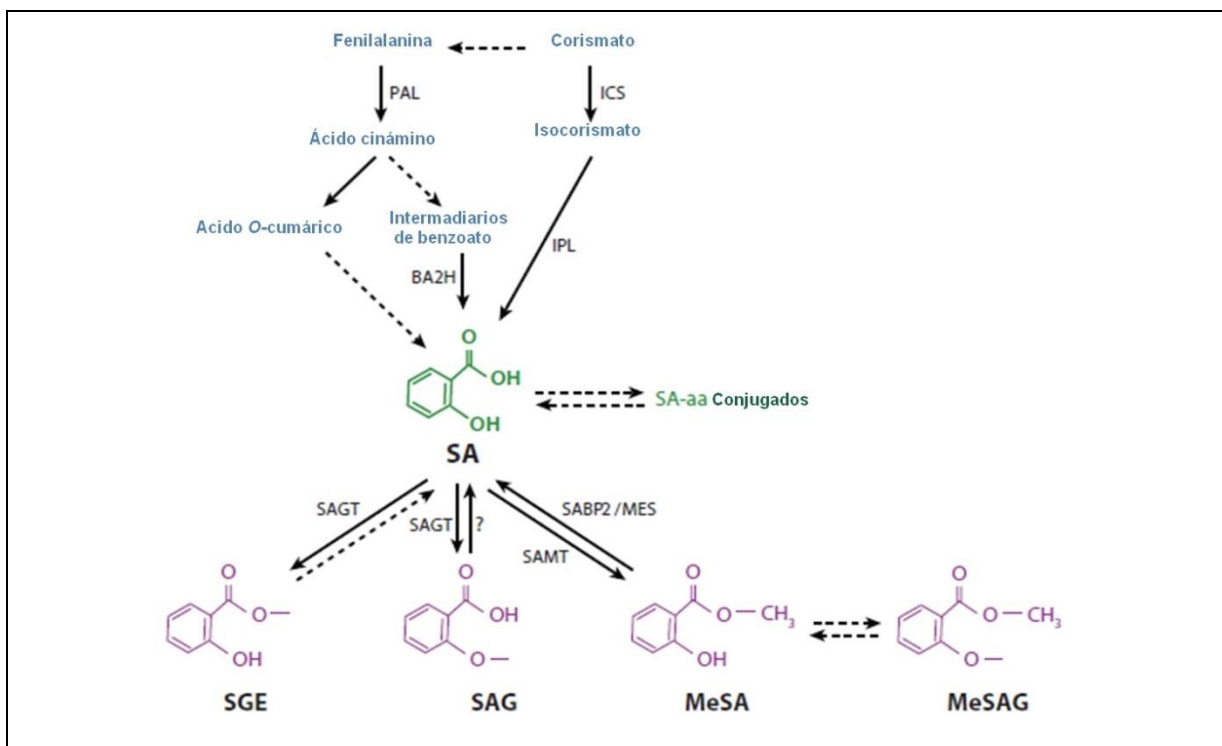


Figura 3. Ruta bioquímica para la síntesis de Ácido Salicílico (Rangel y col., 2010).

## **2. HIPÓTESIS**

El cambio en las condiciones de cultivo (cultivo protegido y cultivo en cielo abierto), el tipo de riego, así como la aplicación de ácido salicílico en dos diferentes concentraciones a cuatro diferentes especies de plantas medicinales árnica (*Heterotheca inuloides*), Hierbabuena (*Mentha spicata*), Toronjil (*Agastache mexicana* Subs. *mexicana*) y Orégano (*Lippia graveolens* Kunth), modifica la cantidad de fenoles totales, destacando los flavonoides y su capacidad antioxidante en cada especie de planta.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 General**

Comparar el contenido de fenoles totales en cuatro diferentes especies de plantas medicinales sometidas a dos diferentes condiciones de cultivo y dos diferentes concentraciones de ácido salicílico.

#### **3.2 Específicos**

- Comparación en la cantidad de compuestos fenólicos en las cuatro diferentes especies de plantas cuando tiene dos diferentes tipos de riego.
- Comparación de la cantidad de compuestos fenólicos cuando las cuatro diferentes especies de plantas son tratadas con dos concentraciones diferentes de ácido salicílico.
- Comparación de la cantidad de compuestos fenólicos en las cuatro plantas medicinales cuando se cultivan en invernadero y en cielo abierto.

## 4. METODOLOGIA

Los aspectos principales para obtener el efecto de las condiciones de cultivo en la producción de fenoles, flavonoides totales y capacidad antioxidante en cuatro diferentes plantas medicinales se observan en la Figura 4.

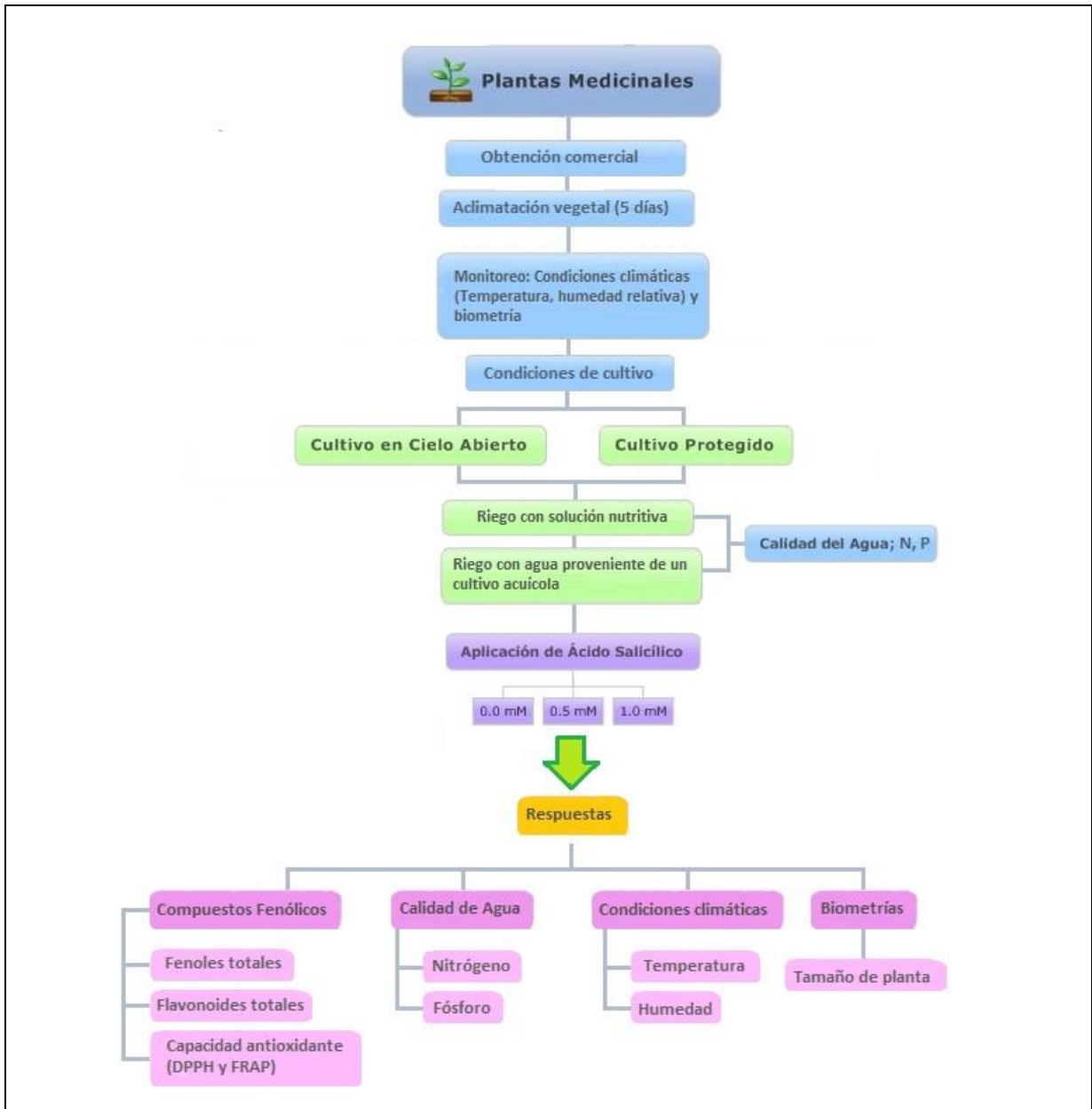


Figura 4. Diagrama de bloques que conceptualiza el desarrollo de las actividades para obtener el efecto de las condiciones de cultivo en la producción de fenoles, flavonoides totales y capacidad antioxidante de las plantas medicinales.

#### 4.1 Materiales

La calidad del agua se realizó usando un espectrofotómetro DR/6000, HACH Company, Loveland Colorado, USA. El material vegetal se deshidrató en una estufa Beschickung/Loading 100-800 Memmert y las muestras fueron pulverizadas en mortero. En la extracción de compuestos fenólicos se usó un agitador orbital Thermo scientific MaXQ 2500 y una centrífuga con refrigeración Dynamica METRIX VELOCITY 14 R del laboratorio de bioingeniería campus Amazcala.

Los reactivos utilizados fueron, agua destilada, metanol (CH<sub>3</sub>OH) de la marca Fisher scientific, acetona (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O) y cloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>) de Jalmek, ácido clorhídrico (HCl), ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH) y carbonato de sodio anhidro (NaCO<sub>3</sub>) de la marca J.T.Baker, acetato de sodio (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>), acetato de sodio trihidratado (CH<sub>3</sub>COONa.3H<sub>2</sub>O), cloruro de hierro (FeCl<sub>3</sub>) y el reactivo Folin Ciocalteu de SIGMA-ALDRICH, nitrito de sodio (NaNO<sub>2</sub>) de la marca KARAL, hidróxido de sodio (NaOH) de MACRON, DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) y el trolox de la marca ALDRICH, (+) Catequina, ácido gálico de la marca SIGMA, TPTZ (tripiridil-2-tiazide) de Fluka. Todos estos contaron con el certificado de grado reactivo.

##### 4.1.1 Material biológico

Las plantas medicinales, árnica (*Heterotheca inuloides*), hierbabuena (*Mentha spicata*), Toronjil (*Agastache mexicana* subs. *mexicana*) y Orégano (*Lippia graveolens* Kunth) identificadas en el herbario Qmex, fueron obtenidas comercialmente en plantamex, con un tamaño aproximado de 25-30 cm para el toronjil, 20-25 cm en hierbabuena y 15-20 cm en Árnica y Orégano. Se trasplantaron en bolsas negras de plástico de 30 cm por 40 cm, con una capa inferior aproximadamente de 7 cm de tezontle y una capa superior de 14 cm de peat moss como sustrato para cada planta con el fin de optimizar el periodo de adaptación vegetal que fue de 5 días. Se mantuvieron 14 plantas de cada especie en cultivo protegido (invernadero) y 14 plantas en cultivo a cielo abierto. El invernadero que se habilitó para el cultivo de las plantas era de estilo gótico cubierto por plástico blanco con una forma rectangular, 45 m de largo y 16 m de ancho. Para el cultivo en cielo abierto se delimitó un área

de 7 m de ancho y 8 m de largo con malla. El experimento se llevó a cabo en las instalaciones del campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro.

## 4.2 Método

### 4.2.1 Determinación de la calidad del agua

Se analizó la calidad del agua que fue usada para el sistema de riego, es decir, el agua con solución nutritiva y el agua proveniente de un cultivo acuícola, mediante la medición de diferentes parámetros químicos; nitritos ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) por el método de diazotización (Método HACH 8507, 2010; Adaptado de USEPA, 1979), nitratos ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) mediante el método de reducción de cadmio (método HACH 8171, 2010) y fósforo total (FT) por el método de molibdovanadato (Método HACH 8048, 2010; adaptado de USEPA Standard Method 4500-P for Wastewater), con la finalidad de manejar correctamente los nutrientes aportados por cada tipo de riego. Se tomaron alícuotas de medio litro cada vez que se agotó el suministro de cada tipo de riego y se repartió en las alícuotas necesarias para cada análisis, la absorbancia fue medida en un espectrofotómetro.

### 4.2.2 Aplicación de elicitores

La solución de ácido salicílico se preparó con agua destilada a las concentraciones de 0.5 mM y 1.0 mM.

### 4.2.3 Muestreo

El primer muestreo se realizó después de los 5 días de aclimatación y en seguida se aplicó la solución de ácido salicílico en la concentración correspondiente a cada tratamiento. La segunda toma de muestra se realizó a los 14 días después de la primera aplicación y se repitió el procedimiento por una segunda ocasión.

### 4.2.4 Análisis del material vegetal

Las muestras fueron deshidratadas a 30 °C por una semana y fueron molidas en mortero. Las muestras se conservaron hasta su análisis en frascos protegidos de la luz.

#### 4.2.5 Porcentaje de humedad

Las muestras secas y molidas se pesaron para determinar su contenido de agua por diferencia de peso expresado en % de humedad (g de H<sub>2</sub>O/100 g de muestra).

#### 4.2.6 Extracción de compuestos fenólicos

Para la extracción de compuestos bioactivos; Fenoles extraíbles y no extraíbles se realizó mediante el método de Hassan y col, 2011. Los solventes que se usaron para la extracción de bioactivos fueron metanol y acetona grado reactivo, solución de ácido clorhídrico para la regulación del pH y agua destilada. Se pesaron 0.2 g de la muestra seca y se colocarán en un tubo Falcon protegido de la luz, se le agregó una solución de metanol-agua en una relación 50:50 a un pH de 2. Se agitó a una temperatura ambiente durante una hora. Se llevó a centrifugación a 5000 g por 10 minutos. Este primer proceso permite obtener los compuestos extraíbles (Fenoles, Flavonoides, Capacidad AOX, enzimas). Se realizó una segunda extracción para los fenoles no extraíbles (Taninos condensados y taninos hidrolizables). Se resuspendió el pellet con 20 ml de una solución (70:30) de acetona con agua y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante una hora. Se llevó a centrifugación a 3000 g por 10 min. Las extracciones resultantes se almacenaron en recipientes protegidos de la luz hasta ser utilizados.

#### 4.2.7 Determinación de fenoles totales

Los fenoles totales se determinaron espectrofotométricamente por el método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton y Rossi (1965). Este método se produce por la oxidación de los grupos hidroxilo mediante el reactivo de Folin. Este reactivo está compuesto de una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico. En la determinación de fenoles totales se realizó la solución de carbonato de sodio anhidro al 20 % y el reactivo Folin-Ciocalteu se preparó al 1 N. El ácido gálico se preparó a una concentración final de 0.1 mg/ml. La reacción redox producida genera una coloración azul detectada a una longitud de onda de 765 nm.

#### 4.2.8 Determinación de flavonoides totales

Para la cuantificación de flavonoides se preparó una solución de 2-aminoetildifenilborato y se tomaron 50  $\mu$ l de la extracción de fenoles, la fracción de fenoles extraíbles, y se les añadió 180  $\mu$ l de metanol más 20  $\mu$ l de la solución preparada con 2-aminoetilfenilborato. Se preparó Nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) al 5 %, cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) al 10 %, hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) al 1 M y la solución estándar de catequina con metanol. La lectura se realizó en un espectrofotómetro a 404 nm y se obtuvieron las concentraciones de flavonoides con una curva estándar de catequina.

#### 4.2.9 Determinación de capacidad antioxidante DPPH

La determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH se preparó en reactivo DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) con metanol. Se preparó en reactivo DPPH con metanol. Se colocaron alícuotas de 1.865 ml del reactivo en microtubos de 2 ml y 0.135 ml del extracto metanólico de cada muestra. Se dejó reposar por 30 min protegido de la luz y se realizó la lectura a una longitud de onda de 480 nm.

#### 4.2.10 Determinación de capacidad antioxidante FRAP

Para la determinación de la capacidad antioxidante por el método de FRAP se preparó el reactivo con la mezcla de una solución 20 mM de Tricloruro de hierro ( $\text{FeCl}_3$ ), buffer de acetatos con acetato de sodio anhidro y acetato de sodio trihidratado a un pH de 3.7 y por último se preparó TPTZ (tripiridil-2-tiazide) a 10 mM disuelto en ácido clorhídrico al 40 mM. Se colocó 1.865 ml del reactivo FRAP y 0.135 ml del extracto metanólico de las muestras en microtubos de 2 ml. Se dejó reaccionar por 30 min bajo protección de la luz. Se utilizó trolox para la curva de calibración. La lectura de la absorbancia se realizó a una longitud de onda de 630 nm.

### 4.3 Diseño experimental

El diseño experimental consiste en un método factorial con bloques al azar y arranque aleatorio con muestreo sistemático  $2 \times 2 \times 3$ . Teniendo dos tipos de condiciones de cultivo: a) tipo de cultivo: cultivo protegido, cultivo a cielo abierto, b) tipo de riego: riego con agua proveniente de un cultivo acuícola y riego con solución



nutritiva, c) concentración del elicitor: 0.0 mM como control, 0.5 mM y 1.0 mM de solución de ácido salicílico, como se muestra en la Figura 5.

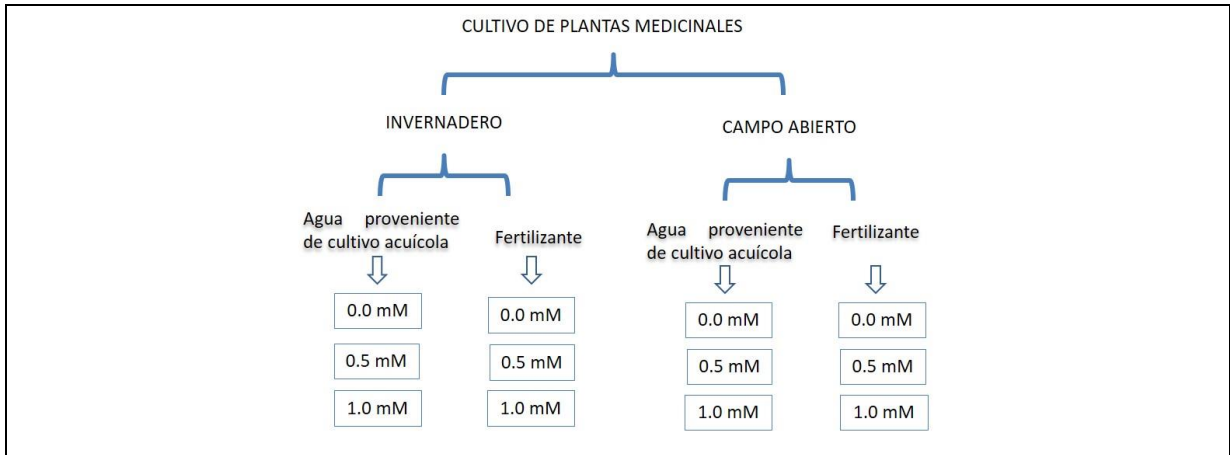


Figura 5. Diseño experimental de acuerdo al método factorial aleatorio.

#### 4.3.1 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de las determinaciones de fenoles, flavonoides, capacidad antioxidante fueron tratados estadísticamente mediante un análisis de varianzas (ANDEVA) con un nivel de significancia de 95 % ( $p < 0.05$ ), primeramente dentro de los tratamientos y posteriormente entre éstos. Posteriormente se corrió un análisis multivariable para determinar el efecto que tuvo el tipo de riego, la humedad relativa y la temperatura sobre la producción de metabolitos especializados.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Calidad del agua

La calidad del agua es un punto clave de referencia en este trabajo ya que se pretende saber algunos de los nutrientes que se le están adicionando a cada una de las plantas. Para la determinación de nitratos, nitritos y fosfatos en agua se realizaron tres tomas de medio litro para cada muestra de cada sistema de riego y cada determinación se realizó por triplicado. Los resultados de cada prueba se observan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Promedio de las concentraciones (mg/L) de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y fósforo ( $\text{PO}_4^-$ ) en agua de cada sistema de riego durante el experimento.

| TIPO DE RIEGO                           | $\text{NO}_3^-$ mg/L | $\text{NO}_2^-$ mg/L | $\text{PO}_4^-$ mg/L |
|-----------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Solución nutritiva                      | 215.175              | 1.341                | 69.45                |
| Agua proveniente de un cultivo acuícola | 118.375              | 0.321                | 14.35                |

Las concentraciones promedio de los nutrientes analizados fueron como se esperaba mayores en el sistema de riego con solución nutritiva. Las concentraciones en ambos tipos de riego se comportaron de manera similar teniendo en mayor concentración los nitratos con una concentración promedio de 215.175 mg/L en el sistema de riego con solución nutritiva y 118.375 mg/L en el sistema de riego con agua del cultivo acuícola. Los fosfatos presentaron una concentración promedio de 69.45 mg/L y 14.35 mg/L respectivamente para cada tipo de riego. La concentración de nitritos en el sistema de riego con agua acuícola es más bajo que la concentración obtenida en el sistema de riego con solución nutritiva. Estos resultados sugieren que las cantidades de nutrientes que pudo requerir la planta para su buen funcionamiento no se encontraban en el caso del sistema de riego con agua del cultivo acuícola.

Las diferentes plantas medicinales fueron obtenidas en un vivero comercial con las especificaciones físicas de cada planta. Se llevaron 14 plantas de cada especie al invernadero y 14 plantas al área correspondiente para el cultivo en cielo abierto y se comenzó con la aclimatación. Las plantas fueron hidratadas con agua potable y trasplantadas en bolsas negras de plástico de 30 cm de ancho por 40 cm de largo

usando como sustrato tezontle y peat moss. Transcurridos los 5 días de aclimatación se tomó la muestra por la mañana y después se aplicó el elicitor en la concentración correspondiente a cada planta.

Las muestras recolectadas se colocaron en bolsas de papel y se deshidrataron en una estufa a 30 °C por una semana. Las muestras deshidratadas se molieron y se conservaron en frascos protegidos de la luz. El segundo muestreo se realizó 14 días después de la primera aplicación del elicitor de la misma manera que el primer muestreo (Tierranegra y col., 2011). La tercera toma de muestra se realizó de la misma manera, pasando 14 días después de la segunda elicitación.

## 5.2 Porcentaje de humedad de materia vegetal

El porcentaje de humedad en cada muestra se determinó en la medición del peso de la muestra fresca y del peso de la bolsa de papel en la que se metió a secar. Después de una semana de secado se registró el peso de la muestra seca en conjunto con la bolsa y se prosiguió a hacer los cálculos pertinentes.

Los resultados obtenidos del porcentaje de humedad de las muestras de cada planta no presentaron cambios significativos con respecto al tipo de riego y de cultivo en el que se mantuvieron las plantas. Las muestras del tercer muestreo del toronjil que se cultivaron en Invernadero y un sistema de riego con solución nutritiva presentaron el porcentaje de humedad más alto con  $78.92\% \pm 3.06$ . Por otro lado, en el mismo muestreo se obtuvo el porcentaje de humedad más bajo en las plantas de orégano que fueron cultivadas en invernadero y un sistema de riego con agua proveniente de un cultivo acuícola con  $53.214 \pm 24.25$ .

### 5.2.1 Monitoreo climático

#### 5.2.1.1 Temperatura ambiental

Las condiciones climáticas son un factor importante que se debe monitorear debido a que son las condiciones de temperatura y humedad relativa las que determinaron el tipo de cultivo en invernadero o en campo. Los resultados presentados en la Figura 6 resaltan las fluctuaciones de temperatura que se obtuvieron en los días de

experimentación. Las fluctuaciones son mayores en las condiciones de cultivo a cielo abierto en donde se tuvo registro temperaturas máximas de 39.5 °C y temperaturas mínimas de 10 °C en promedio. No obstante, las condiciones de temperatura en el interior del invernadero se presentan constantes, con temperaturas máximas de 24 °C y mínimas de 17 °C. Estos resultados presentan diferencias significativas entre los dos tipos de cultivo, lo que representa cambios importantes en el metabolismo de las plantas.

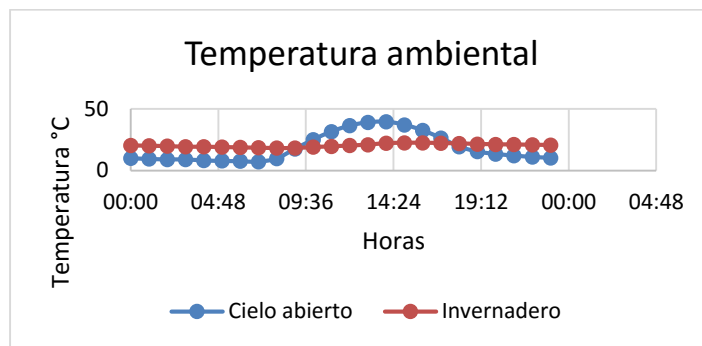


Figura 6. Temperatura ambiental en los dos tipos de cultivo (invernadero y cielo abierto) en un ciclo de 24 horas.

#### 5.2.1.2 Humedad relativa

La humedad relativa es un factor importante que determina el consumo de agua por las plantas, es decir, las plantas tienen una mayor transpiración cuando la humedad relativa baja y el aire está seco entonces se absorbe más agua y se aumenta la evapotranspiración. La humedad relativa registrada durante la experimentación para los dos tipos de cultivo se observa en la Figura 7.

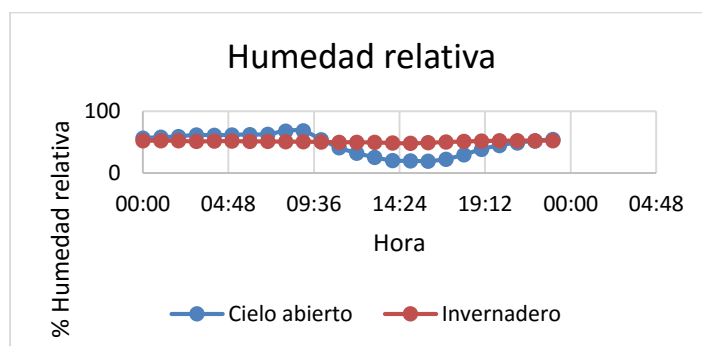


Figura 7. Porcentaje de humedad relativa registrada en los dos tipos de cultivo (invernadero y campo) durante 24 horas de experimentación.

La humedad ambiental registrada en el cultivo en invernadero se mantuvo constante teniendo porcentajes promedio máximos de 52.7% y 48.3% como porcentaje promedio mínimo. A diferencia de los datos registrados en el cultivo a cielo abierto, se presentaron fluctuaciones muy pronunciadas en donde se tiene un porcentaje máximo de 68.4% y 20% como humedad mínima registrada. Los máximos de humedad en el cultivo en campo se presentan un horario entre las tres y once de la mañana, lo que sugiere que es por el descenso de la temperatura ambiental generando un aumento en la humedad relativa que puede llegar al punto de saturación. Además, los mínimos del porcentaje de humedad se registraron en un horario de dos a cinco de la tarde. Esto tiene relevancia ya que en conjunto con la temperatura los registros de humedad confirman que a mayor temperatura menos humedad relativa y viceversa.

### 5.3 Compuestos bioactivos

Las muestras deshidratadas se sometieron a una extracción de compuestos fenólicos por medio de una maceración con metanol/acetona. Los extractos se mantuvieron a una temperatura de -20 °C y protegidos de la luz.

#### 5.3.1 Compuestos fenólicos

Los resultados de fenoles totales en las plantas de árnica se presentan en la Figura 8.

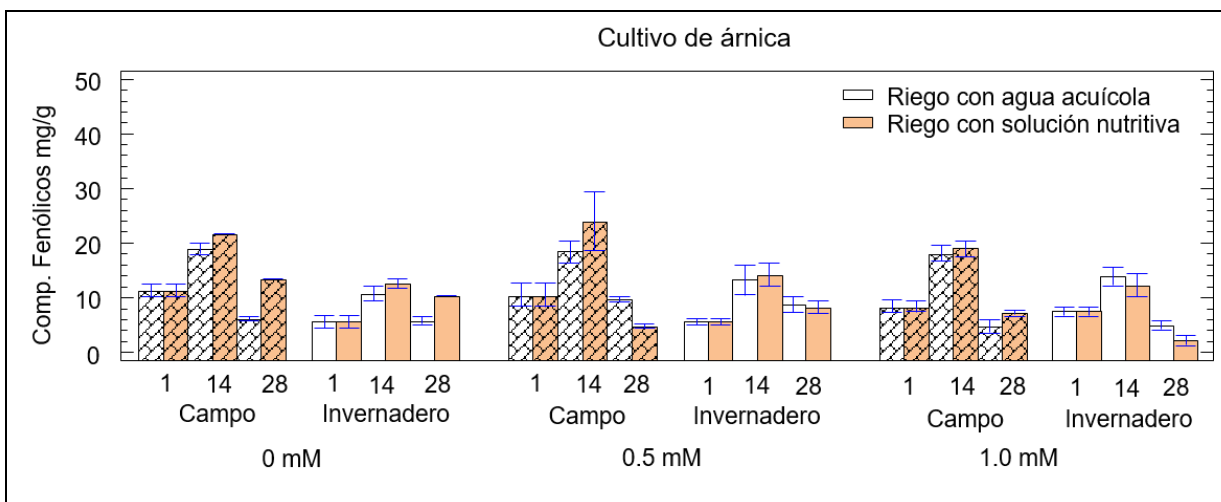


Figura 8. Concentración de fenoles totales (mg/g eq. Á. Gálico) en plantas de árnica cultivadas en dos diferentes cultivos de cultivo y riego con la aplicación de un elicitor a diferentes concentraciones durante dos tiempos de aplicación. Los resultados se presentan en el error estándar.

Las concentraciones de fenoles totales en las plantas de árnica cultivadas en campo en un primer muestreo, es decir, catorce días después de la primera aplicación de ácido salicílico en las diferentes concentraciones, mostraron un aumento significativo de fenoles totales, comportándose de la misma manera en las diferentes concentraciones de elicitor. Sin embargo, en el segundo muestreo, es decir catorce días después de la segunda aplicación del elicitor, las concentraciones de fenoles disminuyeron significativamente de 24 mg/g hasta 5 mg/g de fenoles como concentración máxima y mínima respectivamente. En relación al tipo de riego las concentraciones máximas se presentaron en las plantas regadas con solución nutritiva a excepción de las plantas elicidadas a 0.5 mM en la segunda aplicación de ácido salicílico en donde las plantas con agua proveniente de un cultivo acuícola obtuvieron una concentración significativamente mayor a diferencia de las plantas regadas con solución nutritiva.

Por otro lado, las plantas de árnica cultivadas en invernadero aumentaron significativamente la concentración de fenoles en relación al primer muestreo, sin embargo, estos resultados no presentaron diferencias significativas en cada tipo de riego. De manera similar a las plantas en campo, las plantas en invernadero en la segunda aplicación de elicitor disminuyen significativamente su concentración de

fenoles. Solo se presentaron diferencias significativas entre las plantas elicitadas a 1.0 mM entre los dos tipos de riego, teniendo una concentración mayor en las plantas regadas con agua de cultivo acuícola. En general, las plantas cultivadas en campo regadas con solución nutritiva y sin diferencias en la presencia de un elicitador, presentaron las concentraciones de compuestos fenólicos totales máximas en comparación con las plantas cultivadas en invernadero para los dos sistemas de riego y la elicitación correspondiente.

La concentración de fenoles totales en las plantas de hierbabuena cultivada en campo es incrementada significativamente con respecto al tiempo de muestreo, es decir, catorce días después de la primera aplicación del elicitador. Sin embargo, en el segundo muestreo se observó un decremento significativo en la producción de fenoles totales. El efecto de la concentración de elicitador aplicado se observa en las plantas tratadas a una concentración de 1.0 mM de ácido salicílico en donde se observa la concentración mayor de estos compuestos a diferencia de las plantas elicitadas a 0.5 mM. En relación con el tipo de riego, no se encontraron cambios significativos en cualquier tipo de riego.

Las plantas de hierbabuena cultivadas en invernadero se comportan de manera similar a las plantas cultivadas en campo en donde se tiene un incremento de la concentración en el primer muestreo y un decremento significativo para la segunda aplicación del elicitador, además de no presentar cambios significativos entre cada sistema de riego. Los cambios significativos de la concentración de fenoles totales en estas plantas se observaron solo en las plantas elicitadas a una concentración de 1.0 mM de ácido salicílico en donde las plantas cultivadas en campo presentaron tener las concentraciones más altas (23 mg/g) con diferencias significativas entre las plantas cultivadas en invernadero (16 mg/g). Estos resultados se observan en la Figura 9.

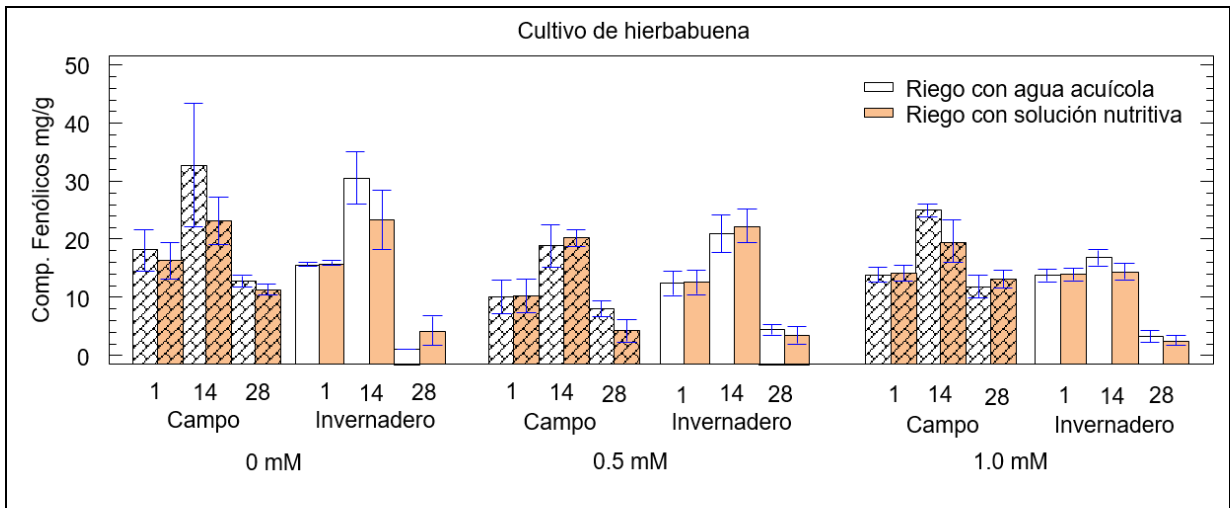


Figura 9. Concentración promedio de compuestos fenólicos (mg/g eq. Á. Gálico) en plantas de hierbabuena cultivadas en dos diferentes cultivos con dos sistemas de riego y elicidadas con ácido salicílico a diferentes concentraciones.

Los resultados de las concentraciones de compuestos fenólicos en las plantas de orégano se presentan en la Figura 10. Las plantas de orégano que fueron cultivadas en campo solo presentaron cambios significativos positivos, es decir, con mayor concentración de compuestos cuando fueron elicidadas a una concentración de 1.0 mM de ácido salicílico sin presentar cambios significativos entre cada tipo de riego. Sin embargo, las plantas en cualquier tipo de riego y cualquier concentración de á. salicílico elicitada disminuye de manera significativa la concentración de fenoles en el segundo muestreo, es decir, para el día 28. Las plantas elicidadas a una concentración de 0.5 mM presentaron una disminución significativa de compuestos en el segundo muestreo con diferencias significativas entre cada tipo de riego, en donde se observa una concentración promedio de 24 mg/g para las plantas con agua de cultivo acuícola y 18 mg/g en las plantas regadas con solución nutritiva. Las plantas cultivadas en campo elicidadas a una concentración de 1.0 mM de ácido salicílico presentan un incremento en la producción de fenoles con respecto a la primera aplicación del elicitor, además no se observan cambios significativos entre cada sistema de riego. Sin embargo, la concentración de compuestos fenólicos disminuye significativamente después de la segunda elicitación, es decir el día 18, observándose diferencias significativas entre cada sistema de riego. La disminución de fenoles totales es mayor en las plantas regadas con solución nutritiva.



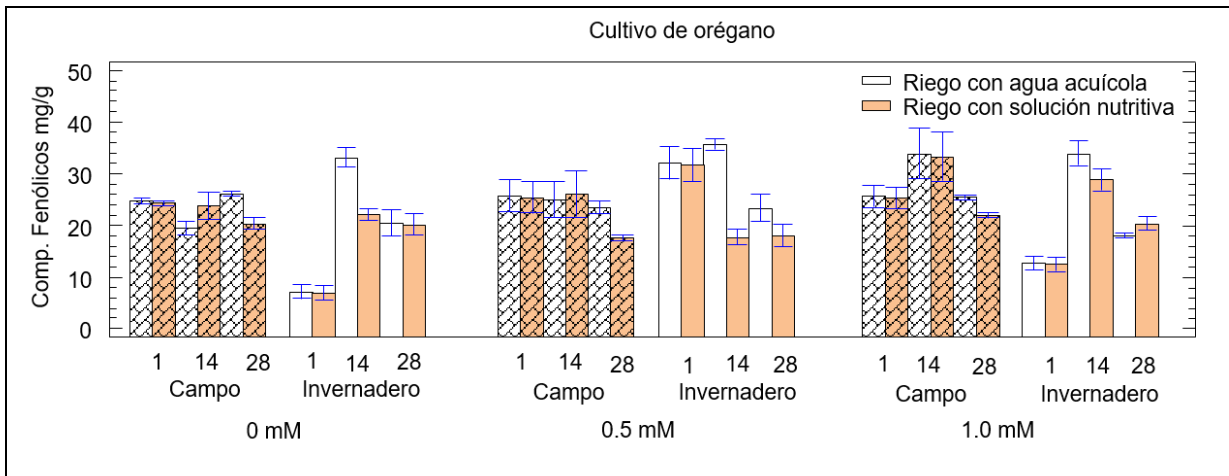


Figura 10. Concentraciones promedio de fenoles totales (mg/g eq. Á. Gálico) de las plantas de orégano cultivadas en diferente tipo de cultivo, con dos sistemas de riego y elicidadas con ácido salicílico a diferentes concentraciones.

Las plantas de orégano que fueron cultivadas en invernadero se vieron más afectadas en la concentración de compuestos fenólicos al presentar un incremento significativo en las plantas muestreadas después de la primera elicitación con concentraciones promedio máximas entre 30 y 38 mg/g y las concentraciones promedio mínimas entre 8 y 10 mg/g. En los diferentes tratamientos de elicitación las concentraciones máximas se presentaron en las plantas que fueron regadas con agua proveniente de un cultivo acuícola y que fueron muestreadas después de la primera elicitación. Las concentraciones obtenidas en el muestreo realizado después de la segunda aplicación del elicitor fueron disminuyendo significativa en ambas concentraciones del elicitor. Las plantas del segundo muestreo con una elicitación de 0.5 presenta mayor concentración en aquellas plantas que fueron regadas con agua proveniente de un cultivo acuícola con una concentración promedio de 22 mg/g a diferencia de las plantas con solución nutritiva con una concentración promedio de 18 mg/g. A diferencia de los resultados presentados para la elicitación de 0.5 mM, las plantas elicidadas a una concentración de 1.0 mM presentaron un nivel de fenoles totales en las plantas regadas con solución nutritiva con diferencias significativas en los niveles de fenoles obtenidos en las plantas regadas con agua acuícola.

Las concentraciones de fenoles totales obtenidas en las plantas de toronjil se presentan en la Figura 11. Los resultados obtenidos de las concentraciones promedio

de compuestos fenólicos en las plantas de toronjil cultivadas en campo presentaron ser mayores significativamente en el muestreo realizado después de la primera elicitación a diferentes concentraciones. Las plantas que fueron regadas con agua proveniente de un cultivo acuícola sobresalen con concentraciones de fenoles entre 16 mg/g y 21 mg/g con diferencias significativas entre las plantas que se regaron con solución nutritiva. Para el segundo muestreo, o sea después del segundo muestreo, se observó una disminución significativa de los niveles de fenoles en relación con los niveles del primer muestreo, además las plantas regadas con agua acuícola presentaron niveles mayores con diferencias significativas entre las plantas que fueron regadas con solución nutritiva. En general no se presentan cambios significativos entre las dos concentraciones de ácido salicílico elicidadas.

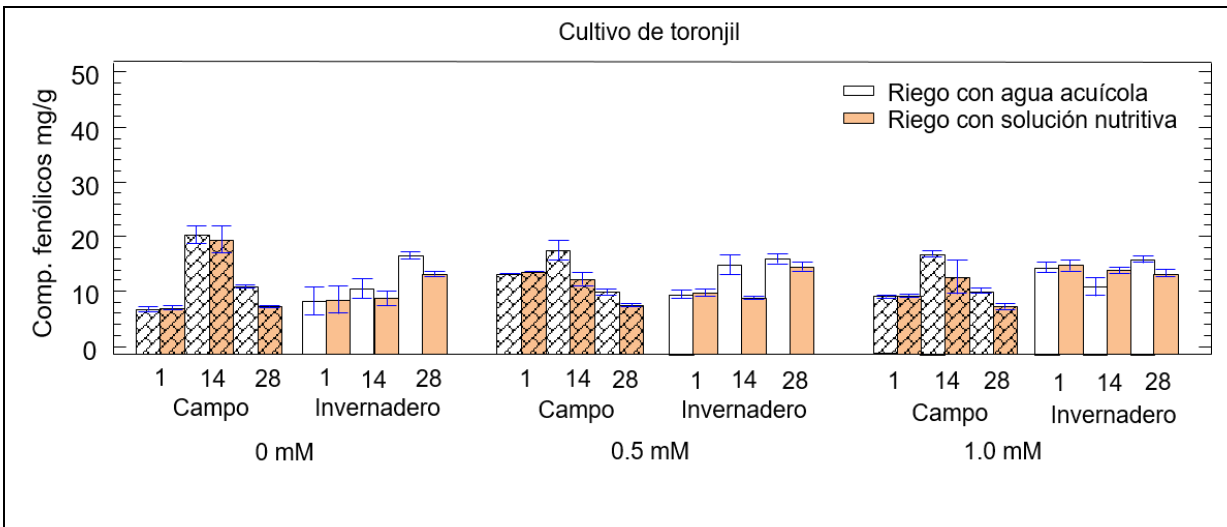


Figura 11. Concentración promedio de compuestos fenólicos (mg/g eq. Á. Gálico) en plantas de toronjil que fueron cultivadas de dos formas distinta tratadas con dos diferentes tipos de riego y elicidadas con ácido salicílico a diferentes concentraciones. Los resultados se expresan en error estándar.

La concentración de fenoles totales en las plantas de toronjil cultivadas en invernadero se comportó de manera similar a las plantas cultivadas en campo. Las plantas que fueron elicidadas a una de 0.5 mM presentaron niveles de fenoles mayores en las plantas que fueron regadas con agua acuícola sin tener diferencias significativas entre los tiempos de elicitación. Sin embargo, en los niveles de compuestos fenólicos en las plantas regadas con solución nutritiva son menores en

la primera elicitación con diferencias significativas entre las plantas de la segunda elicitación. Por otro lado, las plantas elicitadas a una concentración de 1.0 mM presentan una disminución significativa en la concentración de fenoles en la primera elicitación y que además fueron regadas con agua acuícola, en contraste, las plantas de la segunda elicitación presentaron un incremento significativo en los niveles de dichos compuestos. En relación a las plantas con la misma concentración de elicitación pero con un riego con solución nutritiva, no presentaron cambios significativos entre cada tiempo de elicitación.

### 5.3.2 Flavonoides totales

Los flavonoides son los compuestos fenólicos de mayor importancia por su actividad antioxidante. Los resultados de los niveles de flavonoides en plantas de árnica se observan en la Figura 12. La concentración de flavonoides totales en plantas de árnica cultivadas tanto en invernadero en campo incrementó significativamente después de la primera elicitación. Además, las plantas de árnica cultivadas regadas con solución nutritiva y después de la primera elicitación fueron las que contenían los niveles máximos de flavonoides totales siendo estas concentraciones entre 1800 mg/g y 2000 mg/g con diferencias significativas entre las plantas regadas con agua proveniente de un cultivo acuícola. Las concentraciones de flavonoides en las plantas analizadas después de la segunda elicitación disminuyeron en ambos tipos de riego, comportandose de manera similar, teniendo mayores concentraciones en el riego con solución nutritiva. El efecto de los niveles de flavonoides respecto a la concentración de elicitor aplicado, no se presentaron cambios significativos.

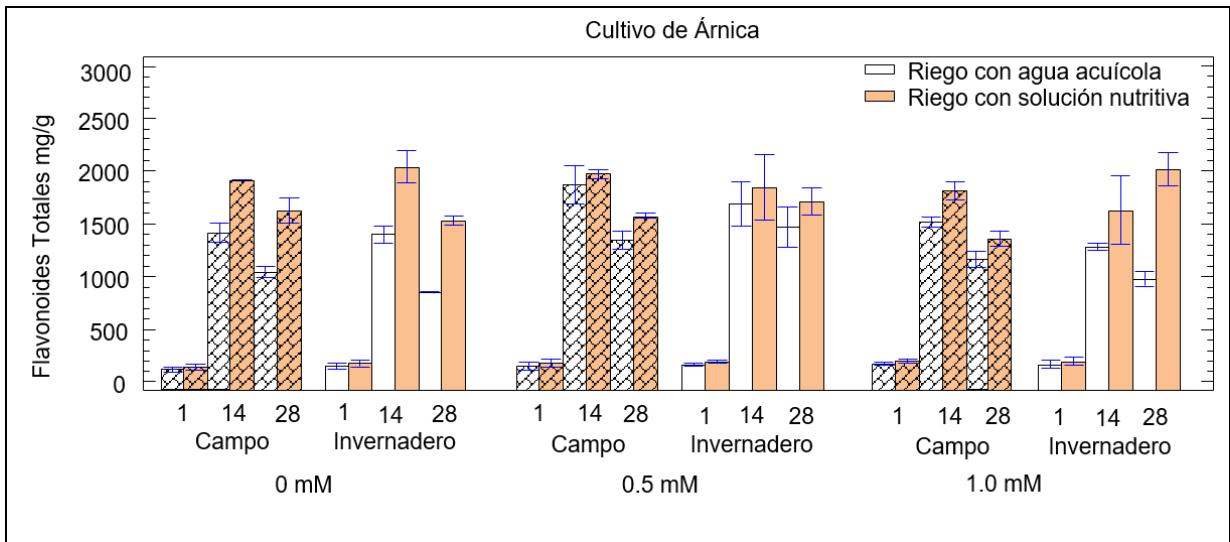


Figura 12. Concentración de flavonoides totales (mg/g eq. Catequina) en plantas de árnica cultivadas en campo e invernadero con dos tipos de riego y elicidadas a dos concentraciones diferentes de ácido salicílico.

Los niveles de flavonoides totales en las plantas de árnica cultivadas en invernadero se comportaron de manera similar, presentando las concentraciones de flavonoides máximas en las plantas que fueron regadas con solución nutritiva. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en relación con los tiempos de elicitación. Los niveles de flavonoides en las plantas que fueron regadas con agua de un cultivo acuícola presentaron una disminución significativa solo cuando fueron elicidadas a 1.0 mM del elicitor, obteniendo el valor máximo en las plantas que fueron elicidadas en una primera vez. En general la concentración máxima de flavonoides totales se observó en las plantas de árnica que fueron regadas con solución nutritiva sin tener cambios significativos entre el tipo de cultivo (campo e invernadero) ni en el tiempo de elicitación.

La concentración de flavonoides totales en las plantas de hierbabuena que fueron cultivadas en campo con elicitación de 0.5 mM de ácido salicílico tuvieron un incremento significativo en relación a los tiempos de aplicación del elicitor teniendo los valores máximos en las plantas elicidadas en una primera ocasión. En relación a los tipos de riego, las plantas regadas con solución nutritiva presentaron la concentración de flavonoides más baja con diferencias significativas cuando las plantas fueron elicidadas por segunda vez. Los niveles de flavonoides en las plantas

de hierbabuena elicidadas a una concentración de 1.0 mM y regadas con agua acuícola, fueron los más altos (24000 mg/g eq. Á. Gálico) con diferencias significativas respecto a las plantas regadas con solución nutritiva. Los flavonoides obtenidos en las plantas de hierbabuena respecto a los tiempos de elicitación no presentaron cambios significativos. Estos resultados se presentan en la Figura 13.

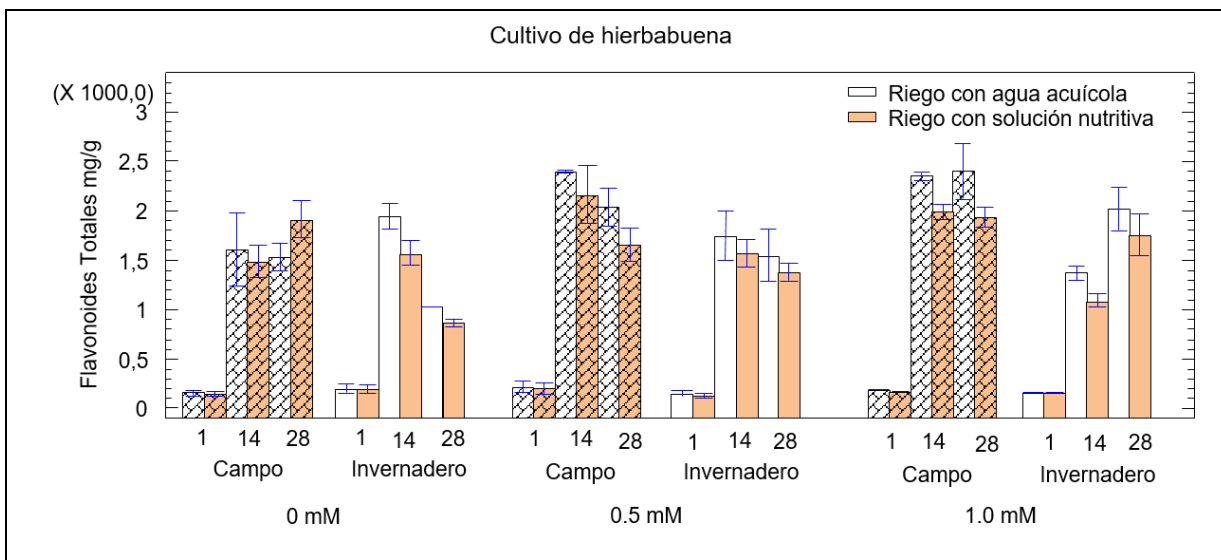


Figura 13. Concentración de flavonoides totales (mg/g eq. Catequina) en las plantas de hierbabuena cultivadas en campo e invernadero, regadas con dos tipos de cultivo y elicidadas a dos concentraciones de ácido salicílico.

Las plantas que fueron cultivadas en invernadero, elicidadas a una concentración de 0.5 mM de ácido salicílico presentaron un incremento significativo en las concentraciones de flavonoides totales obtenidas. Además, no se observaron cambios significativos en las concentraciones de flavonoides en relación con el tipo de riego y los tiempos de elicitación. Por otro lado, los niveles de flavonoides en las plantas elicidadas a 1.0 mM del elicitor presentaron un incremento significativo teniendo las concentraciones máximas en las plantas elicidadas por segunda ocasión, además, no se presentan cambios significativos con respecto al tipo de riego. Las plantas elicidadas en una primera ocasión presentan diferencias significativas entre los dos tipos de riego, teniendo las concentraciones más altas en el sistema de riego con agua proveniente de un cultivo acuícola.

Las concentraciones de flavonoides en las plantas de orégano que fueron cultivadas en campo y elicidadas a una concentración de 0.5 mM fueron incrementadas significativamente del día cero al día catorce, sin embargo, no se observaron cambios significativos entre el tipo de riego y el tiempo de aplicación del elictor cuando se realiza una segunda aplicación del elictor. Por otro lado, las concentraciones de flavonoides totales en las plantas elicidadas a 1.0 mM, presentaron los niveles máximos en las plantas elicitas en una primera ocasión, aunque sin cambios significativos entre el tipo de riego. Las plantas elicidadas por segunda vez, presentaron una disminución significativa, con un contenido promedio de flavonoides de 1800 mg/g eq. Á. Gálico., en las plantas regadas con agua acuícola y 1900 mg/g para las plantas regadas con solución nutritiva. Estos resultados se presentan en la Figura 14.

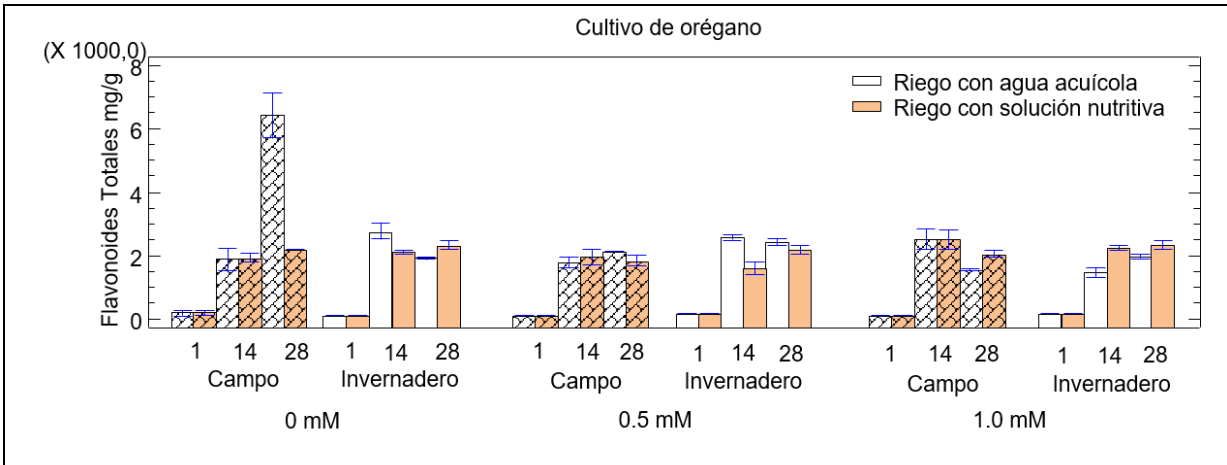


Figura 14. Concentración de flavonoides totales (mg/g eq. Catequina) en plantas de orégano cultivadas en dos diferentes tipos de cultivo (Campo e invernadero), con dos diferentes tipos de riego y elicidadas a diferentes concentraciones de ácido salicílico.

Los resultados de flavonoides totales para las plantas cultivadas en invernadero elicidadas a una concentración de 0.5 mM de ácido salicílico, presentaron los niveles más altos en las plantas que fueron regadas con agua proveniente de un cultivo acuícola, sin cambios significativos entre el tiempo de elicitación. Sin embargo, las plantas regadas con solución nutritiva fueron significativamente más bajas, con diferencias entre el tiempo de elicitación teniendo las concentraciones de flavonoides más altas cuando se realiza una segunda elicitación. Las plantas del mismo cultivo

que fueron elicidadas a una concentración de 1.0 mM se comportaron de manera contraria respecto a la concentración de 0.5 mM, teniendo las concentraciones más altas en las plantas regadas con solución nutritiva sin diferencias significativas respecto al tiempo de elicitación. Las plantas regadas con agua acuíola presentaron niveles más bajos en la primera elicitación.

Las plantas de toronjil que fueron cultivadas en invernadero presentaron una disminución significativa en los niveles de flavonoides totales cuando las plantas son elicidadas en una primera ocasión sin diferencias significativas entre el tipo de riego y la concentración de elicitor aplicado. Los niveles de flavonoides en las plantas elicidadas en una primera ocasión a una concentración de 0.5 mM, presentaron un incremento significativo en relación a los tiempos de aplicación, con diferencias significativas entre el tipo de riego, teniendo los niveles más altos en las plantas regadas con agua de un cultivo acuícola para ambos tiempos de elicitación. Por otra parte, las plantas elicidadas a una concentración de 1.0 mM presentaron una disminución en el contenido de flavonoides principalmente en las plantas regadas con solución nutritiva en la segunda elicitación. Además, las plantas que tuvieron los niveles significativos máximos se presentaron en las plantas regadas con agua de un cultivo acuícola. Estos resultados se presentan en la Figura 15.

Las concentraciones de flavonoides obtenidos en las plantas que se cultivaron en invernadero se comportaron de manera similar a las plantas cultivadas en campo, presentando en las plantas elicidadas a 0.5 mM una disminución en las plantas elicidadas en una primera ocasión y después un incremento de flavonoides en las plantas elicidadas en una segunda ocasión. Para las plantas elicidadas a una concentración de 1.0 mM, los niveles más altos de flavonoides se presentaron en las plantas regadas con solución nutritiva con cambios significativos entre cada tipo de riego. Para la segunda elicitación los niveles de flavonoides son maroyes en las plantas regadas con solución nutritiva.

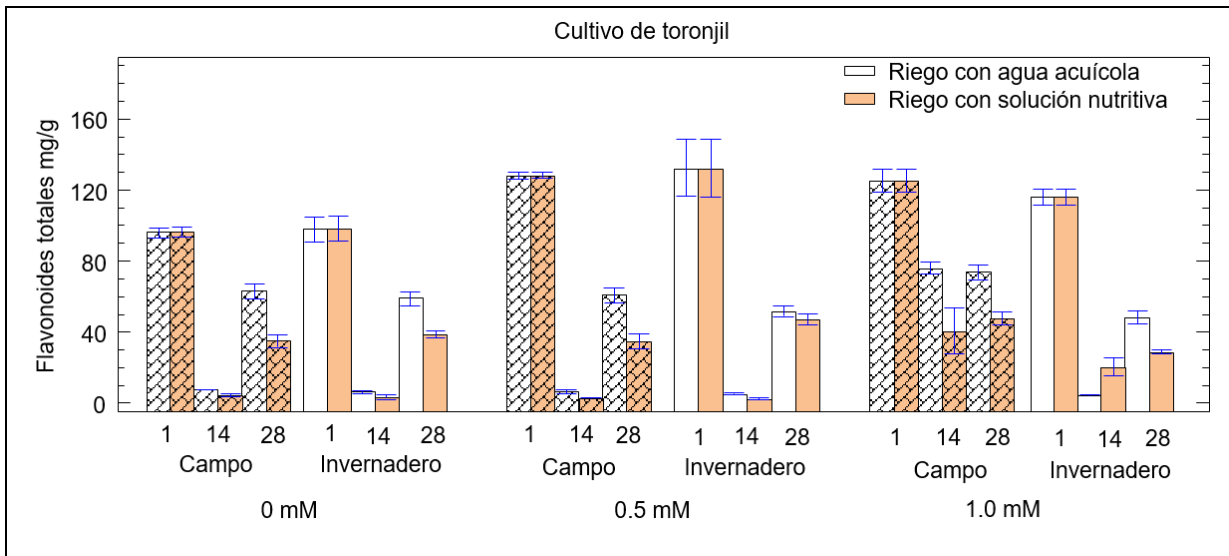


Figura 15. Concentración de flavonoides totales (mg/g eq. Catequina) en plantas de toronjil cultivadas en invernadero y campo, con dos sistemas de riego y dos concentraciones de elicitación con ácido salicílico.

#### 5.4 Capacidad Antioxidante

##### 5.4.1 Método DPPH

La capacidad antioxidante por el método DPPH es un método muy usado basado en la donación de un átomo de hidrógeno o en la formación de complejos (DPPH-H y DPPH-R) mediante la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil. Las concentraciones de las capacidades antioxidantes para cada planta se determinaron por medio del porcentaje de inhibición ( $IC_{50}$ ).

La capacidad antioxidante por el método DPPH se midió en las plantas de árnica que fueron cultivadas en campo con dos concentraciones del elicitor. La capacidad antioxidante registrada en las plantas elicitadas a 0.5 mM presentaron un incremento significativo en una segunda elicitación, además la concentración de antioxidantes fue mayor en las plantas que fueron regadas con agua proveniente del cultivo acuícola. Por otro lado, las plantas elicitadas a una concentración de 1.0 mM cultivadas en campo presentaron una concentración máxima en las plantas que fueron elicitadas en una segunda ocasión y regadas con agua acuícola con diferencias significativas entre el tipo de riego. Las plantas regadas con solución nutritiva que fueron elicitada en una primera ocasión presentaron niveles más bajos



en comparación con el otro sistema de riego, sin embargo, en las mismas plantas, pero con una segunda aplicación del elicitor se presentó una disminución significativa en la capacidad antioxidante. Estos resultados se observan en la Figura 16.

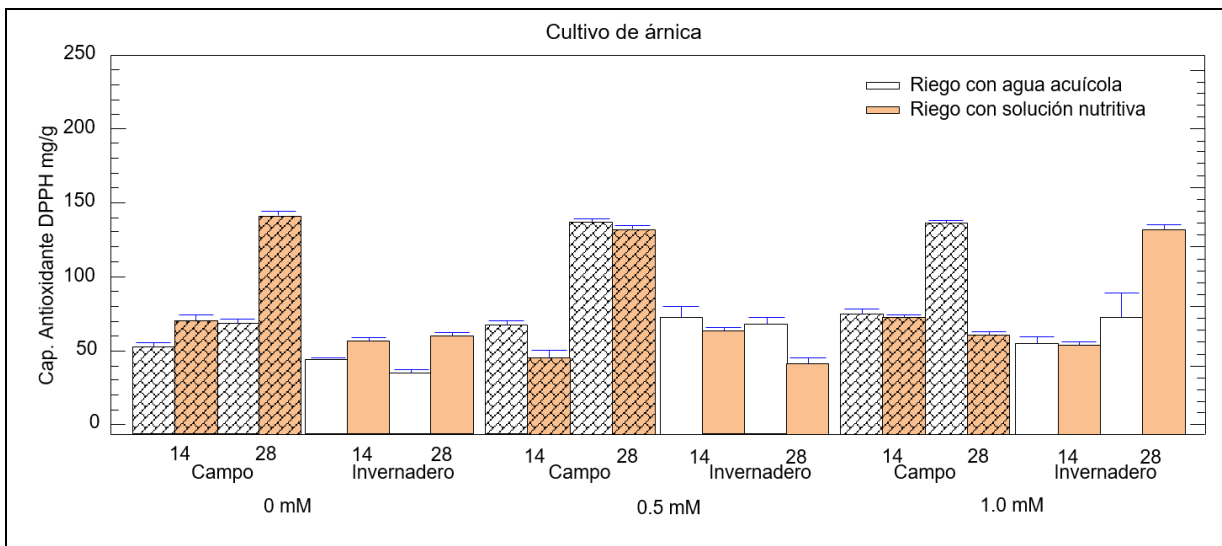


Figura 16. Capacidad antioxidante analizada por el método FRAP en plantas de árnica cultivadas en invernadero y campo con dos diferentes tipos de riego y elicitación a diferentes concentraciones de ácido salicílico.

También se midió la capacidad antioxidante en las plantas de árnica cultivadas en invernadero. La capacidad antioxidante en las plantas de árnica regadas con solución nutritiva que fueron elicidadas a una concentración de 0.5 mM del elicitor presentaron los niveles más altos con diferencias significativas en relación con las plantas que fueron regadas con agua acuícola, además, las plantas tuvieron diferencias significativas entre los tiempos de elicitación, siendo las plantas elicidadas en una segunda ocasión las que presentaron un incremento en la capacidad antioxidante. Por otro lado, las plantas elicidadas a una concentración de 1.0 mM en la primera aplicación no presentaron diferencias significativas entre ambos tipos de riego. Sin embargo, en la segunda elicitación se observó un incremento significativo principalmente en las plantas regadas con solución nutritiva (140 mg/g eq. Trolox). En general la capacidad antioxidante mayor se registró en las plantas cultivadas en campo con agua de cultivo acuícola sin diferencias en la concentración del elicitor, además, las plantas cultivadas en invernadero también presentaron niveles similares

de capacidad antioxidante pero específicamente en las plantas que se elicitaron a una concentración de 1.0 mM en con una segunda aplicación y que además fueron regadas con solución nutritiva.

La capacidad antioxidante obtenida en las plantas de hierbabuena que fueron cultivadas en campo, elicidadas a una concentración de 0.5 mM presentaron una disminución significativa cuando las plantas se trataron una segunda vez con el elicitor. Además, las plantas que fueron regadas con solución nutritiva en la primera aplicación del elicitor presentaron los niveles más altos con diferencias significativas entre las plantas que fueron regadas con agua proveniente de un cultivo acuícola. Para la segunda elicitación las plantas regadas con solución nutritiva sufrieron una disminución significativa de la capacidad antioxidante presentando los niveles más bajos y las plantas que fueron regadas con agua proveniente de un cultivo acuícola presentan mayor capacidad antioxidante. Por otro lado, las plantas elicidadas a una concentración de 1.0 mM no muestran cambios significativos entre el tipo de riego en la primera elicitación, sin embargo, las plantas elicidadas en una segunda elicitación presentaron una disminución significativa con cambios significativos entre el tipo de riego teniendo la capacidad actioxidante mayor en las plantas con el riego con agua del cultivo acuícola.

La capacidad antioxidante en las plantas de hierbabuena que fueron cultivadas en invernadero elicidadas a una concentración de 0.5 mM presentaron un incremento significativo en las plantas elicidadas por segunda ocasión, en donde no se tiene una diferencia significativa entre el tipo de riego. Sin embargo, en la primera aplicación del elicitor la capacidad antioxidante es mayor en las plantas regadas con solución nutritiva. La capacidad antioxidante en las plantas de hierbabuena elicidadas a una concentración de 1.0 mM no presenta cambios significativos entre el tipo de riego cuando son elicidadas en una sola vez, sin embargo, en la segunda aplicación del elicitor se presentan una disminución significativa solo en las plantas que fueron regadas con solución nutritiva (de 0 mg/g a 10 mg/g eq. Trolox). Estos resultados se exhiben en la Figura 17.

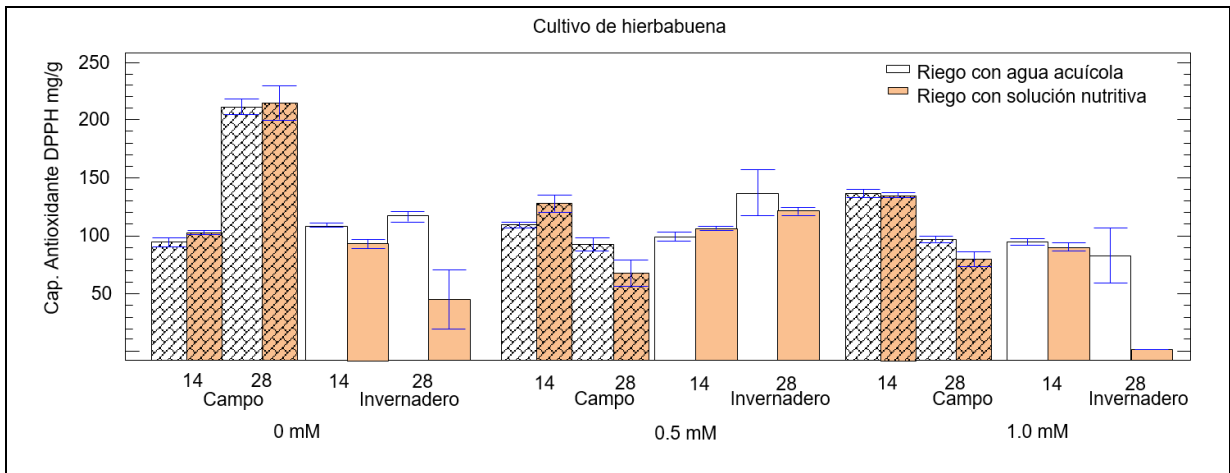


Figura 17. Capacidad antioxidante DPPH en plantas de hierbabuena que fueron cultivadas en campo e invernadero, regadas con solución nutritiva y agua acuícola y elicidadas a dos diferentes concentraciones de ácido salicílico.

La capacidad antioxidante en las plantas de orégano que fueron cultivadas en campo elicidadas a una concentración de 0.5 mM presentaron un incremento en la capacidad antioxidante cuando las plantas regadas con agua proveniente de un cultivo acuícola fueron elicidadas en una segunda vez teniendo la máxima capacidad antioxidante, por otro lado, las plantas que fueron regadas con solución nutritiva no presentaron cambios significativos. La elicitación a una concentración de 1.0 mM tuvo un efecto mayor en las plantas que se elicitaron por segunda ocasión presentando un incremento en la capacidad antioxidante con mayor capacidad en las plantas regadas con solución nutritiva. Estos resultados se presentan en la Figura 18.

Las plantas de orégano cultivadas en invernadero y elicidadas a una concentración de 0.5 mM presentan una disminución en la capacidad antioxidante en las plantas con una segunda aplicación del elicitor. Además, las plantas regadas con solución nutritiva presentan una mayor capacidad con diferencias significativas en relación con las plantas regadas con agua acuícola en relación a la segunda elicitación. Sin embargo, cuando las plantas fueron elicidadas por primera vez, no mostraron cambios significativos en relación al tipo de riego. Los efectos de elicitación a una concentración de 1.0 mM se observaron en las plantas regadas con agua proveniente de un cultivo acuícola con una segunda elicitación. El sistema de riego con solución nutritiva no presentó cambios significativos con relación a las veces de elicitación. En

general la mayor capacidad antioxidante se presentó en las plantas que se regaron con agua proveniente de un cultivo acuícola en ambos cultivos; invernadero y campo, sin embargo, la elicitación que eleva la capacidad antioxidante es a una concentración de 0.5 mM en campo y 1.0 mM en invernadero.

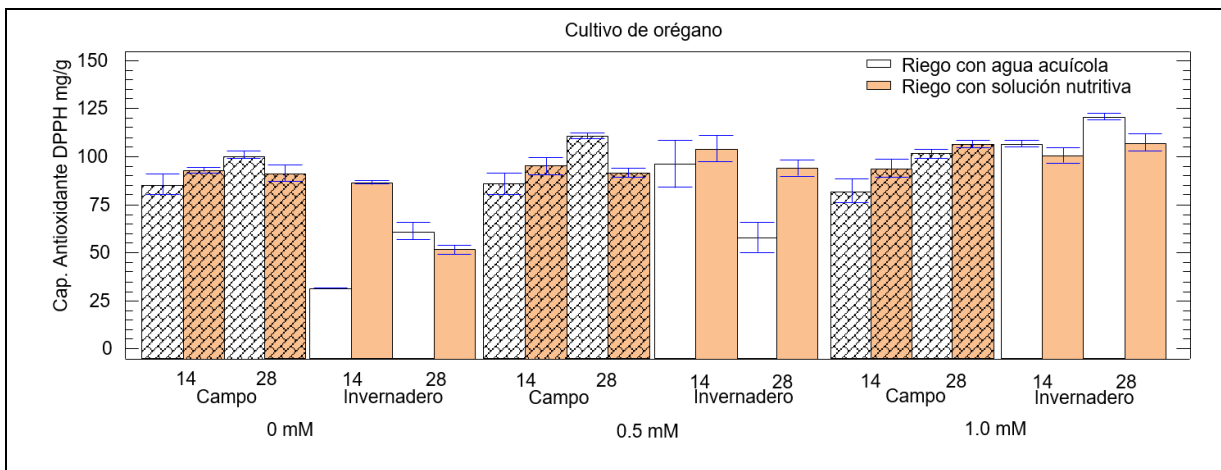


Figura 18. Capacidad antioxidante DPPH en plantas de orégano cultivadas en invernadero y campo regadas con agua acuícola y solución nutritiva con la elicitación de ácido salicílico a dos diferentes concentraciones.

Las plantas de toronjil cultivadas en campo con una elicitación de 0.5 mM y que fueron regadas con agua proveniente de un cultivo acuícola no presentan cambios significativos en relación con el tiempo de elicitación. Sin embargo, en las plantas regadas con solución nutritiva presentaron un incremento de la capacidad antioxidante cuando fueron elicidadas en una segunda ocasión. A pesar de estos resultados, no se presentan diferencias significativas entre el tipo de riego y la concentración aplicada del elicitor. Las plantas que fueron elicidadas a una concentración de 1.0 mM no presenta cambios significativos en relación con el tipo de riego a excepción de las plantas regadas con solución nutritiva con una segunda elicitación, presentando una disminución significativa. Estos resultados se enseñan en la Figura 19.

La capacidad antioxidante en las plantas de toronjil que fueron cultivadas en invernadero y elicidadas a una concentración de 0.5 mM presentaron un incremento significativo en la capacidad antioxidante cuando las plantas fueron elicidadas en una

segunda ocasión y que se regaron con agua proveniente de un cultivo acuícola. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas en las plantas con una aplicación del elictor por segunda vez entre el tipo de riego a excepción de las plantas que se elicitaron por primera vez, en donde las plantas regadas con agua acuícola presentaron mayor capacidad respecto a las plantas regadas con solución nutritiva. Por otra parte, las plantas elicitadas a una concentración de 1.0 mM se comportaron de manera similar a las plantas elicitadas a 0.5 mM, es decir, se observó un incremento en la capacidad antioxidante cuando se aplicó una segunda elicitación pero no se presentan cambios significativos en relación con el tipo de riego.

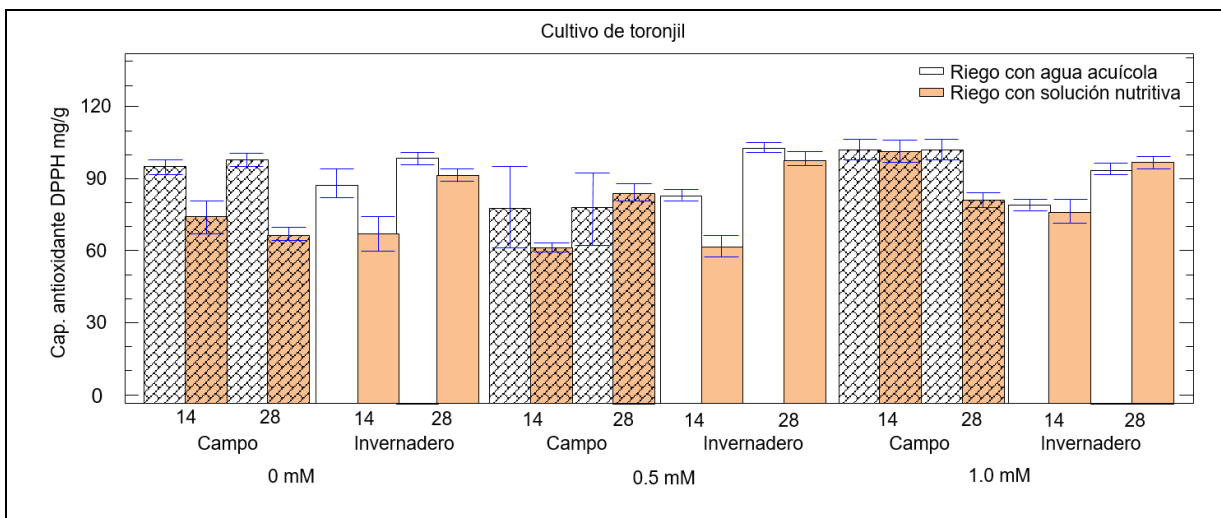


Figura 19. Capacidad antioxidante DPPH en plantas de toronjil cultivadas en invernadero y campo regadas con agua proveniente de un cultivo acuícola y solución nutritiva, con un elicitación con ácido salicílico a dos concentraciones.

#### 5.4.2 Método FRAP

La capacidad antioxidante medida por el método de FRAP en las plantas de árnica cultivadas en campo con una elicitación de 0.5 mM presentó un incremento en las plantas cuando fueron elicitadas por segunda ocasión teniendo la máxima capacidad cuando las plantas son regadas con agua acuícola con diferencias significativas entre las plantas regadas con solución nutritiva. También, las plantas regadas con agua acuícola y elicitadas en una primera ocasión mostraron la capacidad más alta. Las plantas de árnica regadas con agua acuícola que fueron elicitadas a una concentración de 1.0 mM presentaron la capacidad antioxidante más alta cuando se

realizó una segunda aplicación del elicitor. Por otra parte, las plantas que fueron regadas con solución nutritiva no presentaron cambios significativos en los tiempos de elicitación. Estos resultados se exhiben en la Figura 20.

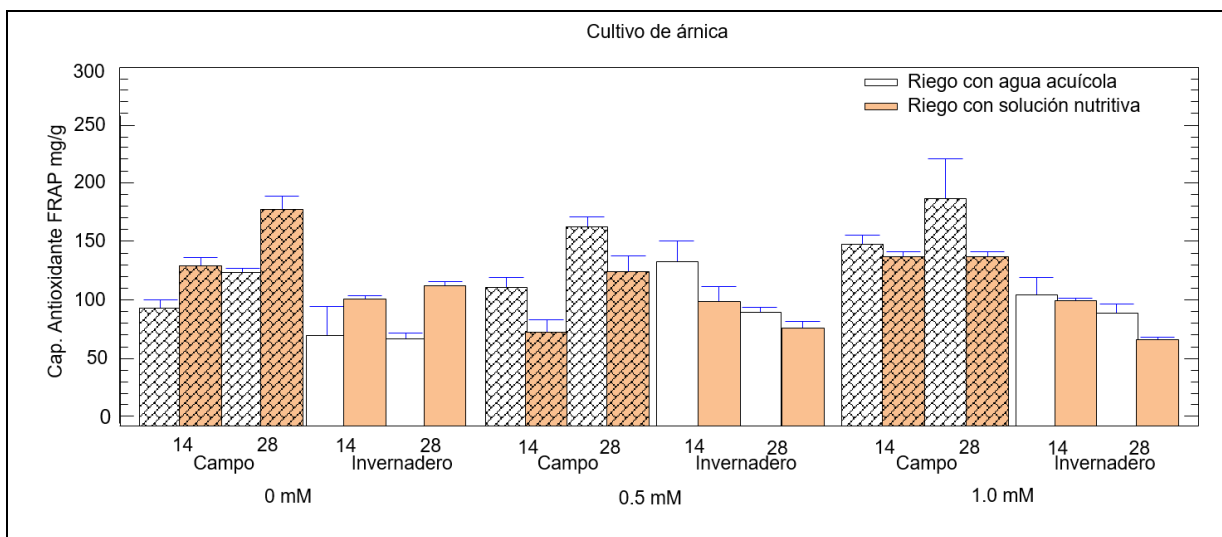


Figura 20. Capacidad antioxidante analizada por el método FRAP en plantas de árnica cultivadas en campo e invernadero con dos tipos de riego y la elicitación de ácido salicílico a dos concentraciones distintas.

Las plantas de árnica cultivadas en invernadero presentaron una disminución en la capacidad antioxidante en relación a las veces de elicitación. Los efectos de la elicitación a una concentración de 0.5 mM se comportaron de manera descendente cuando las plantas son elicitadas por segunda vez con cambios significativos entre los tipos de riego, siendo el sistema de riego de agua proveniente de un cultivo acuícola. Las plantas elicitadas a una concentración de 1.0 mM de ácido salicílico se comportaron de manera similar a las plantas elicitadas a 0.5 mM, presentando una disminución significativa entre el tipo de riego y el tiempo de elicitación. Los resultados presentaron la capacidad antioxidante cuando las plantas fueron regadas con agua proveniente de un cultivo acuícola. En general la capacidad antioxidante para el método FRAP fue mayor en las plantas cultivadas en campo regadas con agua proveniente de un cultivo acuícola y con una primera elicitación a una concentración de 1.0 mM de ácido salicílico.

La capacidad antioxidante analizada por el método de FRAP en las plantas de hierbabuena cultivadas en campo con una elicitación a una concentración de 0.5 mM fue disminuida cuando las plantas fueron elicidadas por segunda ocasión, aunque solo se tuvieron cambios significativos en las plantas regadas con solución nutritiva. En relación con las plantas alicitadas a 1.0 mM, se comportaron de manera similar a la otra elicitación. La capacidad antioxidante máxima se obtuvo en las plantas regadas con agua proveniente de un cultivo acuícola y que fueron elicidadas en una sola ocasión con diferencias significativas en el tipo de riego. Las plantas elicidadas en una segunda ocasión disminuyeron significativamente en relación con la primera aplicación del elicitor. Las diferencias entre el cultivo presentaron la mayor capacidad antioxidante cuando las plantas fueron regadas con agua proveniente de un cultivo acuícola. Estos resultados se presentan en la Figura 21.

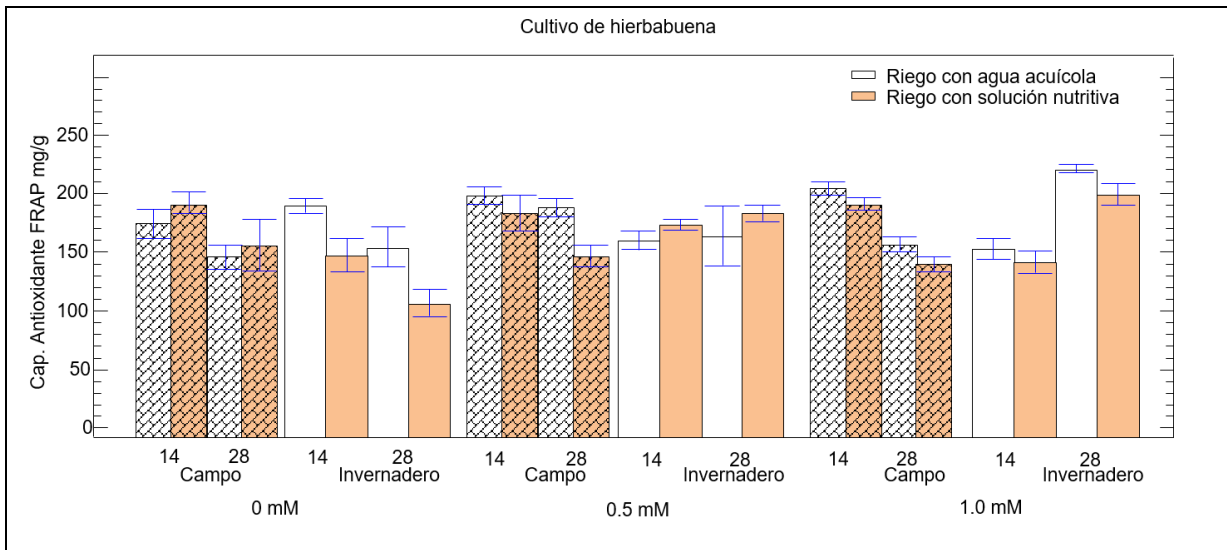


Figura 21. Capacidad antioxidante por el método FRAP en plantas de hierbabuena cultivadas en invernadero y campo regadas con agua acuícola y solución nutritiva elicidadas con ácido salicílico a dos concentraciones distintas.

Las plantas de hierbabuena que fueron cultivadas en invernadero elicidadas a una concentración de 0.5 mM con ácido salicílico no presentaron cambios significativamente importantes teniendo como capacidad antioxidante máxima en las plantas regadas con solución nutritiva. Sin embargo, la capacidad antioxidante registrada en las plantas de hierbabuena elicidadas con ácido salicílico a una

concentración de 1.0 mM fueron mayores en las plantas regadas con agua proveniente de un cultivo acuícola con una segunda aplicación del elicitor. Además, las plantas regadas con solución nutritiva también presentaron un incremento significativo cuando las plantas son elicitadas por segunda ocasión. En general la capacidad antioxidante se presenta en mayor cantidad en las plantas cultivadas en invernadero, regadas con agua proveniente de un cultivo acuícola y elicitados en dos ocasiones con ácido salicílico a una concentración de 1.0 mM.

La capacidad antioxidante en las plantas de orégano cultivadas en campo elicitadas a una concentración de 0.5 mM mostró un incremento significativo en las plantas que fueron elicitadas en una segunda ocasión, además de tener diferencias significativas en relación con el tipo de riego, presentando la máxima capacidad antioxidante en las plantas regadas con agua proveniente de un cultivo acuícola. La capacidad antioxidante en las plantas elicitadas a una concentración de 1.0 mM fue incrementando significativamente conforme a la elicitación. La capacidad antioxidante máxima se obtuvo en las plantas que fueron regadas con solución nutritiva elicitadas en una segunda aplicación. Los resultados se exhiben en la Figura 22.

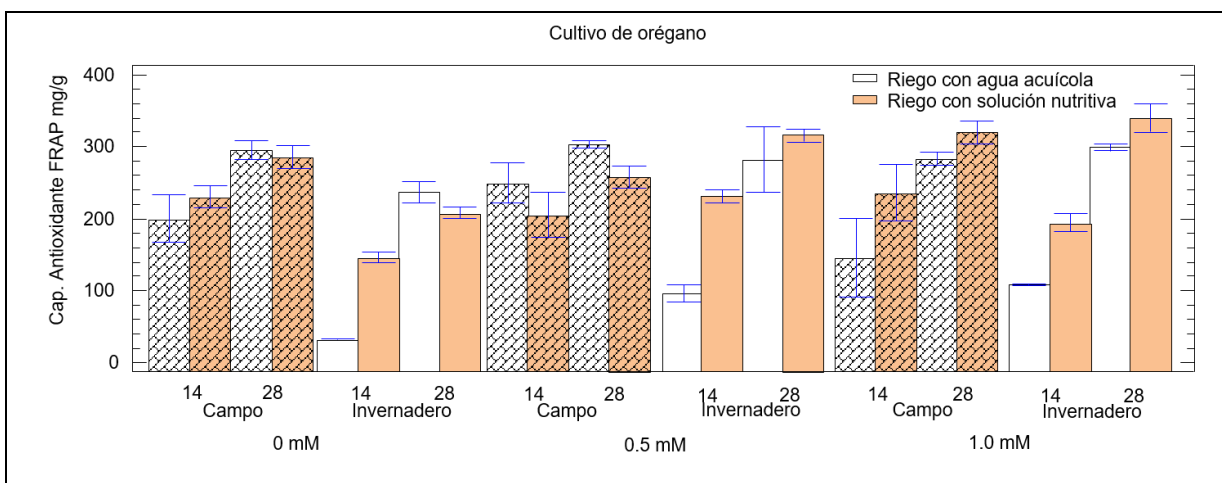


Figura 22. Capacidad antioxidante por el método FRAP en plantas de orégano cultivadas en invernadero y campo regadas con agua acuícola y solución nutritiva, elicitadas con ácido salicílico a dos concentraciones diferentes.



La capacidad antioxidante en las plantas de orégano cultivadas en invernadero elicitadas a una concentración de 0.5 mM de ácido salicílico fue incrementando significativamente cuando las plantas fueron elicitadas por segunda ocasión, además la máxima capacidad antioxidante obtenida fue en las plantas regadas con solución nutritiva sin diferencias significativas con el sistema de riego con agua proveniente de un cultivo acuícola. Las plantas elicitadas a 1.0 mM se comportaron de manera similar a las plantas elicitadas a 0.5 mM, con la diferencia de presentar cambios significativos entre los tipos de riego, teniendo la capacidad máxima en las plantas regadas con solución nutritiva. En general la capacidad antioxidante mayor se presentó en las plantas cultivadas en invernadero regadas con solución nutritiva sin tener cambios significativos en la concentración elicitada de ácido salicílico.

La capacidad antioxidante por el método de FRAP en las plantas de toronjil cultivadas en campo con la aplicación ácido salicílico a una concentración de 0.5 mM fue disminuida significativamente conforme a la segunda aplicación del elicitador, además la capacidad antioxidante mayor se presentó en las plantas regadas con agua proveniente de un cultivo acuícola con diferencias significativas entre el sistema de riego con solución nutritiva. La capacidad antioxidante en las elicitadas a una concentración de 1.0 mM fue menor en comparación con las plantas elicitadas a una concentración de 0.5 mM. Se tuvo una disminución en la capacidad antioxidante cuando las plantas se elicitaron en una segunda elicitación, además la capacidad antioxidante más alta fue con el sistema de riego con agua acuícola con diferencias significativas entre el sistema de riego con solución nutritiva con diferencias significativas entre las plantas regadas con solución nutritiva. Estos resultados se presentan en la Figura 23.

La capacidad antioxidante en las plantas de toronjil cultivadas en invernadero elicitadas a una concentración de 0.5 mM se comportó de igual manera que en las plantas cultivada en campo, es decir, se tuvo una disminución significativa en la capacidad antioxidante cuando se realiza una segunda aplicación del elicitador, además de presentar la capacidad antioxidante más alta en las plantas que fueron regadas con agua proveniente de un cultivo acuícola (300 mg/g eq. Trolox) con

diferencias significativas en relación con el sistema de riego con solución nutritiva. En general la capacidad antioxidante mayor se registró en las plantas cultivadas en invernadero regadas con agua proveniente de un cultivo acuícola además de ser elicitadas a una concentración de 0.5 mM con ácido salicílico.

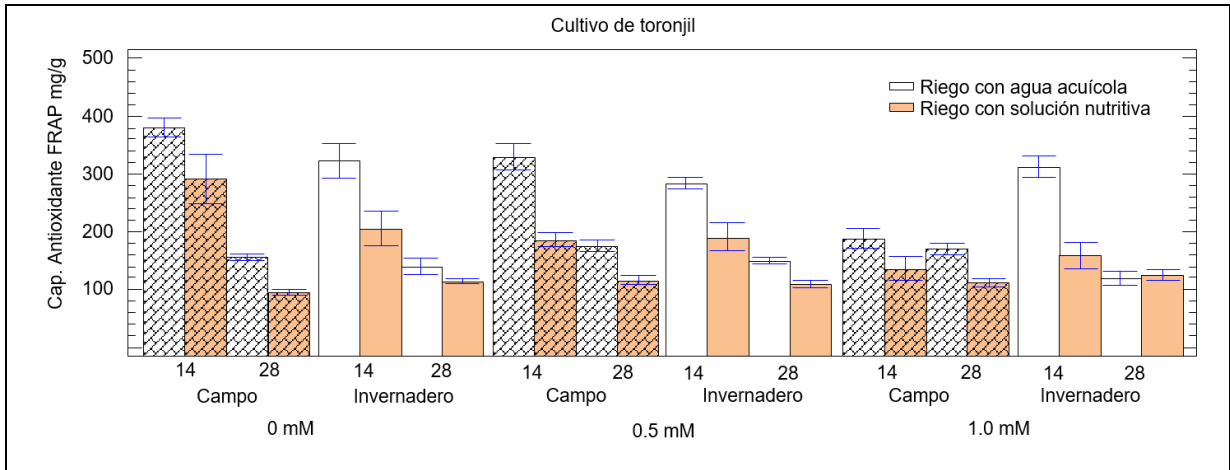


Figura 23. Capacidad antioxidante FRAP en plantas de toronjil cultivadas en campo e invernadero regadas con agua proveniente de un cultivo acuícola y elicitadas con ácido salicílico a dos concentraciones diferentes.

## 6. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue comparar la capacidad antioxidante, el contenido de fenoles y flavonoides totales en cuatro diferentes especies de plantas medicinales sometidas a dos diferentes condiciones de cultivo (campo e invernadero) y dos diferentes concentraciones de ácido salicílico (0.5 mM y 1.0 mM). De acuerdo con Muñoz y col (2012), el contenido de fenoles totales en infusiones de árnica fue de 173.31 mg/g por lo que los resultados obtenidos en este experimento presentan concentraciones bajas al observarse 30.2 mg/g como concentración máxima, esto se debe a la evaluación del cultivo al que fueron sometidas las plantas, es decir la influencia de diversos factores biótico y abiótico influye en el metabolismo vegetal de acuerdo con Petinatti y col. (2012). Además, el contenido de flavonoides en las infusiones de árnica de acuerdo con Muñoz y col (2012), fue 227.37 mg/L en comparación con la concentración máxima de flavonoides en las plantas de árnica de este experimento fue de 1853.25 mg/g en las plantas cultivadas en campo con un sistema de riego de agua del cultivo acuícola. Estos resultados se atribuyen a las condiciones descontroladas que se tuvieron en el cultivo a cielo abierto.

González (2013) menciona que el contenido de compuestos fenólicos en las plantas de hierbabuena *Mentha piperita* son mayores cuando se somete las plantas a estrés hídrico teniendo concentraciones de 107.71 mg/g, en relación con los resultados obtenidos en este trabajo, las plantas de hierbabuena de la especie que se manejó fueron 34.4 mg/g en condiciones de cultivo en campo. Estos resultados sugieren que las concentraciones se ven afectadas por las condiciones de temperatura ambiental ya que las temperaturas obtenidas en el cultivo en campo tuvieron fluctuaciones muy drásticas. Además, la concentración de flavonoides totales obtenida en infusiones de hierbabuena fue de 321.39 mg/g, de acuerdo con Muñoz y col (2012) lo que representa concentraciones muy por debajo en comparación con las obtenidas en las plantas cultivadas en campo y un sistema de riego con agua proveniente de un cultivo acuícola siendo esta de 2553.65 mg/g. Con respecto a la concentración de nutrientes obtenidos en el sistema de riego con agua proveniente de un cultivo

acuícola fue bajo en comparación con la concentración de nutrientes obtenidos en la solución nutritiva por lo que se puede destacar un estrés nutricional en las plantas.

De acuerdo con Duda y col (2015), los niveles de fenoles totales fueron mayores cuando las plantas son muestreadas por la tarde (4 pm) a diferencia del muestreo matutino, además, la concentración máxima de flavonoides en *Agastache foeniculum* fue de 38.2 mg/g en un estudio realizado sobre las temperaturas y tiempos de recolección de muestra. Estos resultados presentan ser menores ya que las plantas de *Agastache mexicana* son mayores (152.32 mg/g) en las plantas cultivadas en invernadero con riego de agua acuícola. Estos datos confirman que los cambios de temperatura en las plantas afectan la concentración de fenoles y flavonoides totales.

Respecto a la capacidad antioxidante por el método DPPH en las plantas de árnica, Coballase y col. (2010) reportan una capacidad antioxidante de 1.38 mg/m en extractos acetónicos y 1.14 mg/ml en extractos metanólicos que comparado con la capacidad antioxidante obtenida en este experimento están muy por debajo de los niveles obtenidos, siendo estos de 140-150 mg/g. Estos resultados indican que las condiciones de cultivo experimentadas favorecen la capacidad antioxidante en estas plantas. En relación con la capacidad antioxidante en hierbabuena, Scherer y col. (2013), concentraciones de 1.65 µg/ml en estas plantas, siendo valores bajos en comparación cuando las plantas son sometidas a un estrés biótico como la temperatura y la nutrición.

De acuerdo con lo reportado por Soto y col. (2012), la capacidad antioxidante máxima promedio en plantas de orégano fue de 160 mg/ml de un extracto compuesto de plantas obtenidas de diferentes estados como Guanajuato, Querétaro y Puebla, en donde mencionan que la variación en la concentración de cada muestra puede ser debido a la que los metabolitos especializados dependen de la zona geográfica, factores climáticos, altitud, etc. Estos resultados nos indican que la capacidad antioxidante obtenida en este trabajo es dependiente del tipo de clima (temperatura, humedad, radicación, etc) al que se someten las plantas.

Por otro lado, la capacidad antioxidante por el método FRAP en las plantas de hierbabuena y árnica, en mayor 180-200 mg/g respecto a lo reportado por Muñoz y col. (2012).

La capacidad antioxidante reportada por Duda y col. (2015) en las plantas de *Agastache foeniculum* fue de 8.42 mg/g resultados que en relación con los datos obtenidos en este experimento es mayor con 380 mg/g de capacidad antioxidante.

Las condiciones nutrimentales que se aplicaron en cada sistema de riego presentan un déficit en los compuestos contenidos en el sistema de riego proveniente de un cultivo acuícola, por lo que en la mayoría de las plantas como en árnica, hierbabuena y toronjil presentaron concentraciones máximas en los diferentes compuestos como los fenoles y flavonoides totales. De acuerdo con Torres y col. (2012), existen factores inductores de metabolitos que se pueden activar o desactivar de acuerdo a algún tipo de estrés. En el caso de los dos tipos de riego se puede inferir que se tiene un estrés nutricional en el sistema de riego con agua proveniente de un cultivo acuícola.

La elicitación de ácido salicílico puede influir en procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, así como, puede ayudar en la resistencia a estrés biótico y abiótico. Según lo descrito por Tierranegra y col (2011), la aplicación de ácido salicílico en plantas de lechuga presento los niveles más altos en fenoles y flavonoides totales cuando las plantas son elicidadas a una concentración baja de 0.1 mM. Es por ello que en este trabajo las plantas de toronjil y orégano en general respondieron mejor, es decir, mostraron la mayor concentración de bioactivos cuando se aplicó el elicitor a una concentración de 0.5 mM. Además, el efecto de la elicitación con ácido salicílico se ve reflejado en otros experimentos realizados con lechuga adicionando un estrés abiótico como es la salinidad en suelo, los datos reportados por Casasola en el 2012, presentan un incremento en los fenoles y flavonoides totales cuando las plantas son sometidas a un estrés salínico y una elicitación con ácido salicílico.

Lo descrito anteriormente nos explica el comportamiento de los compuestos fenólicos cuando las plantas son sometidas a diferentes tipos de estrés. La suma de estos factores nos da como resultado un realce a la producción de biocompuestos o a la

inhibición de la producción y/o expresión de metabolitos especializados como los analizados en este trabajo.

## **7. CONCLUSIONES**

El cultivo en cielo abierto con un sistema de riego con agua proveniente de un cultivo acuícola favorece la producción de fenoles y flavonoides totales en las diferentes plantas medicinales.

La aplicación de ácido salicílico como elicitador a una concentración de 0.5 mM puede aumentar la concentración de fenoles y flavonoides en plantas como el toronjil y el orégano y aumentar la capacidad antioxidante de estas moléculas.

El estrés nutricional es clave en la producción de fenoles y flavonoides totales en la mayoría de las plantas analizadas especialmente cuando son cultivadas a cielo abierto.

## 8. REFERENCIAS

- Amado** J. Propagación y desarrollo en vivero de Árnica (*Heterotheca inuloides* Cass), en el ce-Uruapan, (INIFAP), Michoacan. Tesis de Ingeniería. **2007**. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.
- Ávalos** A., Pérez E. y Carril U. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. **2009**. Vol. 2: 119-145
- Coballase** U., Pedraza C., Camacho C., Cárdenas R., Huerta G., Medina C., Mendoza C., Delgado L. y Espinosa A. Antioxidan activity of *Heterotheca inuloides* extracts and of some of its metabolites. *Toxicology*. **2010**. Vol. 276: 41-48
- Duda** S. C., Maghitas L. A., Dezmirean D., Duda M., Margaoan R. y O. Bobis. Changes in major bioactive compounds with antioxidant activity of *Agastache foeniculum*, *lavandula angustifolia*, *Melissa officinalis* and *Nepeta cataria*: Effect of harvest time and plant species. *Industrial crops and Products*. **2015**. Vol. 77: 499-507
- Estrada** R., Aguirre E., García A., Soto M., Linares E., Bye R., Heinze G. y Martínez M. Comparative chemical composition of *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* and *A. mexicana* subsp. *xolocotziana*. *Biochemical systematics and Ecology*. **2004**. Vol. 32: 685-694
- Fernández** A., Juárez V. y Cortéz L. Usos de las especies del género *Asclepias* L. (*Apocynaceae*, *Asclepiadoideae*), información del Herbario Nacional de México, MEXU. *Polibotánica*. **2008**. Vol. 25: 155-171
- Funari** C., Eugster P., Martel S., Carrupt P., Wolfender J. y Silvia D. High resolution ultra high pressure liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of Brazilian *Lippia* species. *Journal of Chromatography A*. **2012**. Vol. 1259: 167-178
- González** J. Caracterización de compuestos fenólicos presentes en la semilla y aceite de Chía (*Salvia hispanica* L.), mediante electroforesis capilar. Tesis de Maestría. **2010**. Instituto Politécnico Nacional.
- González** R., González T., Francisco P. y López M. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of the *Agastache mexicana* extracts by using several



experimental models in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*. **2012**. Vol. 142: 700-705

**Hayat Q.**, Hayat S., Irfan M. y Ahmad A. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany*. **2010**. Vol. 68: 14-25

**Juárez C.**, Aguilar J., Juárez M., Bugarín R., Juárez P. y Cruz E. Hierbas Aromáticas y Medicinales en México: Tradición e Innovación. *Revista Bio Ciencias*. **2013**. Vol. 2: 119-129

**Kamatani J.**, Iwadate T., Tajima R., Kimoto H., Yamada Y., Masuoka N., Kubo I. y Nihei K. Stereochemical investigation and total synthesis of inuloidin, a biologically active sesquiterpenoid from *Heterotheca inuloides*. *Tetrahedron*. **2014**. Vol. 70: 3141-3145

**Kedia A.**, Prakash B., Kumar M., Chanotiya C. y Kishore D. Antifungal, antiaflatoxic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L. essential oil). *International Biodeterioration & Biodegradation*. **2014**. Vol. 89: 29-36

**González Mendoza.** Efecto del estrés hídrico en hierbabuena () sobre polifenoles y capacidad antioxidante de infusiones. Ingeniero químico en alimentos. **2013**. Universidad Autónoma de Querétaro.

**Muñoz Velázquez E. E.**, Rivas Días K., Loarca Piña Ma. G. L., Mendoza Diaz S. O., Reynoso Camacho R. y M. Ramos Gómez. Comparison of phenolic content, antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of comercial herbal infusions. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. **2012**. Vol. 3: 481-495

**Petinatti D.**, Petinatti S., Niehues M. y Pepporine N. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Animal Feed Science and Technology*. **2012**. Vol. 176: 5-16

**Petinatti Pavarini Daniel,** Petinatti Pavarini Saulo, Niehues Michael y Norverto Pepporine Lopes. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Animal Feed Science and Technology*. **2012**. Vol. 176: 5-16

**Rangel G.**, Castro E., Beltran E., Reyes H. y García E. El ácido salicílico en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas*. **2010**. Vol. 12: 90-95

**Rangel G.**, Castro E. y García E. Avocado roots treated with salicylic acid produce phenol-2,4-bis (1,1-dimethylethyl), a compound with antifungal activity. *Journal of Plant Physiology*. **2014**. Vol. 171: 189-198

**Rastrelli L.**, Caceres A., Morales C., Simone F. De y Aquino R. Iridoids from *Lippia graveolens*. Elsevier Science Ltd. **1998**. Vol. 49: 1829-1823

**Santos J.**, Oliveira M., Ibáñez E. y Herrero M. Phenolic profile evolution of different ready-to-eat baby leaf vegetables during storage. *Journal of Chromatography A*. **2014**. Vol. 1327: 118-131

**Scherer R.**, Fumiere Lemos M., Fumiere Lemos M., Coimbra Martinelli G., Lopes Martins J. D. y A. Gomes Da Silva. Antioxidant and antibacterial activities and composition of Brazilian spearmint (*Mentha spicata* L.). *Industrial crops and Products*. **2013**. Vol. 50: 408-413

**Schlaepfer L.** y Mendoza J. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. **2010**. Vol. 41: 18-27

**Soto A.**, García R., Ramírez Y., Morán J. y Serrano B. El extracto acuosa de Orégano (*Lippia graveolens* HBK) del norte de México tiene actividad antioxidante sin mostrar un efecto tóxico in vitro e in vivo. *Int. J. Morphol*. **2012**. Vol. 3: 937-944

**Soto Domínguez A.**, García Garza R., Ramírez Casas Y., Morán Martínez J. y B. Serrano Gallardo L. El extracto acuoso de orégano (*Lippia graveolens* HBK) del norte de México tiene actividad sin mostrar un efecto tóxico in vitro e in vivo. *Int. J. Morphol*. **2012**. Vol. 30: 937-944

**Tezara W.**, Coronel I., Herrera A., Dzib G., Canul K., Calvo M. y González M. Photosynthetic capacity and terpene production in populations of *Lippia graveolens* (Mexican oregano) growing wild and in a common garden in the Yucatán peninsula. *Industrial crops and Products*. **2014**. Vol. 57: 1-9

**Tierranegra** García N., Salinas Soto P., Torres Pacheco I., Ocampo Velazquez R. V., Rico García E., Mendoza Diaz S. O., Feregrino Pérez A. A., Mercado Luna A., Vargas Hernández M., Soto Zarazúa G. M. y G. Guevara Gonzalez R. Effect of foliar salicylic acid and methyl jamonate applications on protection against pill-bugs in lettuce plants (*Lactuca sativa*). *Phytoparasitica*. **2011**. Vol. 10:

**Torres** Pacheco I., Guevara Gonzalez R. G., Mejía Teniente L. y Chapa Oliver A. M. Relationship between plant immunology and food production. CIENCIA@UAQ. **2012**. Vol.

**Tsitsiki** I. y Sosa A. Efecto de la hierbabuena (*Mentha spicata*) y oregano (*Origanum vulgare* L.), expuestas a rayos ultravioleta adicionadas a la dieta de conejas reproductoras (*Oryctolagus cuniculus* sp.). Tesis de Ingeniería. **2010**. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.

**Valares** C. Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente. Tesis de Maestría. **2011**. Universidad de Extremadura.

**Vázquez** M., Jiménez S., Torres I., Anaya I., Mendoza H. y Guevara R. Comprtamiento de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) asperjadas con ácido salicílico cultivadas bajo diferentes condiciones climáticas en invernadero. Ciencia UAQ. **2012**. Vol. 1: 1-9