



Universidad
de La Laguna

Optimización del cultivo de
Mentha piperita con el
fin de su uso en estudios
de elicitación para
aumentar las
concentraciones de
metabolitos de interés
farmacológico

Daiana Andrea Rosendo Casasola

Tutor: Francisco Javier Valdés González

Co-tutor: David Jiménez Arias

Departamento de Fisiología Vegetal

ÍNDICE

Abstract	3
Resumen.....	4
Acrónimos	5
1 Introducción	6
1.1 Metabolismo secundario en plantas.....	6
1.2 Elicitación para el incremento de metabolitos de interés en plantas.....	8
1.3 Estrés salino.....	8
2 Objetivos	10
3 Materiales y métodos	10
3.1 Material vegetal	10
3.2 Experimento de crecimiento.....	12
3.3 Experimento de acumulación de mentol en condiciones salinas	13
3.3.1 Extracción de mentol.....	13
3.3.2 Determinación directa de mentol por método espectrofotométrico	14
3.4 Análisis estadístico de los datos.....	15
4 Resultados y discusión	16
4.1 Ensayo de crecimiento	16
4.2 Validación del método espectrofotométrico	18
4.3 Determinación de la concentración de mentol en las distintas muestras.....	19
5 Conclusiones.....	20
6 Bibliografía	21

ABSTRACT

One of the most valuable essential oil production plant of the Lamiaceae family is the peppermint or *Mentha piperita*. This essential oil and its different extracts have been studied before even modern medicine. Nowadays actual studies shown antibacterial and antioxidant qualities among other properties, being widely used in many industries such as cosmetics, tobacco and pharmaceuticals.

The present study takes as reference different works on the effect of salinity stress, especially those in the biosynthesis of secondary metabolites, focusing on the impact of this stress on the production of menthol and the growth on the plant rather than the quantity of the essential oil. This was done using different controlled saline environments to determine which concentration was ideal to use in our experiment to increase the concentration of metabolites of pharmacological interest. A calibration curve statistically studied was achieved following a simple and direct method of menthol quantification using a UV/VIS spectrometer paired with a colorimetry reaction that allowed a fast, economic and reliable determination.

Results: Salinity conditions of 50 mM NaCl were those most adequate for the growth of *Mentha piperita* of those evaluated. Spectrophotometry analysis exhibited an increase of menthol concentration in those samples treated with a controlled salinity environment when compared to those who did not in our control group. It was concluded that the developed method is suitable for the optimization of the culture of *Mentha piperita* for its use in elicitation studies to increase the concentration of menthol.

Keywords: peppermint, menthol, salinity, secondary metabolites, elicitation.

RESUMEN

La *Mentha piperita*, o menta piperita, es una de las plantas de la familia Lamiaceae más apreciadas por su producción de aceite esencial. Este aceite y sus distintos extractos han sido estudiados incluso antes de la práctica de la medicina moderna. Hoy en día numerosos estudios determinan sus capacidades antibacterianas y antioxidantes entre otras, siendo ampliamente utilizado en industrias como la cosmética, la del tabaco o la farmacéutica.

El presente estudio toma como referencia distintos trabajos sobre el estrés salino, especialmente aquellos sobre la biosíntesis de metabolitos secundarios, centrándose en el impacto de este estrés en la producción de mentol y en el crecimiento de la planta más que en la cantidad de aceite esencial producida. Esto se realizó llevando a cabo distintos ambientes salinos controlados con el fin de determinar qué concentración era la ideal a utilizar en nuestros experimentos para la obtención de metabolitos de interés farmacológico. Se realizó una curva de calibrado estudiada estadísticamente que permitió una determinación rápida, fiable y económica del mentol.

Resultados: Condiciones de 50 mM de NaCl fueron las más adecuadas para el crecimiento de *Mentha piperita* de aquellas evaluadas. El análisis espectrofotométrico indicó un aumento de concentraciones de mentol en aquellas muestras tratadas con un ambiente salino controlado en comparación con aquellas que no lo fueron. Se concluyó que el método propuesto es adecuado para la optimización del cultivo de *Mentha piperita* para la elicitación con el fin de aumentar la concentración de mentol.

Palabras clave: menta, mentol, salinidad, metabolitos secundario, elicitación.

ACRÓNIMOS

H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
NDPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaCl	Cloruro sódico

1 INTRODUCCIÓN

La especie *Mentha piperita* perteneciente al grupo de la familia *Lamiaceae* es actualmente uno de los cultivos económicamente más importantes desde el punto de vista medicinal y aromático (1). Es un híbrido estéril de la menta acuática (*Mentha aquatica*) y la hierbabuena (*Mentha spicata*). Es muy aromática, perenne, glabra, herbácea de 30-90 cm en altura. Sus hojas tienen una longitud de 2.5-5 cm de largo con forma oval y borde serrado. Las flores son de un color rosado violáceo, floreciendo en los meses de verano. Originalmente nativa de Europa, Canadá y Estados Unidos ha sido naturalizada en numerosas partes de India.

El género de menta es utilizado principalmente por su sabor y sus propiedades medicinales a nivel mundial. Actualmente es uno de los cultivos más importantes desde el punto de vista económico y farmacéutico. Se han estudiado sus aceites esenciales demostrando actividad antioxidante e inhibitoria de microorganismos similar al antibiótico gentamicina (2). En concreto el aceite esencial de mentol presenta acción antibacteriana y antifúngica (3) como repelente de mosquitos y larvicida, alcanzando efectividades hasta del 100% en su eliminación una vez depositado en la superficie del agua (4).

1.1 METABOLISMO SECUNDARIO EN PLANTAS

Las plantas tienen en común junto al resto de seres vivos en que comparten un metabolismo primario cuyas reacciones son aquellas implicadas en los procesos vitales del organismo. Sin embargo, presentan también un metabolismo secundario capaz de producir diversos compuestos con propiedades biológicas llamados metabolitos secundarios.

Los metabolitos secundarios se sintetizan en pequeñas cantidades y de forma no generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (5). Reciben también la

denominación de productos naturales y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como perfumes, colorantes, insecticidas y medicamentos entre otros.

La mezcla de aldehídos, cetonas, terpenoides y alcoholes llamada comúnmente aceites esenciales es la responsable de los olores y sabores característicos de numerosas plantas. Los terpenos encontrados en los aceites esenciales son principalmente monoterpenos, como el limoneno y el mentol, constituyentes mayoritarios de los aceites de limón y menta respectivamente (5).

Los terpenos se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico, activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar isopentenil difosfato (IPP), o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en cloroplastos y genera también IPP. El isopentenil bifosfato y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP) son los precursores activados en la biosíntesis de terpenos en reacciones de condensación catalizadas por prenil transferasas para dar lugar a prenil bifosfatos como geranyl difosfato (GPP), el precursor de monoterpenos. Específicamente la biosíntesis de (-)-mentol se lleva a cabo en las células de las glándulas secretoras de la planta de menta.

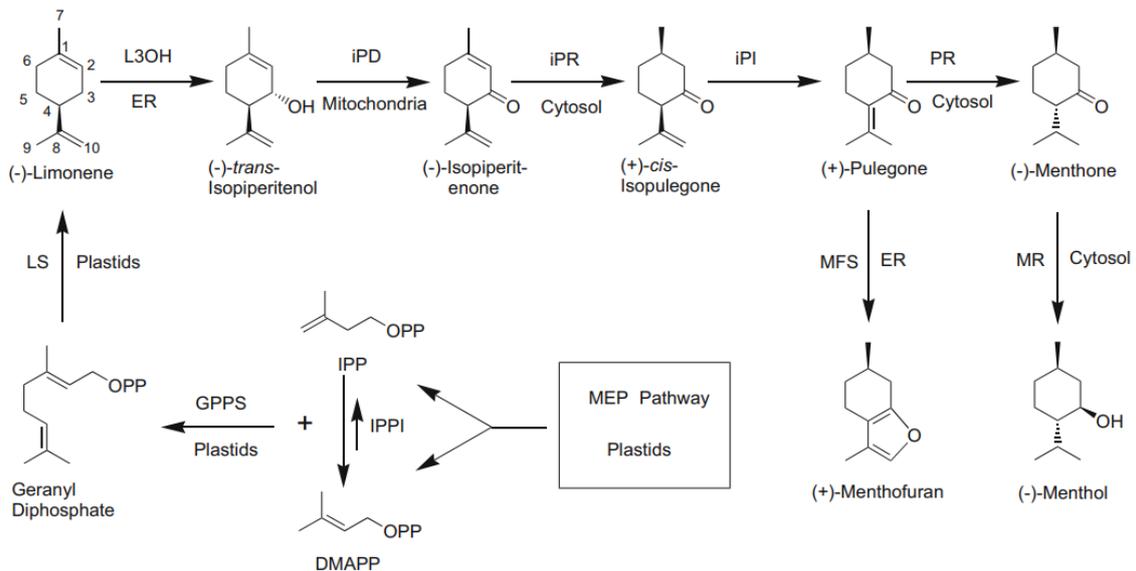


Figura 1 - Biosíntesis del (-)-mentol en las glándulas secretoras.
 B. Croteau R, M. Davis E, L. Ringer K, W. Wildung M. (-)-Menthol biosynthesis and molecular genetics.
 Naturwissenschaften. 2005 Noviembre;(92). (6)

1.2 ELICITACIÓN PARA EL INCREMENTO DE METABOLITOS DE INTERÉS EN PLANTAS

La acumulación de metabolitos secundarios es frecuente en plantas sometidas a distintos tipos de estrés, el cual puede estar causado por inductores o moléculas señalizadoras. También los factores ambientales como temperatura, intensidad lumínica, agua disponible, minerales y CO₂ influyen tanto en el crecimiento de la planta como en la producción de estos compuestos. Estos metabolitos secundarios son importantes para la supervivencia de la planta ya que permiten la adaptación a distintas condiciones de estrés (7).

Ejemplo de ello es la deshidratación celular causada por un medio salino que produce estrés osmótico con la consecuente disminución del volumen acuoso del citoplasma. Además de este estrés hídrico se provocará un estrés iónico que podrá provocar a su vez un incremento o reducción de metabolitos secundarios específicos en la planta (7).

Desde un punto de vista cualitativo el mentol y mentona son los principales constituyentes del aceite esencial de menta. La importancia comercial de este aceite esencial radica en una composición rica en estos dos componentes mientras se mantienen bajos porcentajes de otros compuestos indeseables como el mentofurano. Se han descrito casos del aumento de concentración de mentona frente a la disminución de mentofurano al incrementar la salinidad del medio de cultivo de la planta, dando no sólo una mayor producción de aceite esencial sino una mayor calidad de este producto comercial destilado a pesar de influir negativamente en su crecimiento (8).

1.3 ESTRÉS SALINO

La salinidad del medio disminuye la capacidad de obtención de agua por parte de la planta, reflejándose rápidamente en la tasa de crecimiento de esta y estando acompañado de una serie de efectos idénticos a los causados por el estrés hídrico (8).

La primera fase de reducción del crecimiento es relativamente aparente y es debido a la sal presente fuera de las raíces. Posteriormente se da una segunda fase tardía de

reducción del crecimiento, reflejo del daño interno en la planta. Esto es debido a la acumulación de sales en las hojas encargadas de la respiración, excediendo la capacidad de la célula de compartimentar sales en vacuolas. Como resultado, la concentración de sales en el citoplasma aumenta e inhibe la actividad enzimática o se acumula en las paredes celulares causando deshidratación (9).

La salinidad puede afectar así al crecimiento a través de cambios en las relaciones hídricas, el equilibrio hormonal y la captación de carbono en función a la concentración y tiempos a la que ha sido expuesta la planta. Estos efectos se pueden apreciar a simple vista no sólo debido a la disminución de crecimiento sino en la pérdida de turgencia y cambio de color, apreciables en la Figura 2.



Figura 2 - Planta sometida a medios de 150 mM de NaCl

El impacto del estrés salino ha sido estudiado por parte de varios autores tanto de forma cuantitativa como cualitativamente en distintas plantas encontrando resultados contradictorios tanto en tasa de crecimiento como en producción de aceite esencial y su composición (8). En este trabajo se pretende estudiar el efecto que tiene la salinidad sobre el crecimiento y la acumulación de mentol con el fin de optimizar un protocolo para futuros estudios.

2 OBJETIVOS

Los objetivos principales de este trabajo son:

- Estudio del crecimiento de *Mentha piperita* en hidroponía bajo diferentes concentraciones de sal.
- Estudio de la acumulación de mentol en medios de cultivo de condiciones salinas controladas.
- Realización de un protocolo espectrofotométrico de determinación directa de mentol.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron semillas de menta proporcionadas por un agricultor de Las Palmas de Gran Canaria en marzo de 2019.

Debido al pequeño tamaño de la semilla, para su germinación se emplearon seedholders de la marca Araponics®, rellenos con una mezcla de arena de río de granulometría media y fina, incubados en pequeños invernaderos plásticos con agua destilada y arena de río de granulometría media (Figura 3). La germinación tuvo lugar en una cámara de cultivo empleando un fotoperiodo largo de 16/8 horas de luz/oscuridad con una temperatura de 22 °C y una humedad relativa del 70%. En esta etapa el recipiente se mantuvo tapado para conservar una atmósfera cercana al 100% de humedad.



Figura 3 – Germinación en pocillos con arena de río

Tras cinco días después de la germinación, los pocillos fueron colocados en un sistema hidropónico compuesto por cubetas de 2 litros, manteniendo la atmósfera húmeda hasta la observación de las primeras hojas verdaderas. A los 13 se sustituyó el agua destilada original por una disolución nutritiva diluida al 50% con agua destilada, pasando a utilizar la concentración completa a las dos semanas. La composición se encuentra detallada en la Tabla 1.

Tabla 1 – Soluciones nutritivas

	Compuesto	Concentración final	Volumen a tomar por 25L de medio
Solución 1			100 mL
	KNO ₃	1.25 mM	
	KH ₂ PO ₄	0.5 mM	
Solución 2	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.75 mM	
	Ca (NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	0.75 mM	100 mL
Solución 3			100 mL
	H ₃ BO ₃	12.5 mM	
	MnSO ₄ · H ₂ O	2.5 mM	
	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0.5 mM	
	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0.375 mM	
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	0.01875 mM	
Solución 4			75 mL
	Sequestrene®	44.8 μM	

Pasados 16 días más, cuando el tamaño de la planta permitió su mantenimiento sin tener que usar el seedholder, se liberó de este y se pasaron a cubetas de mayor tamaño capaces de albergar 30 plantas cada una y 4 litros totales. El medio era aireado mediante bombas de aireación y tubos de silicona perforados durante 10 minutos cada 48 horas.

Las plantas permanecieron 18 días adicionales en las condiciones de temperatura, fotoperiodo y humedad anteriormente descritos antes de proceder a la adición de la sal para comenzar los diferentes experimentos.

3.2 EXPERIMENTO DE CRECIMIENTO

Se prepararon distintas soluciones nutritivas adicionándoles diferentes concentraciones de NaCl (50, 100 y 150 mM) además de emplear un grupo control sin sal (Figura 4). El experimento se dio por finalizado a los 15 días. Para calcular la tasa de crecimiento las plantas fueron pesadas individualmente antes de agregar la sal al cultivo hidropónico siendo este momento t_0 y tras 15 días se volvieron a pesar, expresando este tiempo como t_{15} .



Figura 4

Una vez obtenidos los pesos en fresco, se secaron las plantas en una estufa a 70°C durante 48 horas. Posteriormente se calculó el porcentaje correspondiendo al material vegetal, multiplicando por el peso de cada planta a t_0 y t_{15} , utilizándose estos datos para calcular la tasa de crecimiento relativo como sigue en la fórmula:

$$\text{Tasa de crecimiento relativo} = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{t_2 - t_1}$$

Donde: W = media de la biomasa de las plantas recolectadas, t = tiempo

3.3 EXPERIMENTO DE ACUMULACIÓN DE MENTOL EN CONDICIONES SALINAS

Para el estudio de la acumulación de mentol en condiciones salinas se realizó un nuevo cultivo hidropónico con dos grupos diferenciados: un grupo control sin adición salina y otro grupo expuesto durante una semana a una concentración de NaCl de 50 mM en su solución nutritiva antes de realizar la extracción de mentol. Esta concentración salina demostró ser la más adecuada para obtener una cantidad de material vegetal suficiente del que extraer aceite esencial siguiendo el protocolo propuesto por Anastasia-Sandu *et al.* (2013) (9).

3.3.1 Extracción de mentol

Una vez finalizado el tiempo de cultivo las hojas pertenecientes al Grupo A (control) y Grupo B (tratamiento salino con 50 mM NaCl) separaron utilizando pinzas y tijeras con cuidado para no retirar el mentol presente en los tricomas glandulares de su superficie. Cada una de las extracciones se realizó con aproximadamente 1 g de hojas pertenecientes a cada uno de los grupo ensayados y este se midió por triplicado, obteniéndose un total 6 extractos (3 para cada una de las condiciones) distintas. Estas muestras fueron almacenadas en tubos cónicos de centrífuga, congeladas con nitrógeno líquido y almacenados en un congelador para su posterior manipulación.

A la hora de procesar las hojas se adicionó 10 mL de etanol a cada uno de los tubos de centrífuga triturando a su vez suavemente con una varilla de vidrio con intención de impregnar completamente las hojas. Se mantuvo los tubos de centrífuga por 2 horas a agitación suave para realizar la extracción de mentol presente en la superficie de las hojas.

Pasado este tiempo parte del sobrenadante fue recogido con una micropipeta y depositado en tubos de microcentrífuga. Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 12000 rpm. Con el uso de una micropipeta se recogió 800 μ L de sobrenadante con cuidado de no resuspender el fondo, depositándolo en tubos de ensayo para realizar la reacción colorimétrica y posterior determinación. Estas determinaciones se realizaron

por duplicado, obteniéndose un total de 12 datos de absorbancia para cada grupo y 24 en total.

3.3.2 Determinación directa de mentol por método espectrofotométrico

En el trabajo realizado por Anastasia-Sandu *et al.* (2013) (9) se propone y valida un método sencillo y directo para la determinación de mentol en disolución mediante el uso de espectrofotómetro UV/VIS. El método propuesto es selectivo, sensitivo y sin necesidad de control de temperatura.

La concentración de la disolución patrón utilizada se ha calculado teniendo en cuenta que el volumen final de reacción serán 3 mL y el volumen de muestra a adicionar 800 μL . Con este fin se pesaron 18,75 mg de mentol puro en una balanza de precisión, llevando posteriormente a un matraz aforado de 200 mL y completando el volumen total con etanol 96% (v/v) hasta su completa disolución. La concentración final de la disolución patrón es de $9,375 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

A partir de la disolución patrón se prepararon 6 disoluciones estándar siguiendo las diluciones de la Tabla 2.

Tabla 2

	1	2	3	4	5	6
Concentración final ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78
Dis. Patrón (μL)	800	400	200	100	50	25
Etanol (μL)	0	400	600	700	750	725

El mentol no presenta grupos cromóforos por lo que se debe realizar previamente una reacción colorimétrica. El mentol en presencia del salicilaldehído y con ayuda de un medio ácido reacciona produciendo un producto de color rojo-naranja que permanece estable para su medición en espectrofotómetro durante 12 h.

Debido a que el volumen de reacción originalmente propuesto, 15 mL, es excesivo en este caso, se ajustó la cantidad de reactivo a utilizar para obtener un volumen final de 3 mL, manipulando de esta manera una quinta parte del H₂SO₄ concentrado inicial.

Para realizar la reacción se adicionaron los componentes de la Tabla 3 siguiendo ese orden.

Tabla 3

Propuesto por Anastasia-Sandu <i>et al.</i> (2013)		Optimización propia	
0,2 – 2,0 mL	Mentol	800 µL	Muestra
Hasta 4 mL	Etanol	0 mL	Etanol
1,0 mL	Salicilaldehido (1%)	200 µL	Salicilaldehido (1%)
10 mL	H ₂ SO ₄ (96-98%)	2 mL	H ₂ SO ₄ (96-98%)
15 mL finales		3 mL finales	

Volúmenes de 800 µL de muestra se transfirieron a tubos de ensayo donde se adicionó 0,2 mL de salicilaldehido (1%) y, por último, 2 mL de H₂SO₄ concentrado (96-98%) gota a gota. La disolución de salicilaldehido (1%) necesaria para esta determinación fue obtenida diluyendo un volumen adecuado de solución (99%) con etanol. Los tubos de ensayo se agitaron ligeramente para mezclar la disolución y se dejaron reposar 30 minutos hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Las absorbancias se midieron a 510 nm en una celda de plástico de 1.0 cm utilizando como blanco una disolución preparada de la misma manera, pero sin adición del mentol. El espectrofotómetro UV/VIS utilizado es el modelo UV-6300PC Double Beam Spectrophotometer de VWR International (Researchpark Hassrode, Leuven, Bélgica).

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los datos obtenidos de las determinaciones se analizaron utilizando el software informático Microsoft Excel 2019®. Se calculó el valor de p para cada uno de los grupos

de datos obtenidos en cada uno de los experimentos con el fin de determinar el nivel de significancia de estos. En el experimento de crecimiento se tomó como referencia la masa inicial, comparándola a su vez con el grupo de masas finales. En el experimento de mentol el grupo de referencia fue el control frente al tratamiento salino.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ENSAYO DE CRECIMIENTO

Los resultados del ensayo de crecimiento se adjuntan en la Tabla 6, donde se expresa el promedio de masa de cada uno de los grupos al inicio del tratamiento salino y una vez finalizado. El crecimiento de cada uno de los grupos fue evaluado en base a su tasa de crecimiento relativa.

Tabla 4

Grupo	Inicio	Final	% MAT. VEG.	W1	W2	Tasa de crecimiento relativo
Control 0 mM	2,82 ± 0,83 ***	7,78 ± 2,44 ***	81,23	228,80	631,83	6,77
(1) 50 mM	2,50 ± 1,03 ***	5,25 ± 2,57 ***	81,75	204,61	429,25	4,94
(2) 100 mM	1,89 ± 0,71 **	3,24 ± 1,68 **	79,33	150,05	257,17	3,59
(3) 150 mM	1,63 ± 0,75	1,48 ± 0,95 *	71,23	116,13	105,55	-0,64

Diferencias significativas con respecto al control con un $p < 0,05$: *** $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, * $p < 0,1$.
Comparativa realizada entre masas, en gramos, obtenidas al inicio del experimento (Inicio) y al final de este (Final).

Como era esperable el grupo control, donde las plantas han sido cultivadas en un medio sin sal, presenta un mayor crecimiento. Estas observaciones coinciden con las descritas en el trabajo de Khorasaninejad *et al.* (8) donde el grupo control presenta los mayores parámetros de crecimiento en todos los aspectos evaluados en la planta. A medida que se adiciona NaCl a la solución hidropónica se aprecia una disminución constante en el crecimiento, aumentando a mayor concentración de sal e incluso

llegando a ser negativa en el último grupo debido a la pérdida de hojas y muerte de las plantas antes de finalizar el ensayo. Nuevamente estos resultados coinciden con los expresados por Khorasaninejad *et al.* (2010) donde las plantas expuestas a 150 mM de NaCl no toleraron estas condiciones y murieron.

Los resultados de otros autores comentados por Munns R. (2002) (10) en su libro respecto a la tolerancia de especies no halófilas también informan de la muerte de otras especies, como el trigo (*Triticum aestivum*), a niveles salinos superiores a 175 mM. A su vez, la concentración de 100 mM ha mostrado una tasa de mortalidad de un 50% con respecto a la del grupo control. Sin embargo, en este apartado en el trabajo de Khorasaninejad *et al.* la disminución de la biomasa total es de aproximadamente un 90% en el grupo correspondiente a 50 mM de NaCl y de un 95% en el del 100 mM de NaCl, datos que no se corresponden con los obtenidos en este experimento.

La concentración de 50 mM, al presentar la menor disminución en el crecimiento de todos los grupos y a su vez permitir el desarrollo de la planta, ha resultado ser la más adecuada para realizar posteriormente el estudio con el fin de comprobar el efecto de la sal sobre la concentración de mentol.

4.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Los datos obtenidos en el espectrofotómetro fueron representados en una recta de calibrado definida por la ecuación $y = 0,1599 + 0,0826x$ y con un coeficiente de correlación de 0,9993 (Figura 6).

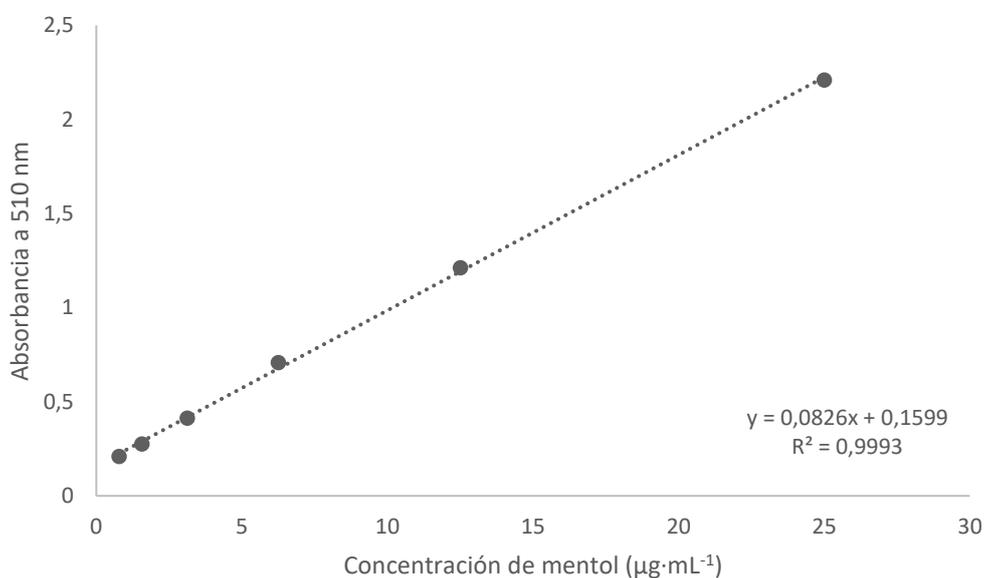


Figura 6 – Recta de calibrado experimental

El intervalo de concentraciones de mentol ensayadas en las que se cumple la linealidad de la ley de Lambert-Beer de nuestra recta patrón es de 0,78 a 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, frente a los datos propuestos por Anastasia-Sandu *et al.* (2013), siendo este rango desde 1.33 a 13.33 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, con un coeficiente molar de $1.1533\cdot 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ a 510 nm.

Estos resultados comprueban por lo tanto la reproducibilidad del método propuesto por Anastasia-Sandu *et al.* (2013).

4.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MENTOL EN LAS DISTINTAS MUESTRAS

Utilizando los datos de la recta de calibrado experimental se calcularon las medias de concentración de mentol expresadas en $\mu\text{g/mL}$ y ajustadas en base a la masa exacta de cada una de las muestras preparadas. Las concentraciones promedio de cada grupo y del total obtenidas experimentalmente se encuentran en la Tabla 5.

Tabla 5 - Concentración de mentol ($\mu\text{g/mL}$)

Extracto	Grupo A (Control)	Grupo B (50 mM NaCl)
1	65,81 \pm 9,43 ***	77,58 \pm 3,61 ***
2	57,22 \pm 12,77 ***	73,04 \pm 5,75 ***
3	50,63 \pm 15,04	59,56 \pm 9,14
Promedio	57,89 \pm 7,6 **	70,06 \pm 9,3 **

Diferencias significativas con respecto al control con un $p < 0,05$: *** $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, * $p < 0,1$.

Comparativa realizada entre las concentraciones obtenidas tomando como referencia el grupo control (A) y el grupo tratado en condiciones salinas (B). Se ha separado cada medición realizada a cada extracto (1,2 o 3) y el promedio total de cada grupo.

Los resultados demuestran que la elicitación mediante el estrés salino en condiciones controladas es efectiva con el fin de aumentar las concentraciones de mentol. Sin ser este el objetivo del estudio, los datos obtenidos por Khorasaninejad *et al.* (2010) comentan de una reducción en la cantidad de aceite esencial, pero afirmando desde el punto de vista cualitativo junto a las observaciones de J. Charles *et al.* (1990) (11) el aumento de compuestos deseables como la mentona y la disminución de otros indeseables como el mentofurano.

En el caso concreto del mentol Khorasaninejad *et al.* (2010) corrobora nuestros resultados obtenidos en el grupo control. Esta información a su vez concuerda con el aumento de las concentraciones de mentol observadas en los resultados de nuestro experimento ya que en todos los grupos de muestreo se aprecia un aumento de concentración en mentol que representa aproximadamente un 25% sobre el promedio total del grupo control.

5 CONCLUSIONES

La optimización del cultivo de *Mentha piperita* propuesto en este ha resultado ser un método simple, rápido y económico para para el aumento de las concentraciones de metabolitos de interés farmacológico. Se ha verificado también la viabilidad y la reproducibilidad de la técnica que permite la determinación directa por espectrofotometría UV/VIS del mentol utilizando una reacción colorimétrica.

Al aplicar este método de elicitación se deben tener en cuenta otros aspectos comentados en detalle en este trabajo debidos al propio mecanismo del estrés salino. La disminución del crecimiento de la planta, el volumen final de aceite esencial obtenido y la composición relativa de sus componentes son aspectos de gran relevancia a tener en cuenta en una futura implementación de este método.

6 BIBLIOGRAFÍA

1. Shah PP, D'Mello PM. A review of medicinal uses and pharmacological effects of Mentha Piperita. *Natural Product Radiance*. 2004 Julio-Agosto; 3(4): p. 214-215.
2. Singh R, A.M. M, Shushni , Belkheir A. Antibacterial and antioxidant activities of Mentha piperita L. *Arabian Journal of Chemistry*. 2015 Mayo; 8(3).
3. Pattnaik S, Subramanyam VR, Bapaji M, Kole CR. Antibacterial and Antifungal Activity of Aromatic Constituents of Essential Oils. *Microbios*. 1997; 89(358).
4. Ansari MA, Vasudevan P, Tandon M, Razdan RK. Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (Mentha piperita) oil. *Bioresource Technology*. 2000 Marzo;(71).
5. Ávalos García A, Pérez-Urria Carril E. Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA (Biología)*. 2017; 10(2).
6. B. Croteau R, M. Davis E, L. Ringer K, W. Wildung M. (-)-Menthol biosynthesis and molecular genetics. *Naturwissenschaften*. 2005 Noviembre;(92).
7. Ramakrishna A, Gokare AR. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*. 2011 Junio;(11).
8. Khorasaninejad S, Mousavi A, Soltanloo H, Hemmati K, Khalighi A. The effect of salinity stress on growth parameters, essential oil yield and constituent of peppermint (Mentha piperita L.). *World Applied Sciences Journal*. 2010 Noviembre;(11).
9. Anastasia-Sandu A, Bîrzu S, Ditu I, Bulgariu L. Direct Determination of menthol using a simple spectrophotometric method. *Bulletin of the Polytechnic Institute of Iasi, Section Chemistry and Chemical Engineering*. 2013; LIX(71-80).
10. Munns R. Salinity: Environment - Plants - Molecules Läuchli A, Lüttge U, editors. Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2002.
11. J. Charles D, J. Joly R, E. Simon J. Effects of Osmotic Stress On The Essential Oil Content and Composition of Peppermint. *Phytochemistry*. 1990; 29(9).