

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Actividad antioxidante de *Mentha longifolia* L. y sus  
aplicaciones**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Sabah Awad Alzahrani**

Directores

**Aránzazu Gómez Garay**  
**Beatriz Pintos López**

Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE *Mentha longifolia* L.  
Y SUS APLICACIONES**

**MEMORIA PARA OPTAR AL**

**GRADO DE DOCTORA**

**PRESENTADA POR**

**SABAH AWAD ALZHRANI**

**DIRECTORAS**

**Dra. ARÁNZAZU GÓMEZ GARAY**

**Dra. BEATRIZ PINTOS LÓPEZ**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

**TESIS DOCTORAL**

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE *Mentha longifolia* L.  
Y SUS APLICACIONES

MEMORIA PARA OPTAR AL  
GRADO DE DOCTORA  
PRESENTADA POR

SABAH AWAD ALZHRANI

DIRECTORAS

Dra. ARÁNZAZU GÓMEZ GARAY  
Dra. BEATRIZ PINTOS LÓPEZ







La realización de la presente memoria de Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el grupo de investigación **UCM: GR17-970861 (FISIOLOGÍA VEGETAL APLICADA) FiVe-A** dando lugar a la siguiente publicación:

Al-Zahrani S, Astudillo-Calderón S, Pintos B, Pérez-Urria E, Manzanera JA, Martín L, Gomez-Garay A. **Role of Synthetic Plant Extracts on the Production of Silver-Derived Nanoparticles.** *Plants.* 2021; 10(8):1671.  
<https://doi.org/10.3390/plants10081671>



# ***AGRADECIMIENTOS***



## AGRADECIMIENTOS

A pocos pasos del final de un largo viaje que pasé en una prestigiosa universidad, donde recordaré y hablaría con mucho honor el hecho de haber compartido tiempo y espacio con personas con un nivel profesional tanto como humano.

Primero, quiero mostrar mi más sincero agradecimiento a mi directora de tesis, Arancha Gómez Garay, quien sin su ayuda no había seguido ni llegado a este momento. Por sus valiosa aportación y enseñanza y por ser un referente continuo de trabajo y dedicación, también a mi tutora, Beatriz Pintos López de seguir y revisar todo el trabajo de principio a fin y por haber estado dispuesta en cualquier momento a colaborar.

A Elena, Raquel, Luisa, Blanca y Adolfo, Mari Carmen y todo el personal de la quinta planta, deseo mostrar mi agradecimiento a todo el cariño recibido durante mi estancia en la facultad,

Deseo agradecer la ayuda brindada por la Vicedecana de posgrado y extensión cultural de la facultad de Ciencias biológicas M. Ester Pérez Corona. Irene Gutiérrez Cañas, Coordinadora del Programa de Doctorado en Biología y Rosa María Rodríguez García de la secretaría.

Me gustaría expresar mi gratitud a mi padre el pilar de mi vida quien a pesar de mi carácter sigue teniendo esperanza en mí y cuento siempre con su apoyo.

A mi madre por darme todo y enseñarme ser buena persona, a mi hermano "Nawaf" por estar siempre a mi lado, y a mis hermanas por su amor y su apoyo incondicional. A Dalia mi sobrina por su cercanía, su apoyo y la confianza depositada en mí.

A mi madre por acogida "Consuelo" por sus consejos y por preocuparse siempre por mis estudios y mi vida social.

Y por fin Deseo extender mi agradecimiento especial al Doctor Saeed Al Malki de la "Cultural Bureau In Spain " a Fátima y Zainab.



الحمد لله ماتناهي ربُّ ولا ختم جهْدٌ ولا تم سعيٌ إلا بفضلِه، الحمد لله على البلوغ ثم  
الحمد لله على التمام.

أمي الحبيبة  
طالما لمحت نظرة الحسرة في عينيك وأنتي تُقلبين الكُتب وكم أمتني  
سخرتني كل طاقتك، وقتك وجهدك للعناية بنا وكل همك أن نواصل طريق العلم  
صبرك كان ولا يزال خير المُلهم لي

أبي الحبيب

لم تكن الحياة حليفتك أيضا، غادرت صفوف الدراسة رُغما عنك وناضلت لكي نكمل  
ما بدأت. حُسن توجيهك مهد لنا الطُرق وأوصلنا إلى أبعد مما تصورنا أن تطوله آمالنا  
وأحلامنا، قوتك هي الشُعلة التي أبت أن تَخفت في داخلي رغم كل الصعاب والخيبات

الغائب بجسده الحاضر بروحه في قلبي دائما، من ترك فراغ لا يُسد، صاحب الأيادي  
البيضاء أخي عثمان عليك السلام والرحمة

اللذين أشد بهم أزري دائما رغم اختلاف الأهواء والمقاصد، إخوتي وأخواتي

أهدي لكم هذا البحث المتواضع



# ÍNDICE

ÍNDICE .....	1
ABREVIATURAS.....	7
Índice de figuras .....	9
Índice de tablas.....	19
RESUMEN .....	23
ABSTRACT .....	28
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	35
1. El género <i>Mentha</i> .....	37
2. <i>Mentha longifolia</i> L.: Descripción de la especie.....	40
3. Algunos usos y formas de consumo tradicionales de <i>M. longifolia</i> L.....	45
4. Composición química de <i>M. longifolia</i> L. ....	48
5. Capacidad antioxidante de <i>M. longifolia</i> L.....	52
6. Biocontrol de hongos.....	61
7. Síntesis verde de nanopartículas de plata utilizando el extracto acuoso de <i>M. longifolia</i> L.....	64
OBJETIVOS .....	69
CAPÍTULO 1: Capacidad antioxidante y análisis de compuestos fitoquímicos de <i>M. longifolia</i> L. .....	73
RESUMEN .....	73
1. INTRODUCCIÓN .....	74
2. OBJETIVOS .....	80
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	81
3.1 Material vegetal .....	81
3.2 Obtención del extracto acuoso de <i>M. longifolia</i> L. y <i>M. piperita</i> L. ....	81
3.3 Espectros UV-VIS .....	82
3.4 Test fitoquímicos .....	82
3.5 Actividad Antioxidante (DPPH).....	84
3.6 Determinación del contenido total de compuestos fenólicos .....	85
3.7 Determinación del contenido total de flavonoides.....	86
3.8 Análisis cualitativo mediante GC-TOF.....	86
3.9 Análisis estadístico .....	87
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	88
4.1 Espectro UV-VIS.....	88

4.2 Test fitoquímicos .....	92
4.3 Actividad Antioxidante (DPPH) .....	94
4.4 Determinación del contenido total de compuestos fenólicos .....	95
4.5 Determinación del contenido total de Flavonoides .....	97
4.6 Análisis cualitativo mediante GC-TOF .....	101
5. CONCLUSIONES .....	113
<b>CAPÍTULO 2: Tratamiento de aceitunas con extractos acuosos de <i>Mentha piperita</i> L. y <i>Mentha longifolia</i> L. en el control de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (<i>Gloeosporium olivarum</i>), patógeno responsable de la aceituna jabonosa. ....</b>	
RESUMEN .....	117
1. INTRODUCCIÓN .....	118
2. OBJETIVOS .....	132
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	133
3.1 El cultivo de plantas y el tratamiento inductor .....	133
3.2 Datos morfológicos .....	134
3.3 Obtención del extracto acuoso .....	134
3.4 Actividad Antioxidante (DPPH) .....	135
3.5 Determinación del contenido total de compuestos fenólicos .....	135
3.6 Determinación del contenido total de flavonoides .....	136
3.7 Análisis cualitativo de los extractos acuosos mediante GC-TOF .....	137
3.8 Cultivo de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	137
3.9 Tratamientos de aceitunas con extractos acuosos de plantas de <i>M. piperita</i> L. y <i>M. longifolia</i> L. mediante inmersión. Evaluación de los extractos acuosos en el control de <i>C. gloeosporioides</i> . ....	138
3.10 Tratamientos de aceitunas con extractos acuosos de plantas de <i>M. piperita</i> L. y <i>M. longifolia</i> L. sin contacto directo. Evaluación de compuestos orgánicos volátiles en el control de <i>C. gloeosporioides</i> . ....	139
3.11 Análisis estadístico .....	141
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	142
4.1 Tratamiento de estrés abiótico (NaCl) .....	143
4.2 Tratamiento con <i>Trichoderma harzianum</i> .....	146
4.3 Capacidad antioxidante total .....	148
4.4 Contenido de compuestos fenólicos totales .....	150
4.5 Contenido total de flavonoides .....	151
4.6 Análisis cualitativo mediante GC-TOF .....	153
4.7 Tratamientos de aceitunas con extractos acuosos de plantas de <i>M. piperita</i> L. y <i>M. longifolia</i> L. mediante inmersión. Evaluación de los extractos acuosos en el control de <i>C.</i>	

<i>gloeosporioides</i> .....	163
<b>4.8 Tratamientos de aceitunas con extractos acuosos de plantas de <i>M. piperita</i> L. y <i>M. longifolia</i> L. sin contacto directo. Evaluación de compuestos orgánicos volátiles en el control de <i>C. gloeosporioides</i>.</b> .....	171
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	180
<b>CAPÍTULO 3: Síntesis verde de nanopartículas de plata con extractos acuosos de <i>Mentha piperita</i> L. y <i>Mentha longifolia</i> L. Papel de los principales antioxidantes vegetales en la biosíntesis.</b> .....	183
<b>RESUMEN</b> .....	183
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	185
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	192
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	193
<b>3.1 Obtención del extracto acuoso.</b> .....	193
<b>3.2 Caracterización de las disoluciones de nitrato de plata.</b> .....	194
<b>3.3 Síntesis verde de nanopartículas de plata a partir de extractos de <i>Mentha longifolia</i> L. y <i>Mentha piperita</i> L.</b> .....	194
<b>3.4 Síntesis verde de nanopartículas de plata a partir de agentes reductores presentes en plantas.</b> .....	196
<b>3.5 Caracterización de las nanopartículas.</b> .....	197
3.5.1 <i>Análisis espectrofotométrico UV-Vis.</i> .....	197
3.5.2 <i>Microscopía electrónica de transmisión (TEM).</i> .....	198
3.5.3 <i>Análisis de difracción de rayos X (DRX).</i> .....	199
3.5.4 <i>Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).</i> .....	201
3.5.5 <i>Oxidación de AgNPs en presencia de cianuro.</i> .....	202
3.5.6 <i>Estimación de la concentración de nanopartículas de plata.</i> .....	202
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	204
<b>4.1 Síntesis verde de nanopartículas de plata a partir de extractos de <i>Mentha longifolia</i> L. y <i>Mentha piperita</i> L.</b> .....	204
<b>4.2 Caracterización de las nanopartículas de plata sintetizadas con los extractos acuosos de <i>M. piperita</i> L. y <i>M. longifolia</i> L.</b> .....	208
4.2.1 <i>Análisis espectroscópico UV-Vis.</i> .....	208
4.2.3 <i>Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).</i> .....	211
4.2.4 <i>Análisis FTIR (Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier).</i> .....	212
4.2.5 <i>Análisis DRX (Difracción de rayos X).</i> .....	213
<b>4.3 Estimación de la concentración de nanopartículas de plata sintetizadas con los extractos acuosos de <i>M. piperita</i> L. y <i>M. longifolia</i> L.</b> .....	216
<b>4.4 Síntesis verde de nanopartículas de plata a partir de agentes reductores presentes en</b>	

<b>plantas.</b> .....	216
<b>4.5 Caracterización de las nanopartículas de plata sintetizadas con los agentes reductores presentes en plantas.</b> .....	218
4.5.1 <i>Síntesis de nanopartículas de plata por quercetina.</i> .....	218
4.5.2 <i>Síntesis de nanopartículas de plata por <math>\beta</math>-caroteno.</i> .....	223
4.5.3 <i>Síntesis de nanopartículas de plata por ácido gálico.</i> .....	228
4.5.4 <i>Síntesis de nanopartículas de plata por ácido ascórbico</i> .....	233
4.5.5 <i>Síntesis de nanopartículas de plata por ácido 2-hidroxibenzoico.</i> .....	237
4.5.6 <i>Síntesis de nanopartículas de plata por ácido cafeico.</i> .....	240
4.5.7 <i>Síntesis de nanopartículas de plata por catequina.</i> .....	243
4.5.8 <i>Síntesis de nanopartículas de plata por escopoletina.</i> .....	248
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	252
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	257
<b>CONCLUSIONES</b> .....	267
<b>REFERENCIAS</b> .....	273

# ***ABREVIATURAS***



## ABREVIATURAS

Abs: Absorbancia.

ABTS: Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico).

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AgNO<sub>3</sub>: Nitrato de plata.

AgNPs: Nanopartículas de plata.

BHT: Hidroxitolueno butilado o dibutilhidroxitolueno.

BHA: Hidroxianisol butilado o butilhidroxianisol o butil anisol.

CAI: Centro de Apoyo a la Investigación.

CI: Concentración inhibitoria.

CN: Cianuro

DDMP: 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-pyran-4-ona

DHA: ácido deshidroascórbico.

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.

DRX: Difracción de rayos X

EC50: Concentración media máxima eficaz

EDS: Espectroscopia de rayos X de dispersión de energía.

FC: Folin-Ciocalteu.

FEMA: Flavor and Extract Manufacturers Association.

FiVe-A: Fisiología Vegetal Aplicada.

FTIR: Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier.

GAE: equivalentes de *ácido gálico*

GC-MS: Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

GC-TOF: Cromatografía de Gases con analizador del tiempo de vuelo.

GRAS: *Generally Regarded as Safe*

HDL: Lipoproteínas de alta densidad.

ICTS: Instalación Científico Tecnológica Singular.

IPBES: Plataforma Intergubernamental Científico-normativa sobre Diversidad Biológica y Servicios de los Ecosistemas.

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.

JECFA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Comité Mixto FAO-OMS de Expertos sobre Aditivos Alimentarios).

M: Molar.

ML: *Mentha longifolia* L.

MP: *Mentha piperita* L.

MIP: Manejo integrado de plagas.

MLEO: Aceite esencial de *Mentha longifolia* L.

NaCl: Cloruro sódico.

nm: nanómetro

nM: Nanomolar.

NPs: Nanopartículas.

NRP<sub>s</sub>: Péptidos no ribosomales.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PDA: Patata Dextrosa Agar.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

rpm: revoluciones por minuto.

RT: Rutina

SEM: Microscopía electrónica de barrido

SIGPAC: Sistema de Identificación Geográfica de Parcelas Agrícolas.

SPB: banda de plasmón superficial.

TEM: Microscopía electrónica de transmisión.

Trh: *Trichoderma harzianum*

TRPM: Receptores de Potencial Transitorio.

UV-Vis: Ultravioleta visible.

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Detalle de planta, hojas y flores de <i>Mentha longifolia</i> L.	42
<b>Figura 2.</b> Área de distribución geográfica de <i>M. longifolia</i> L. en el mundo y en Arabia Saudita.	43
<b>Figura 3.</b> Detalle de tallo, hojas y flores de <i>M. piperita</i> L.	78
<b>Figura 4.</b> Área de distribución de <i>M. piperita</i> L. en el mundo y en España	79
<b>Figura 5:</b> Espectro UV-Visible de los extractos acuosos. a) <i>Mentha piperita</i> L. b) <i>Mentha longifolia</i> L	89
<b>Figura 6.</b> Flavonoides. a) Estructura básica de flavonoides que muestra los anillos A, B y C. b) Bandas características de los flavonoides.	91
<b>Figura 7.</b> Capacidad antioxidante medida con el ensayo DPPH en plantas de una y dos semanas de edad de <i>M. piperita</i> L. (MP) y <i>M. longifolia</i> L. (ML).	94
<b>Figura 8.</b> Contenido de fenoles totales calculado mediante el ensayo Folin-Ciocalteu plantas de <i>M. piperita</i> L. (MP) y <i>M. longifolia</i> L. (ML) de dos semanas de edad.	96
<b>Figura 9.</b> Contenido de flavonoides en plantas de <i>M. piperita</i> (MP) y <i>M. longifolia</i> (ML).	100
<b>Figura 10.</b> Estructura química del fenilacetaldéido.	104
<b>Figura 11.</b> Estructura química de la mentofuranona.	105
<b>Figura 12.</b> Estructura química de la 3,5-dihidroxi-6-metil-2,3-dihidro-4H-piranona.	106
<b>Figura 13.</b> Estructura química del metilformiato.	107
<b>Figura 14.</b> Estructura química del mentofurano.	108
<b>Figura 15.</b> Estructura química de la 2-pirrolidiona.	109
<b>Figura 16.</b> Estructura química del o-acetil-p-cresol.	110
<b>Figura 17.</b> Estructura química del glicerol.	111
<b>Figura 18.</b> Estructura química del dietil ftalato.	112
<b>Figura 19.</b> Protocolo de preparación de los extractos acuosos.	134

<b>Figura 20.</b> Protocolo de inoculación de <i>C. gloeosporioides</i> sobre aceitunas en el tratamiento de contacto directo (inmersión) con el extracto acuoso de <i>M. longifolia</i> L.	139
<b>Figura 21.</b> Protocolo de inoculación de <i>C. gloeosporioides</i> sobre aceitunas en el tratamiento con compuestos orgánicos volátiles del extracto acuoso de <i>M. longifolia</i> L.	140
<b>Figura 22.</b> Representación de la incubación de los botes con aceitunas inoculados con <i>C. gloeosporioides</i> en el tratamiento con compuestos orgánicos volátiles del extracto acuoso de <i>M. longifolia</i> L. y <i>M. piperita</i> L.	141
<b>Figura 23.</b> Longitud de la raíz principal de plantas de <i>M. piperita</i> L. (MP) y <i>M. longifolia</i> L. (ML) de una semana de edad.	142
<b>Figura 24.</b> Longitud del tallo y número de hojas de plantas de <i>M. piperita</i> L. (MP) y <i>M. longifolia</i> L. (ML) de dos semanas de edad.	143
<b>Figura 25.</b> Longitud del tallo, longitud de la raíz principal y número de hojas de plantas de <i>M. piperita</i> L. (MP) y <i>M. longifolia</i> L. (ML) de una semana de edad, sometidas a tratamiento con NaCl y plantas control (C). A) Detalle de hoja seca de planta de <i>M. longifolia</i> L. sometida a tratamiento con NaCl, B) Detalle de planta de <i>M. piperita</i> L. sometida a tratamiento con NaCl.	145
<b>Figura 26.</b> Longitud del tallo, longitud de la raíz principal y número de hojas de plantas de <i>M. piperita</i> L. (MP) y <i>M. longifolia</i> L. (ML) de dos semanas de edad, sometidas a tratamiento con <i>Trichoderma harzianum</i> (Trh) y plantas control (C). A) Plantas de <i>M. longifolia</i> L. en tratamiento con <i>T. harzianum</i> ; B) Detalle de sistema radical de planta de <i>M. longifolia</i> L. en tratamiento con <i>T. harzianum</i> .	147
<b>Figura 27.</b> Capacidad antioxidante medida con el ensayo DPPH en plantas control y tratadas con NaCl y <i>Trichoderma harzianum</i> (Trh) de <i>M. piperita</i> L. (MP) y <i>M. longifolia</i> L. (ML).	149
<b>Figura 28.</b> Contenido de fenoles totales calculado mediante el ensayo Folin-Ciocalteu plantas control (C) y tratadas con NaCl y <i>Trichoderma harzianum</i> (Trh) de <i>M. piperita</i> L. (MP) y <i>M. longifolia</i> L. (ML).	150

<b>Figura 29.</b> Contenido de flavonoides en plantas control (C) y tratadas con NaCl y <i>Trichoderma harzianum</i> (Trh) de <i>M. piperita</i> L. (MP) y <i>M. longifolia</i> L. (ML).	152
<b>Figura 30.</b> Infusiones de <i>M. piperita</i> L. (MP) y <i>M. longifolia</i> L. (ML).	164
<b>Figura 31.</b> Aceitunas recolectadas del árbol y puestas en frascos meli con las infusiones de <i>M. piperita</i> L. (MP) y <i>M. longifolia</i> L. (ML) y control con agua e inóculo del patógeno <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .	164
<b>Figura 32.</b> Porcentaje de aceitunas con afectación morfológica de las sometidas a diferentes infusiones ( <i>M. piperita</i> L. (MP); <i>M. longifolia</i> L. (ML) y control con agua.	165
<b>Figura 33.</b> Aceitunas sometidas a diferentes tratamientos con infusiones del género <i>Mentha</i> e inóculo del patógeno <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> tras cuatro semanas: A) se observa la pérdida de coloración, especialmente en los tratamientos control y <i>M. piperita</i> L.; B) Aceitunas del tratamiento control donde se aprecian manchas blancas; C) Aceitunas del tratamiento con la infusión de <i>M. longifolia</i> L.	166
<b>Figura 34.</b> Porcentaje de aceitunas con micelio fúngico de las sometidas a diferentes infusiones ( <i>M. piperita</i> L. (MP); <i>M. longifolia</i> L. (ML) y control con agua.	167
<b>Figura 35.</b> Aspecto de las aceitunas de los diferentes tratamientos con las infusiones de plantas del género <i>Mentha</i> e inóculo del patógeno <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> después de una semana post-tratamiento: A) tratamiento control con agua, B) tratamiento con <i>M. piperita</i> L. y C) tratamiento con <i>M. longifolia</i> L.	168
<b>Figura 36.</b> A) Placas de PDA inoculadas con 1 ml de infusión de diferentes especies de <i>Mentha</i> (M.L: <i>M. longifolia</i> ; M.P: <i>M. piperita</i> ) y el control con agua, después del tratamiento de un mes con aceitunas e inóculo del patógeno <i>Colletotrichum gloeosporoides</i> . B y C) detalle del anverso de dos de las placas en los que se aprecia el color característico del micelio de <i>C. gloeosporioides</i> .	169

<b>Figura 37.</b> Aceite de oliva obtenido de aceitunas tratadas con infusión de <i>M. longifolia</i> L. e inoculación con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> durante cuatro semanas.	170
<b>Figura 38.</b> Botes Meli con las infusiones filtroesterilizadas y tres discos micelares del hongo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , y nueve aceitunas encima de una rejilla de plástico.	171
<b>Figura 39.</b> Aceitunas inoculadas con <i>C. gloeosporioides</i> y sometidas a tratamiento con compuestos orgánicos volátiles del extracto acuoso (Té) de <i>M. piperita</i> L. a) tratamiento control; b) plantas tratadas con <i>T. harzianum</i> y c) plantas tratadas con NaCl, tras una semana de tratamiento.	172
<b>Figura 40.</b> Aceitunas inoculadas con <i>C. gloeosporioides</i> y sometidas a tratamiento con compuestos orgánicos volátiles del extracto acuoso (Té) de <i>M. longifolia</i> L.: a) tratamiento control; b) plantas tratadas con <i>T. harzianum</i> y c) plantas tratadas con NaCl, tras una semana de tratamiento.	172
<b>Figura 41.</b> Aceitunas inoculadas con <i>C. gloeosporioides</i> y sometidas a tratamiento con compuestos orgánicos volátiles del extracto acuoso (Té) de <i>M. piperita</i> L. de plantas sin tratamiento de elicitación, tras un mes de tratamiento.	173
<b>Figura 42.</b> Aceitunas inoculadas con <i>C. gloeosporioides</i> y sometidas a tratamiento con compuestos orgánicos volátiles del extracto acuoso (Té) de <i>M. piperita</i> L.(a) y <i>M. longifolia</i> L. (b). Se incluyen los tratamientos control; plantas tratadas con <i>T. harzianum</i> y plantas tratadas con NaCl. Tras cuatro meses de tratamiento.	174
<b>Figura 43.</b> Aspecto de las aceitunas de los diferentes tratamientos con las infusiones de plantas del género <i>Mentha</i> e inóculo del patógeno <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> después de cuatro meses post-tratamiento.: <i>M. piperita</i> L. (MP); <i>M. longifolia</i> L. (ML); Trichoderma: plantas elicidadas con <i>T. harzianum</i> ; NaCl: plantas elicidadas con NaCl.	175
<b>Figura 44.</b> a) Placas de PDA con un fragmento de aceituna después del tratamiento con los volátiles de infusiones de <i>M. longifolia</i> L. (ML), de tratamientos control, <i>T. harzianum</i> y NaCl en planta, y el patógeno	177

<p><i>Colletotrichum gloeosporioides</i>. b) Placas de PDA con un fragmento de aceituna después del tratamiento con los volátiles de infusiones de <i>M. piperita</i> L. (MP), de tratamientos control, <i>T. harzianum</i> y NaCl en planta, y el patógeno <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>. c) Placas de PDA con un fragmento de aceituna después del tratamiento con los volátiles de infusiones de <i>M. longifolia</i> L. (ML), de tratamientos control y <i>T. harzianum</i> en planta, y el patógeno <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>. d) Placas de PDA con un fragmento de aceituna después del tratamiento con los volátiles de infusiones de <i>M. longifolia</i> L. (ML) y <i>M. piperita</i> L. (MP) de tratamientos con <i>T. harzianum</i> en planta, y el patógeno <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>.</p>	
<p><b>Figura 45.</b> Antioxidantes naturales no enzimáticos presentes en plantas y utilizados en esta tesis doctoral.</p>	191
<p><b>Figura 46.</b> Proceso de obtención de extractos vegetales a partir de hojas de <i>Mentha sp.</i></p>	193
<p><b>Figura 47.</b> Proceso de síntesis verde de nanopartículas metálicas a partir de un extracto vegetal de hojas de <i>Mentha sp.</i> utilizando nitrato de plata como precursor.</p>	195
<p><b>Figura 48.</b> Extractos acuosos y hojas secas de a) <i>Mentha longifolia</i> L. y b) <i>Mentha piperita</i> L.</p>	204
<p><b>Figura 49.</b> Extractos acuosos de <i>Mentha piperita</i> L. y <i>M. longifolia</i> L. con nitrato de plata, a diferentes concentraciones (de izquierda a derecha: 0, 1, 5, 10, 100 y 200 mM). (a) a tiempo 0; (b) a 1 hora; (c) a 24 horas y (d) a 1 semana.</p>	206
<p><b>Figura 50.</b> Nanopartículas de plata obtenidas por síntesis verde a partir de extracto acuoso de hoja de a) <i>Mentha piperita</i> L. y b) <i>Mentha longifolia</i> L. con nitrato de plata a diferentes concentraciones tras ser retiradas de los tubos de ensayo (de izquierda a derecha: 200, 100, 10, 5, 1 y 0 mM).</p>	207
<p><b>Figura 51.</b> Espectro UV-Visible del nitrato de plata (a) y las nanopartículas de plata en suspensión formadas por la reacción del extracto acuoso de (b) <i>Mentha piperita</i> L. y (c) <i>Mentha longifolia</i> L. con nitrato de plata a concentración 100 mM.</p>	210

<p><b>Figura 52.</b> Análisis de nanopartículas de plata sintetizadas a partir del extracto acuoso de <i>Mentha piperita</i> L. A) Micrografía de TEM de nanopartículas de plata antes del tratamiento con cianuro. B) EDS (espectroscopia de rayos X de dispersión de energía) de las AgNPs. C) y D) micrografías de TEM de nanopartículas de plata después del tratamiento con cianuro. E) Perfil DRX de las AgNPs obtenidas por la reacción del extracto acuoso de <i>Mentha piperita</i> L. con AgNO<sub>3</sub>.</p>	214
<p><b>Figura 53.</b> Análisis de nanopartículas de plata sintetizadas a partir del extracto acuoso de <i>Mentha longifolia</i> L. A) Micrografía de TEM de nanopartículas de plata antes del tratamiento con cianuro. B) EDS (espectroscopia de rayos X de dispersión de energía) de las AgNPs. C) y D) micrografías de TEM de nanopartículas de plata después del tratamiento con cianuro. E) Perfil DRX de las AgNPs obtenidas por la reacción del extracto acuoso de <i>Mentha longifolia</i> L. con AgNO<sub>3</sub>.</p>	215
<p><b>Figura 54.</b> Cambio de color tras la adición de diferentes antioxidantes de origen vegetal a una solución de nitrato de plata 2 M. (A) Inicio (tiempo 0); (B) después de 5 h de incubación a 40 °C en la oscuridad. Los números identifican los diferentes antioxidantes utilizados: 1 = quercetina; 2 = β-caroteno; 3 = ácido gálico; 4 = ácido ascórbico; 5 = ácido hidroxibenzoico; 6 = ácido cafeico; 7 = catequina; 8 = escopoletina; y 9 = control (sin antioxidante añadido).</p>	217
<p><b>Figura 55.</b> Análisis de nanopartículas de plata sintetizadas por quercetina (AgNP). (A-C) imágenes de AgNP obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM). (A) Estructuras parecidas a micelas. (B) Detalle de estructura micelar. (C) Detalle de vesículas ubicadas entre las nanopartículas de plata. (D-F) Imágenes TEM de AgNP después de la adición de cianuro. (D) estructura en forma de varilla. (E) Detalle de filamento que muestra la agregación de las nanopartículas. (F) Detalle de estructuras en forma de varillas con su tamaño diámetro y comparación con el tamaño de las nanopartículas. (G) Espectro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) de nanopartículas derivadas de quercetina. (H) Espectro FTIR de quercetina. (I) Espectros de AgNP visibles en ultravioleta (UV)</p>	222

preparados con quercetina y  $\text{AgNO}_3$  antes (línea azul) y después (línea naranja) de la adición de cianuro. (J) Perfil de difracción de rayos X (DRX) de AgNPs obtenido por reacción de quercetina con  $\text{AgNO}_3$  (se ha insertado una tabla de identificación). Los picos que identifican la presencia de óxidos de plata se han indicado en el difractograma DRX.

**Figura 56.** Análisis de las nanopartículas de plata sintetizadas con  $\beta$ -caroteno. (A-D) imágenes de AgNP obtenidas por TEM. (A,B) Nanopartícula triangular bajo dos ángulos de iluminación, que permite observar su volumen. (C) Formas poliédricas (indicadas por la flecha hueca) y formas triangulares con vértices truncados (indicadas por la flecha negra). (D) AgNP poliédricos amorfos después del tratamiento con cianuro. (E) Espectro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) de nanopartículas derivadas de  $\beta$ -caroteno. (F) Espectro FTIR de  $\beta$ -caroteno. (G) Espectros de AgNP visibles en ultravioleta (UV) preparados con  $\beta$ -caroteno y  $\text{AgNO}_3$  antes (línea negra) y después (línea gris) de la adición de cianuro. (H) Perfiles de difracción de rayos X (DRX) de las AgNP obtenidas por la reacción de  $\beta$ -caroteno con  $\text{AgNO}_3$ ; en el recuadro, la tabla con las identificaciones. Los picos que identifican la presencia de óxidos de plata se han indicado en el difractograma DRX.

227

**Figura 57.** Análisis de nanopartículas de plata sintetizadas con ácido gálico. (A) Imagen TEM de AgNP. (B, C) Imágenes TEM de AgNP después del tratamiento con cianuro. (B) Agregación de nanopartículas antes de la Figura C. (D) Síntesis de nanopartículas de plata por reacción de diferentes  $\text{AgNO}_3$  concentraciones con ácido gálico durante 5 h (en intervalos de una hora). (E,F) Espectros FTIR de nanopartículas derivadas del ácido gálico (E) y ácido gálico (F). (G) Aumento relativo de DO después de la adición de cianuro a nanopartículas de plata. (H) Difractograma DRX de los AgNPs obtenidos por reacción del ácido gálico con  $\text{AgNO}_3$ ; en el recuadro, la tabla con las identificaciones. Los picos que identifican la presencia de óxidos de plata se han indicado en el difractograma DRX.

232

**Figura 58.** Análisis de nanopartículas de plata sintetizadas con ácido ascórbico. (A) Imagen TEM de AgNP. (B) imagen de AgNP después del tratamiento con cianuro. (C-E) Síntesis de nanopartículas de plata por reacción de diferentes concentraciones de  $\text{AgNO}_3$  con ácido ascórbico durante 5 h (en intervalos de una hora). (C) Máximo a una longitud de onda de 402 nm (nanopartículas de 20 nm de diámetro). (D) Máximo a una longitud de onda de 421 nm (nanopartículas de 50 nm de diámetro). (E) Máximo a una longitud de onda de 467 nm (nanopartículas de 80 nm de diámetro). (F) disminución de la DO después de la adición de cianuro a nanopartículas de plata. (G) Espectro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) de nanopartículas derivadas del ácido ascórbico. (H) Espectro FTIR del ácido ascórbico. (I) Reacción redox del ácido ascórbico al ácido deshidroascórbico y efecto de la adición de cianuro. (J) Difractograma DRX de los AgNPs obtenidos por reacción del ácido ascórbico con  $\text{AgNO}_3$ ; en el recuadro, la tabla con las identificaciones. Los picos que identifican la presencia de óxidos de plata se han indicado en el difractograma DRX.

**Figura 59.** Análisis de nanopartículas de plata sintetizadas con ácido hidroxibenzoico. (A) Imagen TEM de las AgNP antes del tratamiento con cianuro. (B) imagen de AgNP después del tratamiento con cianuro. (C,D) Síntesis de nanopartículas de plata por reacción de diferentes  $\text{AgNO}_3$  concentraciones con ácido hidroxibenzoico durante 5 h (en intervalos de una hora). (C) Máximo a una longitud de onda de 421 nm (nanopartículas de 50 nm de diámetro). (D) Máximo a una longitud de onda de 467 nm (nanopartículas de 80 nm de diámetro). (E) Espectro FTIR de nanopartículas derivadas del ácido hidroxibenzoico. (F) Espectro FTIR del ácido hidroxibenzoico. (G) Reducción relativa de la DO después de la adición de cianuro a nanopartículas de plata. (H): Perfil DRX de los AgNP obtenidos por la reacción del ácido hidroxibenzoico con  $\text{AgNO}_3$ ; en el recuadro, la tabla con las identificaciones. Los picos que identifican la presencia de óxidos de plata se han indicado en el difractograma DRX.

<p><b>Figura 60.</b> Análisis de nanopartículas de plata sintetizadas con ácido cafeico. (A) Imagen TEM de los AgNP antes del tratamiento con cianuro. (B) Imagen TEM de los AgNP después del tratamiento con cianuro. (C,D) Esquema 3. Concentraciones con ácido cafeico durante 5 h (en intervalos de una hora). C: máximo a una longitud de onda de 421 nm (nanopartículas de 50 nm de diámetro). (D) máximo a una longitud de onda de 467 nm (nanopartículas de 80 nm de diámetro). (E,F) Espectros FTIR de nanopartículas derivadas del ácido cafeico (E) y ácido cafeico (F). (G) Disminución de la DO después de la adición de cianuro a nanopartículas de plata. (H) Perfil DRX de los AgNP obtenidos por la reacción del ácido cafeico con AgNO<sub>3</sub>; en el recuadro, la tabla con las identificaciones. Los picos que identifican la presencia de óxidos de plata se han indicado en el difractograma DRX.</p>	242
<p><b>Figura 61.</b> Análisis de nanopartículas de plata sintetizadas por catequinas. (A) Imagen TEM de las AgNP pentagonales (flecha sólida) y poliédricas (flecha hueca) antes del tratamiento con cianuro. (B) Imagen TEM de los AgNP después del tratamiento con cianuro. (C-E) Síntesis de nanopartículas de plata por reacción de AgNO<sub>3</sub> con diferentes concentraciones con catequina durante 5 h (en intervalos de una hora). (C) Máximo a una longitud de onda de 402 nm (nanopartículas de 20 nm de diámetro); (D) 421 nm (nanopartículas de 50 nm de diámetro) y (E) máximo a una longitud de onda de 467 nm (nanopartículas de 80 nm de diámetro). (F) Aumento relativo de DO después de la adición de cianuro a nanopartículas de plata. (G,H) Espectros FTIR de nanopartículas derivadas de catequinas (G) y catequina (H). (I) Reacción de síntesis de nanopartículas de plata con catequina mediada por formación de semiquinonas y quinonas. (J) Perfil DRX de las AgNP obtenidas por la reacción de la catequina con AgNO<sub>3</sub>; en el recuadro, la tabla con las identificaciones. Los picos que identifican la presencia de óxidos de plata se han indicado en el difractograma DRX.</p>	247
<p><b>Figura 62.</b> Análisis de las nanopartículas de plata sintetizadas con escopoletina. (A) Imagen TEM de las AgNP antes del tratamiento con</p>	250

cianuro. (B) Imagen TEM de las AgNP después del tratamiento con cianuro. (C) Síntesis de nanopartículas de plata por reacción de diferentes  $\text{AgNO}_3$  concentraciones con escopoletina durante 5 h (en intervalos de una hora). Máximo a 440 nm de longitud de onda (nanopartículas de 70 nm de diámetro). (D) Detalle de agregación de nanopartículas, con forma *cookie-like*. (E,F) Espectros FTIR de nanopartículas derivadas de escopoletina (E) y escopoletina (F). (G) Disminución de la DO después de la adición de cianuro a nanopartículas de plata. (H) Perfil RXD de AgNPs obtenido por reacción de escopoletina con  $\text{AgNO}_3$ ; en el recadro, la tabla con las identificaciones. Los picos que identifican la presencia de óxidos de plata se han indicado en el difractograma DRX.

**Figura 63.** Objetivos generales de la estrategia “de la granja a la mesa”

257

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Resumen de las distintas especies del género <i>Mentha</i> .	39
<b>Tabla 2.</b> Subespecies de <i>Mentha longifolia</i> L. y la región donde se ha datado.	44
<b>Tabla 3.</b> Beneficios para la salud de <i>M. longifolia</i> L.	48
<b>Tabla 4.</b> Resumen de datos disponibles sobre la composición química de <i>Mentha longifolia</i> L.: Origen geográfico de las muestras y componentes mayoritarios.	50
<b>Tabla 5.</b> Test para la determinación de la presencia de fitoquímicos en los extractos acuosos de <i>M. longifolia</i> L. y <i>M. piperita</i> L.	83
<b>Tabla 6.</b> Análisis cualitativo de extractos de metanol al 80% de hojas de <i>Mentha piperita</i> L. y <i>Mentha longifolia</i> L.	93
<b>Tabla 7.</b> Compuestos identificados en <i>M. piperita</i> L. y <i>M. longifolia</i> L. mediante cromatografía de gases bidimensional de tiempo de vuelo GC-TOF.	102
<b>Tabla 8.</b> Susceptibilidad de las variedades de olivo a la antracnosis.	123
<b>Tabla 9.</b> Metabolitos secundarios en diferentes especies vegetales que alteran su cantidad por tratamiento con cloruro sódico.	131
<b>Tabla 10.</b> Análisis cualitativo mediante GC-TOF, del extracto acuoso de plantas control (C) y tratadas con NaCl y <i>Trichoderma harzianum</i> (Trh) de <i>M. piperita</i> L. (MP) y <i>M. longifolia</i> L. (ML).	153
<b>Tabla 11.</b> Análisis de algunos de los compuestos detectados mediante el análisis GC-TOF de plantas tratadas y no en plantas control, o que fueron detectados en un alto porcentaje en ambas, o solo en una de las plantas que fueron sometidas a tratamiento de estrés biótico o abiótico.	157
<b>Tabla 12.</b> Preparación de las diferentes concentraciones de sales metálicas para la síntesis de nanopartículas de plata con extracto acuoso de <i>Mentha sp.</i>	195

<p><b>Tabla 13.</b> Concentración (nM) de nanopartículas de diferentes tamaños (20, 50, 70 y 80 nm), sintetizadas por diversos antioxidantes (ácido gálico, ácido ascórbico, ácido hidroxibenzoico, ácido cafeico, catequina y escopoletina). Las concentraciones se calcularon a partir de la Ley de Beer-Lambert (según Paramelle <i>et al.</i> 2013). Teórico: concentración molar teórica, asumiendo la conversión total de iones de plata en nanopartículas de plata</p>	<p>229</p>
---	------------

# ***RESUMEN***



## RESUMEN

### ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE *Mentha longifolia* L. Y SUS APLICACIONES.

#### Introducción

*Mentha longifolia* L. tiene una amplia distribución geográfica que puede considerarse un signo de adaptabilidad que se refleja en la existencia de diferentes quimiotipos. Además de sus usos tradicionales se podrían explorar otras alternativas.

#### Objetivos y resultados

El material vegetal es un quimiotipo de *M. longifolia* L. de Arabia Saudita y el objetivo principal es analizar sus posibles usos alternativos.

Para alcanzar este objetivo se va a analizar la capacidad antioxidante del extracto acuoso (Té) de *M. longifolia* L. Además, se realizará el análisis de su composición fitoquímica para identificar los diferentes metabolitos implicados en su capacidad antioxidante.

Entre los objetivos parciales se encuentran:

- Incrementar la concentración de algunos fitoquímicos mediante la elicitación tanto biótica como abiótica en el cultivo de las plantas de *M. longifolia* L.
- Estudiar el posible uso del té de *M. longifolia* L. en el control biológico del hongo fitopatógeno responsable de la antracnosis del olivo, *C.*

*gloesporioides*.

- Estudiar el posible uso del té de *M. longifolia* L. en la síntesis verde de nanopartículas de plata.

Con el fin de alcanzar estos objetivos, la tesis doctoral se estructura en tres capítulos.

En el Capítulo 1 se ha analizado la capacidad antioxidante de *Mentha longifolia* L. y se ha realizado un análisis de los diferentes componentes que podrían estar implicados en la misma. Todos los resultados se han analizado de forma comparativa con otra especie de menta, *M. piperita* L.

La muestra de *M. longifolia* L. mostró menor capacidad antioxidante que la muestra de *M. piperita* L. Se realizó un análisis preliminar de componentes mediante el espectro UV-Vis y diversos test fitoquímicos, detectándose la presencia de compuestos fenólicos y, en concreto, de flavonoides. El contenido en compuestos fenólicos de la muestra de *M. longifolia* L. fue inferior al detectado en la muestra de *M. piperita* L. Sin embargo, sí se valoró una mayor cantidad de flavonoides. El análisis mediante GC-MS mostró una mayor presencia de 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-pyran-4-ona (DDMP), fenilacetaldehído y mentofuranona. El DDMP estaría implicado en la capacidad antioxidante, mientras que la mentofuranona y el fenilacetaldehído tendrían actividades antifúngicas.

A partir de estos resultados se han establecido dos hipótesis para los posibles usos del té de *M. longifolia* L.: el control de fitopatógenos y la síntesis de nanopartículas.

En el Capítulo 2 se ha estudiado el control de fitopatógenos mediante el

análisis del efecto del extracto acuoso de *M. longifolia* L. contra la antracnosis del olivo, (la enfermedad más importante que afecta a la aceituna), provocada por *C. gloeosporioides*.

La efectividad de los tratamientos de control de patógenos depende fundamentalmente de los metabolitos presentes en los extractos y la elicitación permite incrementar su concentración. Se llevó a cabo la elicitación de la producción de metabolitos secundarios en las plantas de *M. longifolia* L. y *M. piperita* L. mediante dos tipos de elicitores: abiótico (NaCl) y biótico (*Trichoderma harzianum*). Los síntomas de la enfermedad se redujeron cuando las aceitunas se sumergieron en el té, pero los resultados más prometedores se han logrado mediante el tratamiento con los volátiles del té de plantas de *M. longifolia* L. que habían sido sometidas al tratamiento de elicitación biótico con *T. harzianum*. Se han detectado 13 componentes en este extracto acuoso mediante el análisis de GC-MS. Los mayoritarios fueron p- cymen-2-ol, 1.2 epoxy-p-menthan-3-one, 2-pinen-4-one y mento furanona. Los resultados apoyan el potencial uso de este té como método de biocontrol del patógeno responsable de la antracnosis del olivo en postcosecha.

En el Capítulo 3 se analiza la síntesis verde de nanopartículas de plata mediante el extracto acuoso de *M. longifolia* L. La síntesis verde de nanopartículas metálicas se produce por reducción de la sal del metal correspondiente y depende del extracto utilizado, ya que serán formadas y estabilizadas por diferentes compuestos presentes en dicho extracto.

Las nanopartículas de plata (AgNPs) sintetizadas con el extracto de *M. longifolia* L. tienen forma ovalada-esférica, con un tamaño medio de 42 nm en una concentración 3.61 nM. La diferencia en los metabolitos del extracto

asociados a las nanopartículas con respecto a las nanopartículas sintetizadas con *M. piperita* L. se ha determinado mediante FTIR por la presencia de  $\text{CH}_2$  adsorbido. La reactividad de las nanopartículas con cianuro (CN) se visualiza en las imágenes de TEM por la presencia de estructuras con forma de hoja de helecho y filamentos. Las AgNps sintetizadas con el extracto de *M. piperita* L. tienen forma ovalada-semiesférica, con un tamaño medio de 27 nm en una concentración 3.85 nM. La reactividad de las nanopartículas con CN se visualiza en las imágenes de TEM por la presencia de estructuras espinosas tridimensionales.

Para determinar los metabolitos de los extractos acuosos que han participado en la síntesis de las AgNPs, se ha comprobado que los principales antioxidantes presentes en los extractos de plantas (quercetina,  $\beta$ -caroteno, ácido gálico, ácido ascórbico, ácido hidroxibenzoico, ácido cafeico, catequina y escopoletina) son capaces de sintetizar nanopartículas de plata cuando reaccionan con una solución de  $\text{AgNO}_3$ . Las nanopartículas sintetizadas con los ácidos ascórbico, hidroxibenzoico, cafeico y gálico y escopoletina son esféricas. Las nanopartículas sintetizadas con quercetina se agrupan para formar estructuras micelares. Las nanopartículas sintetizadas por  $\beta$ -caroteno, presentan formas triangulares y poliédricas con esquinas truncadas. Se sintetizaron nanopartículas pentagonales con catequina. La FTIR ha mostrado que las biomoléculas recubren las nanopartículas de plata sintetizadas. El DRX mostró la presencia de plata, AgO,  $\text{Ag}_2\text{O}$ ,  $\text{Ag}_3\text{O}_4$  y  $\text{Ag}_2\text{O}_3$ . Como consecuencia de la reactividad de las nanopartículas de plata con el cianuro se obtuvieron estructuras en forma de varilla con quercetina y ácido gálico y estructuras *cookie-like* en las nanopartículas obtenidas con escopoletina.

## Conclusiones

En conclusión, el extracto acuoso de *M. longifolia* L. posee una composición química en metabolitos secundarios que puede además incrementarse mediante la elicitación con *T. harzianum* lo que favorece su uso como agente antifúngico. La eficacia de los volátiles de *M. longifolia* L. ha sido demostrada contra *C. gloeosporioides*. Además, se ha demostrado otro posible uso alternativo a los tradicionales para *M. longifolia* L., la síntesis verde de nanopartículas metálicas.

## ABSTRACT

### Introduction

*Mentha longifolia* L. has a wide geographic distribution that can be considered a sign of adaptability that is reflected in the existence of different hemotypes. In addition to its traditional uses, other alternative uses could be explored.

### Objectives and results

The plant material is a chemotype of *M. longifolia* L. from Saudi Arabia and the main objective is to analyze its possible alternative uses.

To achieve this objective, the antioxidant capacity of the aqueous extract (Tea) of *M. longifolia* L. will be analyzed. In addition, its phytochemical composition will be analyzed to identify the different metabolites involved in its antioxidant capacity.

Among the partial objectives of the work are:

- Increase the concentration of some phytochemicals through both biotic and abiotic elicitation in the cultivation of *M. longifolia* L. plants.
- Study the possible use of *M. longifolia* L. tea in the biological control of the phytopathogenic fungus responsible for the anthracnose of the olive tree, *C. gloesporioides*.
- Study the possible use of *M. longifolia* L. tea in the green synthesis of silver nanoparticles.

In order to achieve these objectives, this doctoral Thesis is divided into three chapters.

In Chapter 1 the antioxidant capacity of *Mentha longifolia* L. has been analyzed and an analysis of the different components that could be involved in it has been carried out. All the results have been analyzed comparatively with another species of mint, *M. piperita* L.

The *M. longifolia* L. sample showed lower antioxidant capacity than the *M. piperita* L. sample. A preliminary analysis of components was carried out using the UV-Vis spectrum and various phytochemical tests, detecting the presence of phenolic compounds and, specifically, of flavonoids. The content of phenolic compounds in the *M. longifolia* L. sample was lower than that detected in the *M. piperita* L. sample, however, a higher amount of flavonoids was assessed. GC-MS analysis showed a higher presence of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (DDMP), phenylacetaldehyde and mentofuranone. DDMP would be involved in antioxidant capacity, while mentofuranone and phenylacetaldehyde would have antifungal activities.

From these results, two hypotheses have been established for the possible uses of *M. longifolia* L. tea: the control of phytopathogens and the synthesis of nanoparticles.

In Chapter 2 the control of phytopathogens was studied by analyzing the effect of the aqueous extract of *M. longifolia* L. against anthracnose of the olive tree, (the most important disease that affects olives), caused by *C. gloeosporioides*.

The effectiveness of pathogen control treatments depends fundamentally on the metabolites present in the extracts and elicitation allows to increase their concentration. The elicitation of the production of secondary metabolites was carried out in the plants of *M. longifolia* L. and *M. piperita* L. by means of two types of elicitors: abiotic (NaCl) and biotic (*Trichoderma harzianum*). Symptoms of the disease were reduced when olives were soaked in tea but the most promising results have been achieved by treatment with the volatiles of tea from *M. longifolia* L. plants that had undergone biotic elicitation treatment with *T. harzianum*. 13 components have been detected in this aqueous extract by GC-MS analysis. The majority were p-cymen-2-ol, 1,2 epoxy-p-menthan-3-one, 2-pinen-4-one and mentho furanone. The results support the potential use of this tea as a method of biocontrol of the pathogen responsible for postharvest olive anthracnose.

In Chapter 3 the green synthesis of silver nanoparticles is analyzed by means of the aqueous extract of *M. longifolia* L. The green synthesis of metallic nanoparticles by reduction of the corresponding metal salt depends on the extract used, since they will be formed and stabilized by different compounds present in said extract.

The AgNPs synthesized with the extract of *M. longifolia* L. have an oval-spherical shape, with a mean size of 42 nm at a concentration of 3.61 nM. The difference in the metabolites of the extract associated with the nanoparticles with respect to the nanoparticles synthesized with *M. piperita* L. has been determined by FTIR by the presence of adsorbed CH<sub>2</sub>. The reactivity of the nanoparticles with CN is visualized in the TEM images by the presence of fern-leaf-shaped structures and filaments. The AgNps synthesized with the *M. piperita* L. extract have an oval-hemispherical shape, with a mean size of

27 nm at a 3.85 nM concentration. The reactivity of the nanoparticles with CN is visualized in the TEM images by the presence of three-dimensional spiny structures.

To determine the metabolites of the aqueous extracts that have participated in the synthesis of AgNPs, it has been found that the main antioxidants present in plant extracts (quercetin,  $\beta$ -carotene, gallic acid, ascorbic acid, hydroxybenzoic acid, caffeic acid, catechin and scopoletin) are capable of synthesizing silver nanoparticles when they react with a solution of  $\text{AgNO}_3$ . The nanoparticles synthesized with ascorbic, hydroxybenzoic, caffeic and gallic acids and scopoletin are spherical. Quercetin-synthesized nanoparticles clump together to form micellar structures. Nanoparticles synthesized by  $\beta$ -carotene, present triangular and polyhedral shapes with truncated corners. Pentagonal nanoparticles were synthesized with catechin. FTIR has shown that biomolecules coat the synthesized silver nanoparticles. The XRD showed the presence of silver,  $\text{AgO}$ ,  $\text{Ag}_2\text{O}$ ,  $\text{Ag}_3\text{O}_4$  and  $\text{Ag}_2\text{O}_3$ . As a consequence of the reactivity of the silver nanoparticles with cyanide, rod-shaped structures were obtained with quercetin and gallic acid and cookie-like structures in the nanoparticles obtained with scopoletin.

## **Conclusions**

In conclusion, the aqueous extract of *M. longifolia* L. has a chemical composition in secondary metabolites that can also be increased by elicitation with *T. harzianum*, which favors its use as an antifungal agent. The efficacy of the volatiles of *M. longifolia* L. has been demonstrated against *C. gloeosporioides*. In addition, another possible alternative use to the traditional ones has been demonstrated for *M. longifolia* L., the green synthesis of metallic nanoparticles.



# ***INTRODUCCIÓN GENERAL***



## INTRODUCCIÓN GENERAL

La IPBES (Plataforma Intergubernamental Científico-normativa sobre Diversidad Biológica y Servicios de los Ecosistemas), en su informe plenario de 2018, señala que *“La degradación de la superficie terrestre a causa de las actividades humanas afecta negativamente al bienestar de al menos 3.200 millones de personas, empuja al planeta hacia la extinción en masa de una sexta parte de las especies, y tiene un coste de más del 10% del producto anual bruto mundial en pérdidas de diversidad biológica y de servicios de los ecosistemas”*.

La creciente demanda de alimentos, piensos, combustibles, fibras y todo tipo de materiales sin disminuir el agotamiento de los recursos y la degradación de los ecosistemas, requiere la adopción de una gestión más sostenible. Los esfuerzos deben orientarse hacia la disminución de los costos de los insumos (materias primas y energía), así como de la dependencia de productos químicos cuyo uso indebido puede suponer un riesgo para la salud humana y el medio ambiente. En este sentido se pueden utilizar gran variedad de plantas para producir extractos naturales. La ventaja de la biomasa vegetal es su bajo costo de producción y la fácil conversión de esta biomasa vegetal en extractos que muestran acción como bioplaguicidas (Godlewska *et al.*, 2021) y en la síntesis verde de nanopartículas.

La síntesis verde de nanopartículas tiene muchas aplicaciones potenciales y una ventaja en relación con la sostenibilidad, frente a otras tecnologías, que es la reducción del uso de productos químicos tóxicos y una importante reducción en el gasto energético para la producción de las nanopartículas (Jadoun *et al.*, 2021).

Las plantas constituyen un componente importante de los alimentos y desempeñan un papel clave en la salud y la estabilidad climática. Desde el inicio de la historia de la vida, las plantas han sido una fuente principal de tratamientos útiles frente a diferentes dolencias y enfermedades. Según una estimación, en la actualidad se han reportado aproximadamente 4.220.000 especies de plantas de todo el mundo, entre las cuales, más de 35.000 especies se utilizan con fines terapéuticos y 20.000 son comestibles y consumidas por el 90% de la población (Hasan *et al.*, 2007). Las plantas aromáticas y/o medicinales se han utilizado durante muchos años en todo el mundo en el procesamiento de alimentos como potenciadores del sabor y conservantes (Reichling *et al.*, 2009). En la actualidad, la tendencia a preferir los alimentos mínimamente procesados (Nieto *et al.*, 2010) ha generado una corriente de consumo hacia la sustitución o el desuso de los conservantes sintéticos y a un aumento en el uso de conservantes naturales en los alimentos (Doyle y Erickson, 2008). Desde la antigüedad se han utilizado las especias y sus derivados procedentes de diferentes familias de plantas como aromatizantes en los alimentos. Especialmente, los miembros de la familia *Lamiaceae* son conocidos por estas propiedades (Fakir *et al.*, 2015). Esta familia engloba importantes plantas aromáticas utilizadas en la medicina tradicional y moderna y en las industrias alimentaria y farmacéutica (Nieto, 2017). Muchas de sus especies se usan como condimentos (*Origanum*, *Thymus*, *Mentha*), para obtener aceites esenciales (*Lavandula*, *Pogostemon*, *Salvia*) y/o como ornamentales (*Coleus*, *Salvia*, *Scutellaria*).

La familia *Lamiaceae* (*Labiatae*) presenta una distribución cosmopolita que incluye 236 géneros y 7.200 especies en todo el mundo. Las especies de esta familia crecen en múltiples tipos de hábitats como prados húmedos, bordes de carreteras y áreas urbanas (Başer *et al.* 1999) y a diversas altitudes (Khalik, 2016). El centro de la diversidad de esta familia, *Lamiaceae*, es Asia Central y regiones mediterráneas donde se localizan una gran diversidad de taxones

(Perveen y Qaiser, 2004).

La familia *Lamiaceae* es una de las familias más diversas de la Península Ibérica, incluyendo alrededor de 300 taxones. Muchos de sus géneros tienen sus centros genéticos en esta región Circum-Mediterránea. Además de estas áreas fitogeográficas, otras regiones del mundo como Afganistán, Etiopía, India, Irán, Nepal, Somalia, Sudán, Egipto y la Península Arábiga también albergan géneros importantes de la familia *Lamiaceae* como *Nepeta*, *Eremostachys* y *Salvia* (Naghibi *et al.*, 2005). Arabia Saudí tiene una gran superficie de tierra árida que cubre una parte significativa de la Península Arábiga (Alsherif, 2019) donde se distinguen varios ecosistemas que varían en la diversidad de especies vegetales, plantas de cultivo, medicinales y vegetación xerofítica (Khalik *et al.* 2017). Arabia Saudí está dotada de una amplia variedad de flora, alrededor de 2.250 especies (Alsherif, 2019), que incluye muchas hierbas, arbustos y árboles medicinales que se estima que pueden suponer más de 1.200 especies (más del 50% del total) (Mossa *et al.*, 1987). La familia *Lamiaceae* está representada en la flora de Arabia Saudí con 76 especies de las cuales 23 son consideradas plantas medicinales (Rahman *et al.*, 2004).

## 1. El género *Mentha*

La familia *Lamiaceae* se compone de unos 186 géneros y unas 5600 especies distribuidas por las regiones cálidas y templadas de todo el mundo. Los géneros con mayor número de especies son: *Salvia* (900), *Scutellaria* (360), *Stachys* y *Plectranthus* L'Hér. (300), *Hyptis* Jacq. (280), *Teucrium* (250), *Thymus* (220), *Nepeta* (200) y *Sideritis* (140). Los 13 géneros más diversos de la familia comprenden unas 3.350 especies, más de la mitad del total

(Morales *et al.*, 2010). Las especies de esta familia son fundamentalmente hierbas y arbustos, muy aromáticos y ricos en principios activos, por lo que son muy valoradas en la medicina natural y en la farmacopea. Entre los géneros más significativos se encuentra *Mentha*.

El género *Mentha* L. (subfam. *Nepetoideae*, tribu *Mentheae*), originario de las regiones templadas de Europa y Asia, se encuentra distribuido en los 5 continentes (Harley y Brighton, 1977; Gobert *et al.*, 2002). Su taxonomía es complicada dada la alta frecuencia de hibridación, la cantidad de especies poliploides y la gradual variación morfológica, tanto intra como interespecífica; ello se agudiza aún más en los híbridos ya que algunas de las poblaciones presentan caracteres predominantes de uno u otro progenitor (Harley y Brighton, 1977; Mabberley, 2017). Hasta el momento se han publicado unos 900 binomios, de los que se reconocen alrededor de 25 especies y varios híbridos (Harley y Brighton, 1977; Mabberley, 2017).

El género *Mentha* consta de 42 especies y 15 híbridos, con cientos de subespecies y cultivares diseminadas por todo el mundo entre los que destacan: *Mentha alaiica* Boriss., *Mentha aquatica* L., *Mentha arvensis* L., *Mentha australis* R.Br., *Mentha canadensis* L., *Mentha* × *carinthiaca* Host, *Mentha cervina* L., *Mentha cunninghamii* (Benth.) Benth., *Mentha dahurica* Fisch. ex Benth., *Mentha* × *dalmatica* Tausch, *Mentha darvasica* Boriss., *Mentha diemenica* Spreng., *Mentha* × *dumetorum* Schult., *Mentha gattefossei* Maire, *Mentha* × *gayeri* Trautm., *Mentha* × *gentilis* L., *Mentha grandiflora* Benth., *Mentha japonica* (Miq.) Makino, *Mentha* × *kuemmerlei* Trautm., *Mentha laxiflora* Benth., *Mentha* × *locyana* Borbás, *Mentha longifolia* (L.) L., *Mentha* × *maximiliana* F.W. Schultz, *Mentha micrantha* (Fisch. ex Benth.) Heinr.Braun, *Mentha pamiroalaica* Boriss., *Mentha* × *piperita* L., *Mentha pulegium* L., *Mentha* × *pyramidalis* Ten., *Mentha requienii* Benth., *Mentha* × *rotundifolia* (L.) Huds., *Mentha royleana* Wall.

ex Benth., *Mentha saturejoides* R.Br., *Mentha* × *smithiana* R.A. Graham, *Mentha spicata* L., *Mentha suaveolens* Ehrh., *Mentha* × *verticillata* L., *Mentha* × *villosa* Huds. y *Mentha* × *villosa-nervata* Opiz.

(<http://www.theplantlist.org/browse/A/Lamiaceae/Mentha/>).

Existen muchas discrepancias entre los botánicos y especialistas a la hora de asignar nombres a las mentas y por eso es frecuente encontrar una misma especie, variedad o híbrido con diferentes nombres científicos. A continuación, se presenta una tabla resumen de las distintas especies del género *Mentha* (Tabla 1), donde se especifica su nombre científico y su nombre común.

Tabla1. Resumen de las distintas especies del género *Mentha*

ESPECIES	SINÓNIMOS	NOMBRE COMÚN
<i>Mentha aquatica</i> L.		Menta acuática Menta blanca
<i>Mentha arvensis</i> L.		Menta negra Menta japonesa
<i>Mentha citrata</i> L.	<i>Mentha piperita</i> L. var. <i>Citrata</i>	Bergamota
<i>Mentha longifolia</i> L.		Menta silvestre Menta borde
<i>Mentha pulegium</i> L.		Poleo
<i>Mentha piperita</i> L.	<i>Mentha</i> × <i>pipetita</i> L.	Menta
<i>Mentha spicata</i> L.	<i>Mentha sativa</i> L. <i>Mentha</i> × <i>verticillata</i> <i>Mentha viridis</i> L. <i>Mentha nemorosa</i> Willd.	Hierbabuena Sándalo Menta verde Menta romana
<i>Mentha suaveolens</i> L.	<i>Mentha rotundifolia</i> L. <i>Mentha spicata</i> L. var. <i>rotundifolia</i>	Mastranzo Menta de burro

Las especies de menta se caracterizan por poseer estolones de amplia extensión que crecen tanto por debajo como por encima del suelo y tienen tallos erectos, cuadrados y ramificados. Las hojas son de forma oblonga a lanceolada, dispuestas en sentido opuesto, tienen bordes dentados y a menudo son suaves. Puede haber una variedad de colores, que incluyen verde oscuro, verde grisáceo, azul violeta y ocasionalmente amarillo pálido. Las flores blancas o violetas se producen en falsos verticilos. La corola tiene dos labios y cuatro lóbulos, siendo el lóbulo superior generalmente el más grande. La fruta es una cápsula pequeña

y seca que contiene de una a cuatro semillas (Taneja y Chandra, 2012).

Entre todas las especies de *Mentha* se encuentran *M. piperita* L. y *M. longifolia* L. El extracto de *M. piperita* L. se ha utilizado para proteger el grano de maíz de *Aspergillus flavus* lográndose una inhibición total del hongo con una concentración del 3-8% y sin efectos fitotóxicos (Montes- Belmont y Carvajal, 1998). Por otra parte, también se ha evidenciado la actividad biopesticida de *M. longifolia* L. (Al-Sarar *et al.* 2014).

## 2. *Mentha longifolia* L.: Descripción de la especie



Sinónimos: *M. spicata* var. *longifolia* L.; *M. sylvestris* L.

Árabe: Habag, Habek, Habaq El Maya, Habaq el ma, Habaq el-bahr, Nemdar, Na'oudh.

Inglés: Horse mint, wild mint.

Español: Hierba buena silvestre, hierba de las pulgas, mastranzo fino, menta blanca, menta silvestre, poleo.

*Mentha longifolia* (L.) Huds.

قبح - جبح - قبح ءاملا

## Identificación taxonómica de la *Mentha longifolia* L.

- Reino: Plantae.
- División: Magnoliophyta.
- Clase: Magnoliopsida.
- Orden: Labiales.
- Familia: *Lamiaceae*.
- Género: *Mentha*.
- Especie: *Mentha longifolia* L.
- Nombre común: Menta.

*Mentha longifolia* L. es también conocida como menta salvaje o menta de caballo y se encuentra en África, en Sudáfrica, se reconocen tres subespecies diferentes (Codd, 1983), en las regiones tropicales y templadas de Asia y Europa (Taneja y Chandra, 2012).

Es una hierba perenne de rápido crecimiento que generalmente mide entre 0,5 y 1 m de altura y puede alcanzar hasta 1,5 m. Las hojas son lanceoladas, toscamente pilosas y escasamente dentadas en los bordes. Miden 45-100 mm de largo y 7-20 mm de ancho y su color varía de verde claro y oscuro a gris. Las pequeñas flores se apiñan en espigas en la punta de los tallos y varían de blanco a malva durante los meses de invierno (Figura 1).



Figura 1. Detalle de planta, hojas y flores de *Mentha longifolia* L.

*M. longifolia* crece en lugares húmedos sobre cualquier sustrato, bordes de cursos de agua o lagunas, en juncuales, a veces en lugares nitrificados, como cunetas o bordes de caminos, con frecuencia en lugares umbríos porque necesita un suelo rico en nitrógeno y no tolera la luz solar directa. La planta puede tolerar vientos fuertes, pero no la exposición marítima. Se puede encontrar desde los 440 m hasta los 2300 m de altitud.

Según la monografía del género (Tucker y Naczi, 2007), su área de distribución natural es la más grande entre las especies de *Mentha* silvestres, cubriendo las regiones templadas y mediterráneas de Eurasia y África (Tucker y Naczi, 2007; Sevindik *et al.*, 2017; Sevindik, 2018).

*M. longifolia* L. se distribuye por numerosas regiones del mundo como Europa, la región mediterránea, Australia, Asia, América y África y crece también ampliamente en Arabia Saudí (Figura 2).

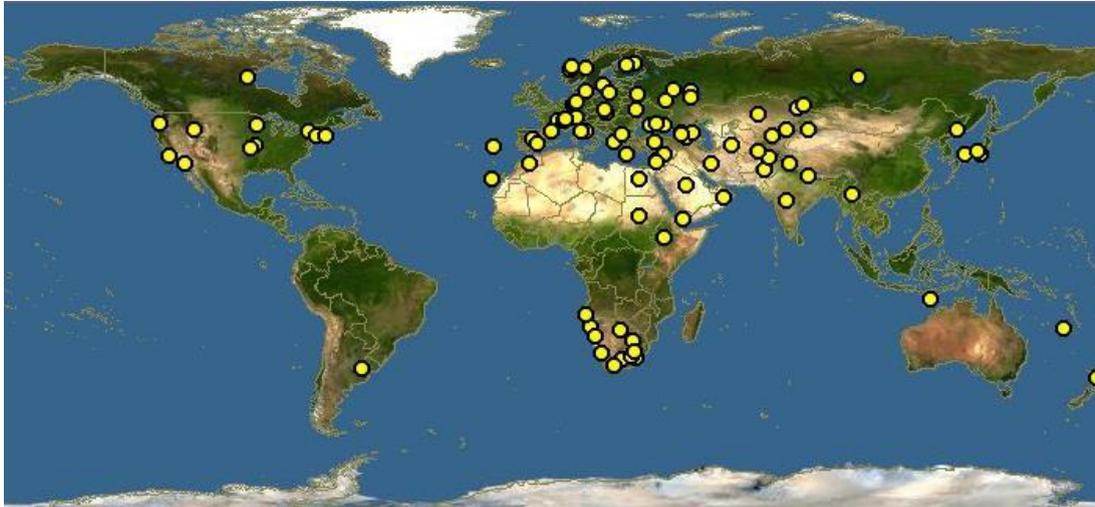


Figura 2. Área de distribución geográfica de *M. longifolia* L. en el mundo y en Arabia Saudita.

Fuente: <https://www.discoverlife.org/20/q?search=Mentha+longifolia>.

Esta amplia distribución de la especie puede evaluarse como un signo de adaptabilidad. La gran cantidad de taxones incluidos en esta especie también indican su gran diversidad genética. La monografía enumera 22 subespecies de *M. longifolia* L. descritas en diferentes regiones del mundo (Tabla 2).

Tabla 2. Subespecies de *Mentha longifolia* L. y la región donde se ha datado, basado en Tucker y Naczi (2007).

Subespecie	País o región
<i>ssp. calliantha</i>	Southwestern Iran, Eastern Anatolia
<i>ssp. capensis</i>	Cape Colony, Zimbabwe, Lesotho, Namibia
<i>ssp. caucasica</i>	Caucasus
<i>ssp. cyprica</i>	Cyprus, mountainous regions
<i>ssp. diabolina</i>	Eastern Europe; Asia
<i>ssp. dumortieri</i>	Belgium
<i>ssp. erminea</i>	Crete, Southern and Eastern Greece, Turkey
<i>ssp. grisella</i>	Asia Minor, and Greece, Macedonia, Romania, Hungary.
<i>ssp. himalaiensis</i>	Himalaya. Afghanistan
<i>ssp. lavandulaceae</i>	Spain
<i>ssp. longifolia</i>	Whole Europe
<i>ssp. minutiflora</i>	Hungary, Macedonia and Crete
<i>ssp. modesta</i>	Asia Minor, Iran, Tibet
<i>ssp. mollis</i>	Romania, Former Yugoslavia
<i>ssp. noe`ana</i>	Southeastern Anatolia, Western Iran, Iraq.
<i>ssp. pellita</i>	Syria and Ethiopia
<i>ssp. polyadena</i>	South Africa; Lesotho
<i>ssp. royleana</i>	Siberia, Asia Minor, Iran, Afghanistan, Tibet
<i>ssp. schimperii</i>	Ethiopia, Yemen, Sinai Peninsula
<i>ssp. syriaca</i>	Syria and Ethiopia
<i>ssp. typhoides</i>	Aegean region, Northern Iran, Northern Iraq, Egypt, Lebanon and Israel
<i>ssp. wissii</i>	South Africa, Namibia

### 3. Algunos usos y formas de consumo tradicionales de *M. longifolia* L.

En Turquía, Irak, Irán, Pakistán y los países árabes, las hojas o los brotes florales de *M. longifolia* L. se utilizan como especia, para especialidades lácteas (Tunc, Turk *et al.*, 2011; Mahmoudi *et al.*, 2012; Ehsani y Mahmoudi 2012), como hortalizas de hoja, té de hierbas y un remedio etnomedicinal (Ghoulami *et al.*, 2001; Baser *et al.*, 2012; Iqbal *et al.*, 2013; Mikaili *et al.*, 2013; Murad *et al.*, 2016; Sevindik *et al.*, 2017). Una revisión reciente de Farzaei *et al.*, (2017) aporta datos etnofarmacológicos en las regiones mencionadas, con una amplia variedad de indicaciones tradicionales. *M. longifolia* L. se cultiva en Túnez (Hajlaoui *et al.*, 2009) y se cita también un taxón intraespecífico, *M. longifolia* var. *schimperii* syn. ssp. *Schimperii*, en Sudán (Younis y Beshir, 2011).

En Europa, pese a su abundancia en prados húmedos, bosques y áreas ruderales, *M. longifolia* L. es mucho menos conocida y utilizada. Sin embargo, se han publicado algunos trabajos sobre el análisis de componentes y/o preparaciones de *M. longifolia* L. debido a usos potenciales relacionados con la industria (Dudai *et al.*, 2006; Gulluce *et al.*, 2007; Krzyzanowska *et al.*, 2011; Bertoli *et al.*, 2011; Orhan *et al.*, 2012). Junto a ellos, también están disponibles algunos trabajos sobre *M. longifolia* L. como planta medicinal, principalmente referidos a sus efectos antiinflamatorios y quimioprotectores (Mimica-Dukić *et al.*, 1996, 1993; Shen *et al.*, 2011; Baris *et al.*, 2011; Vladimir-Knežević *et al.*, 2014).

Estudios recientes realizados en Europa destacan la importancia de la investigación etnobotánica transcultural y transfronteriza para comprender completamente los factores que dan forma al conocimiento y uso de las plantas por parte de comunidades que viven cerca en condiciones ambientales similares (Pieroni *et al.*, 2011.; Sõukand, 2016; Pieroni y Sõukand, 2017). Se propone que las diferencias en los antecedentes culturales como, por ejemplo,

el origen étnico, idioma, sistemas de creencias medicinales o religión son factores importantes que afectan a los diferentes conceptos del conocimiento médico dentro de dichas comunidades en Europa (Pieroni y Quave, 2005; Leonti *et al.*, 2008; Leonti, 2011; Bellia, 2015).

En muchos países, los productos de origen vegetal tienen un importante papel en el tratamiento de enfermedades. Además, debido a las contraindicaciones en el uso de fármacos químicos, existe un interés creciente en la utilización de medicamentos derivados de plantas (Anwar *et al.*, 2019), ya que, en comparación con las drogas sintéticas, algunos de estos productos tienen menor toxicidad y mayor eficacia (Fabricant *et al.*, 2001). Además, algunos de los compuestos derivados de plantas tienen un sabor y olor agradables y se puede utilizar en la cocina como aromatizantes, especias y alimentos (Salehi *et al.*, 2018).

Entre las plantas con importancia económica y culinaria mundial, la menta se utiliza en todo el mundo para aromatizar dulces, té y platos salados (Tafrihi *et al.*, 2021). Las plantas de este género se utilizan para la producción de aceites esenciales, principalmente en EE. UU., India, China e Irán (Lawrence, 2006). Los materiales vegetales frescos y secos del género *Mentha* se utilizan ampliamente en la industria como parte de productos de confitería, agentes potenciadores del sabor, productos farmacéuticos, cosméticos, etc. (Shaikh *et al.*, 2014).

Se sabe que las especies del género *Mentha* incluyen entre sus propiedades el proporcionar una sensación refrescante además de reducir el dolor. La sensación de frescor deriva de la activación de Receptores de Potencial Transitorio (TRPM8 y TRPA1) que son termorreguladores conocidos por actuar como sensores primarios del frío en humanos. Se trata de canales catiónicos no selectivo permeable a  $\text{Ca}^{2+}$ , que presentan mecanismos polimodales de apertura entre los que se encuentran compuestos como el

mentol. La activación de TRPM8 y de TRPA1 estaría no sólo implicada en la sensación de frío sino en la sensación de alivio del dolor (Karashima *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2013).

Algunas especies de *Mentha* se utilizan para mitigar los problemas de la piel y los dolores de cabeza. Los estudios *in vitro* han demostrado que el aceite esencial de menta, así como el mentol, actúan como relajantes del músculo liso bloqueando la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L (Amato *et al.*, 2014; Grigoleit y Grigoleit, 2005).

El té de menta produce una reducción en los niveles de colesterol total y de triglicéridos e, incluso, podrían aumentar los niveles de HDL en sangre (Barbalho *et al.*, 2011).

*M. longifolia* L. se utiliza en las industrias farmacéutica, tabacalera y alimentaria y, en particular, en la industria cosmética. Las diferentes partes de la planta, incluidas sus hojas, flores, tallos, corteza y semillas, también se han utilizado ampliamente en la medicina popular tradicional como antimicrobianos, carminativos, estimulantes, antiespasmódicos y para el tratamiento de diversas enfermedades como dolores de cabeza y trastornos digestivos (Mikaili *et al.*, 2013). En la tabla 3 se muestran algunas de las propiedades para la salud de *M. longifolia* L.

Tabla 3. Beneficios para la salud de *M. longifolia* L.

Lugar de actuación	Efecto	Parte de la planta	Origen
Gastrointestinal	Carminativo, diarrea, disentería	Entera	Pakistán
	Desordenes abdominales	Hojas	India
	Indigestión	Flores	Irán
	Constipación	Hojas	Jordania
	Espasmolítico	Hojas	Rumanía
	Cálculo biliar, dolor dental, flatulencias	Parte aérea	Irán
Respiratorio	Asma	Parte aérea	Turquía
	Tos	Flores	Irán
	Disnea	Planta completa	Turquía
	Resfriado común	Hojas	Jordania
Sistema inmune	Antirreumático	Planta completa	Pakistán
	Anticatarral	Parte aérea	España
Piel	Heridas	Planta completa	Turquía
Antimicrobiano	Bactericida	Parte aérea	Rumanía
	Nematicida	Parte aérea	Turquía
	Repelente de insectos	Parte aérea	Irán
Sistema nervioso central	Antipirético	Hojas	Jordania
	Sedación	Hojas	Turquía
	Dolor de cabeza	Parte aérea	Grecia
Riñón	Piedras	Parte aérea	Irán y Grecia
Otros	Debilidad	Hojas	Jordania
	Afrodisiaco	Parte aérea	Grecia

Adaptada de Mikaili *et al.*, 2013

#### 4. Composición química de *M. longifolia* L.

Los ingredientes activos de *M. longifolia* L. se originan de las vías del mevalonato y del shikimato. El primero produce los terpenos volátiles de *M. longifolia* L., con mayor frecuencia cetonas como carvona, piperitona, piperitenona y epóxidos correspondientes (Başer *et al.*, 1999; Sharopov *et al.*, 2012). Los triterpenos de *M. longifolia* L. (ácidos ursólicos, oleanólico, etc.) también se originan a partir de esta vía. La vía del shikimato es el origen de los compuestos fenólicos de *M. longifolia* L. Derivados del ácido cafeico

(predominantemente la molécula antirradical conocida ácido rosmarínico) también están presentes. Los flavonoides también merecen atención, ya que se ha documentado la presencia de 55 flavonoides diferentes (Bourwieg y Pohl, 1973; Ghoulami *et al.*, 2001; Pereira y Cardoso, 2013; Hawrył *et al.*, 2016, Patonay *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2019), seis de ellos *de novo* (Sharaf *et al.*, 1999; Jahan *et al.*, 2001; Ghoulami *et al.*, 2001; Ali *et al.*, 2002). En cuanto a las subclases de flavonoides, las flavonas parecen estar presentes en la mayor variabilidad.

En la siguiente tabla (Tabla 4) se presenta un análisis bibliográfico de la composición de la *Mentha longifolia* L., indicando el origen geográfico y los componentes mayoritarios correspondientes:

Tabla 4. Resumen de datos disponibles sobre la composición química de *Mentha longifolia* L.: Origen geográfico de las muestras y componentes mayoritarios.

ORIGEN GEOGRÁFICO	COMPONENTES MAYORITARIOS
<b>Belgrado</b>	<i>Trans</i> -y <i>cis</i> - dihydrocarvona (23.6% y 15.7%), piperitona (17.3%), 1,8-cineol (8.2%), neoisodihydrocarveol (7.8%), acetato de neoisodihydrocarveol (4.2%)
<b>Croacia</b>	Carvona (33.48%), óxido de piperitenona (28.95%), Limoneno (10.29%), $\beta$ -cariofileno (5.8%), Miriceno (3.21%), Borneol (2.74%)
<b>Egipto</b>	1,8-cineol (28.8%), óxido de <i>cis</i> -piperitona (15.4%), piperitona (13.9%), piperitenona (13.8%), óxido de piperitenona (5.6%), borneol (3.3%)
<b>Grecia</b>	Carvona (58%), Limoneno (11%), 1,8-cineol (9.2%), hidrato sabineno (2.1%), <i>trans</i> - dihydrocarvona (2.6%), <i>cis</i> -dihydrocarvona (5.4%), germacreno O (2.6%)
	Carvona (66.3%), limoneno (9.6%), 1,8-cineol (13.4%), Miriceno (1.6%)
	Carvona (56.2%), limoneno (3.1%), 1,8-cineol (2%), <i>trans</i> -dihydrocarvona (32.9%)
<b>Israel</b>	Pulegona (72.6%), 1,8-cineol (8.3%), mentona (14.85%), piperitona (3%)
<b>India</b>	Oxido de piperitenona (54.2%), óxido de <i>trans</i> - y <i>cis</i> -piperitona (24.1% y 7%), $\beta$ -cariofileno (3%), d/-limoneno (1.4%), eucalipto (1.2%)
<b>Irán</b>	Piperitona (43.9%), limoneno (13.7%), <i>trans</i> -piperitol (12.9%)
<b>Italia</b>	Oxido de piperitenona (77.4%), germacreno O (3.7%), 1,8-cineol (1.6%)
<b>Pakistán</b>	Oxido de piperitenona (40.1-64.6%), piperitenona (2-16.4%), borneol (4.4-13.3%), germacreno O (5.1-6%), $\beta$ -cariofileno (2.5-4.2%), pulegona (2.1-3.9%)
<b>Polonia</b>	Limoneno (5.8-15.3%), carvona (7.9-15.1%), (Z) y (E) - $\beta$ -ocimeno (3.7-9.1%) y (3.8-8.5%), 1,8-cineol (5.4-8.2%), $\beta$ -pineno (1.7-6.8%)

Tabla 4. (Continuación)

Sudáfrica	Mentofurano (55.3%), 1,8-cineol (7.2%), limoneno (7.2%), $\beta$ -cariofileno (4.9%), $\delta$ -pineno (2.1%)
	Mentofurano (59.7%), $\delta$ -cariofileno (5.3%), 1,8-cineol (4.1%), limoneno (4.1%), germacreno D (3.8%) <sup>1</sup>
	Oxido de <i>cis</i> - piperitona (35.7%), óxido de piperitenona (14.6%), $\beta$ -cariofileno (8%), 1,8-cineol (4.5%), limoneno (4.5%), germacreno D <sup>45%</sup>
	Oxido de piperitenona (65.7%), óxido de <i>cis</i> - piperitona (14.7%), borneol (5.1%), $\beta$ -cariofileno (2.5%), piperitenona (1.6%)
	Mentofurano (61.6%), 1,8-cineol (6.3%), limoneno (6.3%), $\delta$ -cariofileno (3.6%)
	Mentofurano (51.4%), pulegona (12%), $\beta$ -cariofileno (5.3%), mentona (5%), germacreno D (2.4%)
	Mentofurano (58%), 1,8-cineol (8.9%), $\beta$ -cariofileno (3.9%), limoneno (3.8%),
	Mentofurano (52.8%), $\beta$ -cariofileno (5.7%), 1,8-cineol (3.3%), limoneno (3.3%),
	Pulegona (35%), mentona (31.1%), 1,8-cineol (13%), $\delta$ -pineno (5.7%), borneol (3.3)
Túnez	Mentol (32.5%), mentona (20.7%), pulegona (17.8%), 1,8-cineol (5.6%), terpineol <sup>4</sup> (4.9%), piperitona (2.2%) <sup>fo</sup>
	Pulegona (47.2%), 1,8-cineol (11.4%), mentona (10.7%), $\alpha$ -pineno (3.6%), <i>d</i> -cadineno (3.5%), $\alpha$ -terpineol (3.2%) <sup>1</sup>
	Pulegona (54.41%), isomentona (12.02%), 1,8-cineol (7.41%), borneol (6.85%), óxido de piperitenona (3.19%), $\delta$ -cariofileno (2.04%), $\alpha$ -humuleno (2.97%)
Turquia	Oxido de <i>cis</i> - piperitona (18.4%), pulegona (15.5%), óxido de piperitenona (14.7%), mentona (7.9%), isomentona (6.6%), timol (6.6%)
Israel	Dos quimiotipos identificados: A (pulegona y mentona), B (óxidos de piperitona y piperitenona)
Irán	Piperitenona (35.8%), 1,8-Cineol (28.2%) y óxido de piperitenona (16.6%)

## 5. Capacidad antioxidante de *M. longifolia* L.

La medicina tradicional utiliza plantas tanto por sus propiedades curativas como preventivas. Las plantas han sido fuente de tratamientos medicinales durante miles de años. Los antioxidantes vegetales son muy importantes porque su presencia en la dieta humana puede ayudar al organismo a neutralizar los radicales libres y reducir el daño causado por el estrés oxidativo, dado que, el estrés oxidativo está asociado con procesos degenerativos y patológicos como el envejecimiento, las enfermedades coronarias y el cáncer.

El interés en el uso de antioxidantes naturales de origen vegetal está aumentando porque son más seguros y ofrecen beneficios medicinales. Por el contrario, los antioxidantes sintéticos pueden promover la carcinogénesis (Suhaj, 2006). Los antioxidantes sintéticos como el hidroxitolueno butilado o dibutilhidroxitolueno (BHT; E-321) y el hidroxianisol butilado o butilhidroxianisol o butil anisol, (BHA; E-320), comúnmente utilizados en la industria alimentaria, tienen efectos secundarios y pueden ser responsables de daño hepático y carcinogénesis (Branen, 1975; Ito *et al.*, 1983; Wichi, 1986 y Grice, 1988). Por esta razón se ha incrementado el interés en el uso de antioxidantes naturales y, en los últimos años, el uso de antioxidantes naturales presentes en alimentos y otros materiales biológicos ha atraído un interés considerable debido a su mayor seguridad, valor nutricional y terapéutico (Ajila *et al.*, 2007).

Los antioxidantes comestibles que se encuentran comúnmente en las plantas incluyen ácido ascórbico, tocoferoles, carotenoides y varios compuestos fenólicos (Rafat *et al.*, 2010) como ácidos fenólicos, flavonoides y taninos (King y Young, 1999). Los ácidos fenólicos, como el ácido cafeico, el ácido ferúlico y el ácido vainílico, son antioxidantes naturales bien conocidos y

están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos depende de la estructura y naturaleza de las sustituciones en los anillos aromáticos (Balasundram *et al.*, 2006), mientras que sus beneficios para la salud dependen de su absorción y metabolismo (Parr y Bolwell, 2000).

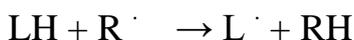
En el metabolismo celular tienen lugar procesos oxidativos que son vitales para la supervivencia de la célula. En las células vegetales, existen tres orgánulos en los que se produce principalmente el estrés oxidativo generándose especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS se generan en los fotosistemas I y II de los cloroplastos, en la ubiquinona y el complejo III en la cadena de transporte de electrones mitocondrial y, en menor medida, en la membrana y matriz del peroxisoma (Janků *et al.*, 2019).

En el curso de la reducción gradual de oxígeno molecular, se producen una serie de ROS. Estas ROS pueden ser radicales libres oxigenados/nitrogenados y se definen como especies químicas que poseen un electrón desapareado en la capa de valencia (radical anión superóxido  $O^{\cdot-}$ , hidroxilo  $HO_2^{\cdot}$ , hidroperoxilo  $HO_2^{\cdot}$ , peroxilo  $ROO^{\cdot}$ , alcoxyl  $RO^{\cdot}$ , óxido nítrico  $NO^{\cdot}$ , peroxinitrito  $ONOO^-$  y dióxido de nitrógeno  $NO_2$ ) o moléculas neutras ( $H_2O_2$  o  $HClO$ ) (Pisoschi *et al.*, 2016).

Estas especies reactivas de oxígeno (sobre todo los radicales hidroxilo y peroxilo, el peróxido de hidrógeno y el anión del radical superóxido), están implicadas en el daño oxidativo infligido a los ácidos grasos, el ADN y las proteínas, así como a otros componentes celulares (Halliwell y Gutteridge, 2007). El estrés oxidativo causado por el desequilibrio entre la formación excesiva de ROS y las defensas antioxidantes limitadas está relacionado con numerosos efectos negativos en las células. La mayor parte del tiempo la producción de estos radicales libre está regulado porque actúan como moléculas de señalización.

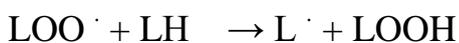
El mecanismo de acción antioxidante se describe fácilmente a partir del modelo de peroxidación lipídica en membranas celulares o alimentos. Se trata de un mecanismo que consta de diferentes etapas: iniciación, propagación y derivación y de terminación de la cadena, que es promovido por calor, luz, y radiación ionizante o por iones metálicos o metaloproteínas (Pisoschi *et al.*, 2016).

*Iniciación:*



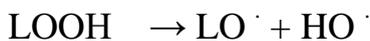
Donde LH es el sustrato lipídico, R<sup>·</sup> es el radical oxidante iniciador y L<sup>·</sup> es el radical alilo dotado de alta reactividad.

*Propagación:*

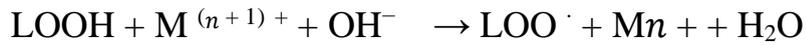
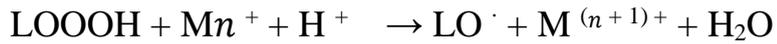


Durante este paso de propagación, los radicales lipídicos peroxilo LOO<sup>·</sup> actúan como portadores de cadena, oxidando aún más el sustrato lipídico y generando hidroperóxidos de lípidos (LOOH), que pueden descomponerse en alcoholes, aldehídos, formatos de alquilo, cetonas, hidrocarburos y radicales tales como el radical lípido alcoxilo LO.

*Derivación:*

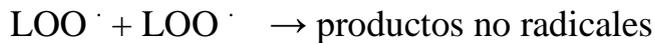


La descomposición de los hidroperóxidos lipídicos a menudo tiene lugar en presencia de iones de metales de transición, que generan peroxilo lipídico y radicales lípidos alcoxilo:



*Terminación:*

La terminación implica la combinación de radicales para formar especies químicas no radicales:



De forma natural, el control de estos radicales (ROS) se basa, de manera altamente eficiente, en dos sistemas complementarios: enzimático y no enzimático (Ahmad *et al.*, 2010). El sistema enzimático comprende varias enzimas (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa) que son muy específicas del sustrato. El sistema de control no enzimático comprende antioxidantes de bajo peso molecular (ácido ascórbico, glutatión, prolina, carotenoides, ácidos fenólicos, flavonoides, etc.) y metabolitos secundarios de alto peso molecular, como taninos, que actúan como captadores de radicales libres, agentes reductores y quelantes de metales.

Las plantas tienen una capacidad innata para biosintetizar una amplia gama de antioxidantes capaces de mitigar el daño oxidativo inducido por especies reactivas de oxígeno. Los agentes consisten en una gran cantidad de moléculas orgánicas como carbohidratos, grasas, proteínas, enzimas, coenzimas, fenoles, flavonoides, terpenos, alcaloides, etc. (Kasote *et al.*, 2015).

Muchas familias y especies de plantas sintetizan cientos de sustancias

fitoquímicas únicas (Kessler y Kalske, 2018). Se han descrito alrededor de 200.000 compuestos en aproximadamente el 30% de plantas superiores y muchos taxones todavía permanecen sin explorar. Esta diversidad se amplifica aún más por plasticidad, ya que la fitoquímica varía con la ontogenia y la filogenia en respuesta a factores abióticos e interacciones bióticas (Dicke y Baldwin, 2010; Barton, y Boege, 2017; Yang *et al.*, 2018). Además, la diversidad fitoquímica varía entre ramas, órganos, e incluso tejidos dentro de órganos (Shelton, 2005; Herrera, 2009). Como organismos sésiles, las plantas se han adaptado a su entorno sintetizando una enorme variedad de metabolitos secundarios de bajo peso molecular, con funciones ecológicas y evolutivas (Lopresti y Weber, 2016).

Por lo general, los metabolitos secundarios se regulan genéticamente y se sintetizan en órganos, tejidos, células u orgánulos, y esta especificidad está regulada a lo largo del desarrollo de la planta. Por tanto, numerosos factores de transcripción se coordinan para la activación y transcripción de genes. El citoplasma es un sitio habitual de síntesis, pero algunos alcaloides, cumarinas y terpenos, por ejemplo, se sintetizan en el cloroplasto, o algunos los sesquiterpenos y esteroides se sintetizan en el retículo endoplásmico (Jørgensen *et al.*, 2005).

Los compuestos solubles en agua son transportados y almacenados en la vacuola por transportadores específicos, a través del tonoplasto. Las sustancias lipofílicas están confinadas en conductos de resina, laticíferos, glándulas, tricomas, tilacoides o en la cutícula (Kutchan, 2005), evitando la autotoxicidad por interferencia con biomembranas.

En muchos casos, el sitio de biosíntesis de ciertos compuestos se limita a un solo órgano, como la raíz, la hoja o el fruto, pero luego se transporta y se acumula en otros tejidos vegetales. En estos casos, el transporte de larga distancia ocurre a través del xilema o floema, aunque también es posible el

transporte apoplástico. Este almacenamiento puede ser específico para un determinado tejido o célula, por ejemplo, taninos, alcaloides o glucosinolatos se almacenan en idioblastos; terpenoides en tricomas o pelos glandulares; flavonoides, antocianinas o glucósidos cianogénicos en la epidermis. El perfil metabólico de una especie vegetal determinada, su contenido en compuestos fitoquímicos y, particularmente, en metabolitos secundarios, varía con el tiempo, el espacio y la etapa de desarrollo (Wink, 2010).

Muchas plantas medicinales, incluido el género *Mentha*, contienen altas cantidades de antioxidantes, incluidos compuestos fenólicos, ácido ascórbico y carotenoides, que pueden retardar o inhibir la oxidación de varias moléculas (Park *et al.*, 2019). En este sentido, los extractos y aceites esenciales (AE) de muchas hierbas medicinales y culinarias se han investigado como una fuente prometedora de potentes antioxidantes (Ceylan *et al.*, 2015), con actividad conocida contra especies reactivas de oxígeno y radicales libres. Se puede valorar la capacidad antioxidante mediante varios ensayos de antioxidantes *in vitro* como el captador de radicales (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (DPPH) (Anwar *et al.*, 2017) y el ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS+). Los investigadores han utilizado con éxito la inhibición de la peroxidación del ácido linoleico (Nickavar, 2008) y el poder reductor (Oyaizu, 1986) para investigar la actividad antioxidante de las plantas de *Mentha*.

La familia de la menta (*Lamiaceae*) es una importante familia de plantas medicinales. Incluye alrededor de 236 géneros y más de 6000 especies, y los géneros más grandes son *Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys*, *Plectranthus*, *Hyptis*, *Teucrium*, *Vitex*, *Thymus* y *Nepeta*. Es una familia de gran diversidad y variedad con una distribución cosmopolita. La mayoría de las *Lamiaceae* que contienen antioxidantes pertenecen a la subfamilia Nepetoideae, incluyendo

albahaca, toronjil, mejorana, menta, orégano, romero, salvia, etc. Contienen ácido rosmarínico y a menudo son ricas en terpenos volátiles fragantes (Wink, 2003). Albayrak *et al.*, (2013) demostraron que además del tomillo, el romero y la salvia, la menta, el toronjil y la albahaca también contienen una cantidad considerable de compuestos fenólicos con fuertes propiedades antioxidantes y captadoras de radicales DPPH. Además, los extractos de romero fueron los primeros antioxidantes naturales comercializados. En el estudio de Kaefer y Milner (2008), el tomillo, la salvia, el romero y la mejorana mostraron la mayor capacidad antioxidante entre las hierbas estudiadas. Las especies mencionadas se encuentran entre las especies mejor estudiadas de la familia Lamiaceae y su actividad antioxidante ha sido demostrada en numerosos estudios (Gonçalves *et al.*, 2009; Ahmad *et al.*, 2012; Sodr e *et al.*, 2012; Trakoontivakorn *et al.*, 2012; Lagouri y Alexandri, 2013; Licina *et al.*, 2013). La mayoría de las especies de la familia son aromáticas y poseen aceites esenciales (Lawrence, 1992).

Los datos que se obtienen de la literatura sobre la actividad antioxidante de las diferentes especies de *Mentha* son difíciles de comparar debido a las distintas metodologías seguidas en los análisis. Numerosos factores juegan un papel en estos resultados aparentemente contradictorios, por ejemplo, métodos de cultivo vs. recolección silvestre de las plantas, tipo de pruebas de laboratorio o métodos de extracción, etc. Sin un enfoque estandarizado, no es posible definir la consistencia de las comparaciones entre diferentes artículos. Según Anwar *et al.*, (2019), los aceites esenciales de *M. longifolia* L. de diferentes quimiotipos recolectados de diferentes regiones de Arabia Saudita exhibieron niveles bastante altos de actividad captadora de radicales DPPH, que se correlacionó principalmente con los diferentes niveles de polifenoles y carvona en los aceites probados. Saba y Anwar (2018) investigaron los efectos de las áreas de recolección sobre las propiedades fisicoquímicas y biológicas de las hojas de menta (*Mentha spicata* L.) extraídas con el aceite

esencial fluido supercrítico. Los investigadores encontraron que los aceites probados eliminaban eficazmente los radicales libres DPPH e inhibían la peroxidación del ácido linoleico dependiendo de los diferentes contenidos de fenoles y flavonoides totales. En otro estudio de Ed-Dra *et al.*, (2018) el aceite esencial de *Mentha suaveolens* L. mostró un potencial antioxidante reductor de hierro significativo y una actividad depuradora de radicales libres DPPH. Se ha informado que *M. aquatica* L. tiene los niveles más altos de fenoles, flavonoides y taninos, así como las más altas actividades antioxidantes (Benabdallah *et al.*, 2016). *Mentha suaveolens* Ehrh. no mostró actividad antioxidante (Park *et al.*, 2019). Por el contrario, en otro estudio realizado por Nickavar *et al.*, 2008, el orden de la actividad antioxidante valorada mediante DPPH fue el siguiente: *M. piperita* L., *M. pulegium* L., *M. rotundifolia* L., *M. spicata* L. y *M. longifolia* L. Se conoce que el aceite esencial de *M. longifolia* L. exhibe un potencial significativo de actividad antioxidante (Džamić *et al.*, 2010; Nikšić *et al.*, 2012; Eissa *et al.*, 2014). Dzamic *et al.*, (2010) demostraron que el aceite esencial de *Mentha longifolia* L. (MLEO) es un eliminador de radicales libres eficaz para DPPH y exhibe una actividad de eliminación dependiente de la dosis (CI50 = 0,66 ml / ml de solución) (Džamić *et al.*, 2010). De manera similar, MLEO redujo los radicales DPPH a su forma DPPH-H neutra (CI50 = 10,5 µg / ml) (Niksic *et al.* 2012).

Sin embargo, a diferencia del proceso de obtención de los aceites esenciales, que se producen predominantemente mediante destilación, las infusiones se preparan macerando brevemente el material vegetal con agua fría o hirviendo (Handa, 2008) y se obtiene así, en poco tiempo, y sin el empleo de disolventes, un extracto en el que se podría incluso evitar la descomposición térmica de sustancias termolábiles.

El extracto de *M. longifolia* L. secado naturalmente posee un mayor contenido de compuestos fenólicos (113,8 mg GA / g) y flavonoides (106,7

mg RT / g) que las muestras secas de laboratorio. De manera similar, se encontró que los extractos secados naturalmente (2.76 mmol Fe<sup>2+</sup> / mg y EC50 = 0.02 mg / mL) tenían una mayor actividad antioxidante en comparación con las muestras secas de laboratorio (1.13 ± 0.11 mmol Fe<sup>2+</sup> / mg extracto seco y EC50 = 0.03 mg / mL) (Stanisavljevic *et al.*, 2012).

En el estudio con extractos se ha comprobado que *M. longifolia* L. muestra menor capacidad de actividad antioxidante que *M. piperita* L. (Nikavar *et al.*, 2008) y se ha encontrado una correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido fenólico total de los extractos ( $r^2 > 0,989$ ). Además, se sabe que la capacidad antioxidante varía según las ubicaciones geográficas en las que se recolectan los ejemplares de *M. longifolia* L. (Sevindik *et al.*, 2017).

Sin embargo, los metabolitos secundarios de las plantas no sólo actúan como antioxidantes que pueden ser utilizados para la conservación de alimentos o con objetivos de salud, sino que también actúan contra patógenos microbianos sobre la base de su naturaleza tóxica (Schafer and Wink, 2009). De este modo obtener plaguicidas a base de plantas para controlar las pérdidas poscosecha es factible y conduce al uso sostenible de productos naturales que actúan como una fuente rica de compuestos naturales que exhiben actividad fungicida con menos efectos secundarios que los de origen químico.

Además, los extractos de plantas pueden actuar sobre la síntesis de nanopartículas metálicas al reducir los iones. La capacidad de un extracto vegetal para sintetizar nanopartículas metálicas depende del compuesto activo responsable de la reducción de los iones y varía según el organismo o extracto vegetal utilizado (Siddiqi *et al.*, 2018). De esta forma se consigue una síntesis de nanopartículas metálicas rápida, en un solo paso y barata, gracias a la presencia de fitoquímicos (antioxidantes) que actúan como agentes reductores en la síntesis de nanopartículas metálicas (Abdelghany *et al.*, 2018).

## 6. Biocontrol de hongos

Son numerosas las enfermedades que afectan a casi todos los tipos de cultivos en todo el mundo y la mayoría están causadas por patógenos fúngicos. Además de las pérdidas de rendimiento en el campo, los hongos causan más del 80% del total de enfermedades de las plantas que conducen a pérdidas agrícolas muy importantes, las pérdidas en postcosecha, que se estiman alrededor del 50% de la producción, son atribuidas a enfermedades causadas por hongos y bacterias (Magro *et al.*, 2006).

Una de las primeras reacciones de las plantas cuando se produce el reconocimiento de patógenos invasores es la rápida formación de especies reactivas de oxígeno (superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y oxígeno singlete) que están involucrados no sólo en la transducción de señales o en la limitación de la entrada de los patógenos, sino también en la inducción de tejido necrosado. Por consiguiente, la elevación del contenido de antioxidantes en las plantas se espera que aumente su tolerancia al desarrollo de necrosis causadas por patógenos o estreses abióticos.

Las plantas se protegen contra los ataques de herbívoros y microorganismos mediante la producción de metabolitos secundarios como fenoles, flavonoides, quinonas, terpenoides, alcaloides y taninos. Los extractos o aceites esenciales de plantas medicinales o aromáticas se utilizan comúnmente para el control de plagas debido a su eficacia contra diferentes etapas de vida de muchas plagas (Ahmed *et al.*, 2020). Los compuestos fitoquímicos, metabolitos secundarios, presentes en los extractos vegetales y aceites esenciales tienen actividades antimicrobianas contra una amplia gama de microorganismos (González-Lamothe *et al.*, 2009).

Los cultivos agrícolas y hortícolas se ven afectados por diversos hongos que causan pérdidas económicas, pero también riesgos para la salud de los consumidores debido, sobre todo, a las micotoxinas producidas por los hongos.

El uso de productos químicos se ha considerado el sistema más barato y eficaz de prevenir enfermedades en las plantas. Por eso la estrategia más importante para controlar los hongos fitopatógenos es la aplicación de fungicidas, que puede realizarse después de la cosecha y no afecta a la calidad del producto (Amiri *et al.*, 2008). Sin embargo, la utilización de productos químicos desde hace décadas para el control de enfermedades de las plantas ha provocado efectos indeseables que van desde el desarrollo de poblaciones de patógenos resistentes a su acumulación en el suelo, plantas y agua, afectando a los organismos vivos. El uso indiscriminado de productos químicos sintéticos ha conducido al desarrollo de resistencias que han requerido la utilización de concentraciones cada vez más altas del fungicida, con el consiguiente aumento de la toxicidad en los productos alimenticios. Por todo ello, el uso de fungicidas está restringido debido a sus efectos negativos en la salud humana y el medio ambiente.

Este escenario ha provocado que exista una demanda creciente en la búsqueda de nuevos productos activos y sustancias para el control de plagas con impactos negativos nulos o bajos (Rodríguez-González *et al.*, 2019). Recientemente, los pesticidas botánicos y extractos de plantas han mostrado un papel importante para el control de plagas debido a su bajo costo sin efectos residuales, amigables con el medio ambiente, alta disponibilidad y altamente tóxicos para muchos patógenos. Además, no es probable que provoquen resistencias debido a la complejidad de sus moléculas (Bedini *et al.*, 2020). La mayoría de los pesticidas sintéticos son dañinos para muchos agentes de

control biológico. Por lo tanto, el manejo integrado de plagas (MIP) que combina agentes de biocontrol y bioplaguicidas está ganando importancia y ha demostrado ser una estrategia de manejo ecológicamente segura bajo la cual los agentes de biocontrol pueden combinarse con extractos derivados de plantas (Kalita y Hazarika, 2018).

Reducir el uso y presencia de productos químicos no naturales en los alimentos se puede lograr con métodos alternativos como el uso de extractos de plantas que producen una amplia variedad de metabolitos. Estos extractos se pueden descomponer fácilmente (son biodegradables), son respetuosos con el medio ambiente y no son fitotóxicos. Se ha comprobado que los extractos de plantas obtenidos con diferentes disolventes son ricos en compuestos bioactivos y antioxidantes.

Los hongos patógenos de plantas más importantes que causan pudrición poscosecha incluyen a *Botrytis spp.*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Alternaria spp.*, *Fusarium spp.*, *Colletotrichum spp.*, y *Monilinia spp.* Entre ellos, *Colletotrichum spp.* es un patógeno que infecta frutos. Debido a su amplia variedad de hospedadores y su rápido crecimiento, *Colletotrichum spp.* causa manchas de antracnosis y síntomas de pudrición en frutas, lo que resulta en pérdidas económicas significativas.

La protección vegetal contra la antracnosis del olivo se basa en el manejo integrado de plagas, incluido el uso de productos químicos fitosanitarios con base de cobre, cultivares resistentes y una recolección precoz. Sin embargo, la ineficacia para controlar la enfermedad dicta la necesidad de que se requiere investigación para adquirir conocimientos relativos que puedan ser explotadas en el diseño de estrategias fitosanitarias avanzadas y optimizadas.

Actualmente, la antracnosis se trata o se previene predominantemente con fungicidas químicos como oxiclورو de cobre, hidróxido cúprico, benomilo,

tiofanato de metilo, carbendazima, tiabendazol y difenoconazol. La aplicación de fungicidas cúpricos sigue siendo la medida de control más utilizada para la antracnosis del olivo (Xavier, 2015) y suponen un gasto anual de unos 200 millones de euros al sector oleícola español (Trapero *et al.*, 2009). Esta prevalencia de los productos cúpricos se debe a que el uso de fungicidas orgánicos en postfloración está muy limitado ya que existe la posibilidad de que se absorban en el aceite del fruto al ser en su mayoría liposolubles (Moral y Trapero, 2009).

Como alternativa a los fungicidas químicos, para contrarrestar la antracnosis, se podrían usar microorganismos antagonistas. Sin embargo, la lucha biológica no ha sido empleada de forma comercial contra la antracnosis del olivo, aunque en inoculaciones artificiales de aceitunas, un aislado fúngico de *Aureobasidium pullulans* y dos bacterianos, *Curtobacterium flaccumfaciens* y *Paenibacillus polymyxa*, han mostrado una capacidad de inhibición del crecimiento superior al 50% (Segura, 2003) y también se conocen levaduras que han mostrado potencial de control biológico contra *C. gloeosporioides* (Pesce *et al.*, 2018).

El uso de extractos vegetales ha mostrado poca efectividad en el control de la antracnosis del olivo (Moral *et al.*, 2018). Sin embargo, el extracto de cáscara de granada (*Punica granatum* L.) se ha mostrado muy eficaz en tratamientos de aceitunas inoculadas con *Colletotrichum* (Pangallo *et al.*, 2017).

## **7. Síntesis verde de nanopartículas de plata utilizando el extracto acuoso de *M. longifolia* L.**

Una de las principales limitaciones que se dan durante la síntesis de nanopartículas es el uso de reactivos químicos para la reducción de las sales precursoras de las nanopartículas metálicas a sintetizar, que además de ser

tóxicas, generando contaminación para el medio ambiente, suelen ser costosas (Seyedeh *et al.*, 2020).

Se ha desarrollado una amplia variedad de métodos para sintetizar nanopartículas metálicas con diferentes morfologías, un ejemplo de ello es la reducción química obteniendo nanobarras (Rekha *et al.*, 2018), nanodiscos (Mahmoud, 2015) y nanotriángulos (Ardianrama *et al.*, 2019), la ablación láser para la obtención de nanoesferas (Kumar *et al.*, 2018; Boutinguiza *et al.*, 2015) así como métodos electroquímicos (Ravichandran *et al.*, 2019). Los métodos químicos son los más utilizados, por su facilidad para desarrollar procedimientos a gran escala, que permiten controlar adecuadamente el tamaño, forma y distribución de forma de las nanopartículas, y también porque son métodos precisos y se obtienen nanopartículas monodispersas (Mankad *et al.*, 2018). Sin embargo, estos métodos tienen un gran inconveniente al involucrar reactivos tóxicos que generan desechos nocivos para la salud y el medio ambiente (Lopes *et al.*, 2018).

Actualmente los métodos biológicos permiten utilizar organismos como bacterias, plantas y hongos para la síntesis de nanopartículas, logrando evitar el uso de reactivos tóxicos además de ser métodos efectivos, seguros y rentables (Kobashigawa *et al.*, 2018). Debido al desarrollo de nuevos métodos químicos o físicos, y la preocupación por la contaminación ambiental, ya que los procedimientos químicos involucrados en la síntesis de nanopartículas generan una gran cantidad de subproductos peligrosos, se ha tomado conciencia de la necesidad de utilizar la “Química verde” en la síntesis de nanopartículas, priorizando condiciones limpias, no tóxicas y respetuosas con el medio ambiente. En este sentido, se han utilizado bacterias, hongos o plantas como alternativas fáciles y viables frente a los métodos químicos o físicos disponibles (Konishi *et al.*, 2007; Borase *et al.*, 2014). Se han realizado estudios bioquímicos cualitativos que sugieren la participación de

diversos metabolitos vegetales como terpenoides, flavonoides, polifenoles, aminas, saponinas, aldehídos, cetonas, proteínas, arabinosa y galactosa en la síntesis de nanopartículas metálicas. En general, estos grupos funcionales funcionan como agentes reductores, ya que reaccionan con los iones metálicos de la sal precursora y, por lo tanto, reducen los iones metálicos a nanopartículas de diferentes formas y tamaños (Bhattacharya y Gupta, 2005).

La síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) se puede lograr utilizando el extracto de *Mentha longifolia* L. (Javed y Mashwani, 2020; Javed *et al.*, 2020a; Rauf *et al.*, 2021) y ha sido demostrada la actividad de estas nanopartículas como antibacterianas (Kalaki *et al.*, 2017; Rauf *et al.*, 2021) y anticancerígenas (Javed *et al.*, 2020b; Li *et al.*, 2020).

# ***OBJETIVOS***



## OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es analizar los posibles usos alternativos de la especie *Mentha longifolia* L. Para alcanzar este objetivo se va a analizar la capacidad antioxidante del extracto acuoso (Té) de *M. longifolia* L. Además, se realizará el análisis de la composición fitoquímica del té para identificar los diferentes metabolitos implicados en su capacidad antioxidante.

Entre los objetivos parciales del trabajo se encuentran:

- Incrementar la concentración de algunos fitoquímicos mediante la elicitación tanto biótica como abiótica en el cultivo de las plantas de *M. longifolia* L.
- Estudiar el posible uso del té de *M. longifolia* L. en el control biológico del hongo fitopatógeno responsable de la antracnosis del olivo, *C. gloesporoides*.
- Estudiar el posible uso del té de *M. longifolia* L. en la síntesis verde de nanopartículas de plata.

Con el fin de alcanzar estos objetivos, la presente tesis doctoral se estructura en tres capítulos:

CAPÍTULO 1: Capacidad antioxidante y análisis de compuestos fitoquímicos de *M. longifolia* L.

CAPÍTULO 2: Tratamiento de aceitunas con extractos acuosos de *Mentha piperita* L. y *Mentha longifolia* L. en el control de *Colletotrichum gloeosporioides* (*Gloeosporium olivarum*), patógeno responsable de la aceituna jabonosa.

CAPÍTULO 3: Síntesis verde de nanopartículas de plata con extractos acuosos de *Mentha piperita* L. y *Mentha longifolia* L. Papel de los principales antioxidantes vegetales en la biosíntesis.

# ***CAPÍTULO 1***



## CAPÍTULO 1: Capacidad antioxidante y análisis de compuestos fitoquímicos de *M. longifolia* L.

### RESUMEN

En este capítulo se analiza la capacidad antioxidante de *Mentha longifolia* L. y se realiza un análisis de los diferentes componentes que podrían estar implicados en la misma. Todos los resultados se analizan de forma comparativa con otra especie de menta, *M. piperita* L. La muestra de *M. longifolia* L. no mostró la elevada capacidad antioxidante (método DPPH) que sí se detectó en la muestra de *M. piperita* L. Para realizar el análisis de componentes responsables de esta actividad antioxidante, en primer lugar, se realizó un análisis preliminar de componentes mediante el espectro UV-Vis y diversos test fitoquímicos. A partir de esta aproximación, se detectó la presencia sobre de todo de compuestos fenólicos y en concreto de flavonoides. El contenido en compuestos fenólicos de la muestra de *M. longifolia* L. (en mg Ácido gálico/g peso seco) fue inferior al detectado en la muestra de *M. piperita* L. Sin embargo, si se valoró una mayor cantidad de flavonoides (en mg Rutina/g peso seco). El análisis mediante GC-MS ha permitido detectar una mayor presencia de 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6- metil-4H-pyran-4-ona (DDMP), fenilacetaldehido y mentofuranona en la muestra de *M. longifolia* L. El DDMP estaría implicado en la capacidad antioxidante, mientras que la mentofuranona y el fenilacetaldehido tendrían actividades antifúngicas.

# 1. INTRODUCCIÓN

Los fitoquímicos son compuestos biológicamente activos producidos por las plantas. Juegan un papel importante en su crecimiento y en los mecanismos de control y defensa ante competidores, patógenos y depredadores, así como en situaciones de stress.

El término, que proviene del griego (fito– planta), hace referencia a las sustancias químicas presentes de forma natural en los alimentos de origen vegetal y cuyos beneficios para la salud están siendo investigados en la actualidad. No obstante, se utilizan desde la antigüedad como venenos, curas y remedios.

Los principales retos que plantea su estudio son la dificultad a la hora de aislarlos y resolver su estructura, y determinar qué molécula es responsable de una acción biológica concreta.

La familia de los fitoquímicos es muy amplia y diversa. Entre ellos encontramos:

- Terpenos, funcionan como antioxidantes. Los más estudiados son:
  - Carotenoides que incluyen dos tipos de moléculas, carotenos y xantofilas se encuentran en los pigmentos amarillo, naranja y rojo de naranjas, perejil, tomates, espinacas...
  - Limonoides como el limoneno, pineno y eucalipto, presentes en las cáscaras de los cítricos, y el alcohol perilílico en las cerezas.
- Fitoesteroles, están presentes en cantidades significativas en las semillas de las plantas. Estudios realizados con semillas de soja, calabaza y arroz indican que pueden bloquear la absorción del colesterol.

- Fenoles, protegen a las plantas contra los daños oxidativos y son responsables de las coloraciones azules, azul-rojo y violeta propias de ciertas variedades de cerezas, uvas y berenjenas. La característica principal de los compuestos fenólicos (flavonoides e isoflavonas) es su habilidad para bloquear la acción de enzimas específicas que causan inflamación.
- Lignanós, presentes en semillas de lino, salvado de trigo, cebada y avena.
- Tioles, contienen azufre y están presentes en el ajo, cebollas puerros y las crucíferas. Son activadores de las enzimas de detoxificación hepática.
- Tocoferoles y tocotrienoles, los primeros se encuentran en semillas oleaginosas y en la corteza y en el germen de algunas semillas y cereales.
- Alcaloides, derivados de aminoácidos capaces de interactuar con el sistema nervioso como la cafeína, la nicotina, la cocaína o la morfina.

Algunos alcaloides, terpenos y fenoles pueden tener efectos negativos sobre la salud.

Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides.

La biosíntesis de los polifenoles como producto del metabolismo secundario de las plantas tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido siquímico y la ruta de los poliacetatos. La ruta del ácido siquímico proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina), y la síntesis de los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del

fenilpropano). La ruta de los poliacetatos proporciona las quinonas y la xantona (Quiñones *et al.* 2012).

Algunos polifenoles están implicados en funciones fisiológicas vegetales y otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (Quiñones *et al.*, 2012) por lo que se les atribuye propiedades antisépticas, antifúngicas y bactericidas (Okwu *et al.*, 2007). Una propiedad muy importante de los polifenoles es su capacidad antioxidante, capacidad de eliminar radicales libres, cofactores de enzimas antioxidantes, así como quelación de iones metálicos prooxidantes (Safdar *et al.*, 2017). Todo ello hace que los polifenoles desempeñen un papel muy importante en la prevención de patologías humanas y, por ello, presentan numerosas aplicaciones industriales como colorantes naturales, conservantes de alimentos o aplicándolos en la producción de pinturas, papel y cosméticos (Hayat *et al.*, 2010).

Los compuestos fenólicos son sustancias producidas por las plantas que contienen en su estructura química un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo. Debido a esta estructura, presentan un espectro de absorción muy intenso en la región UV. Son compuestos solubles en agua y frecuentemente se encuentran unidos a glúcidos. En la célula se localizan en las vacuolas. Son metabolitos secundarios producidos por las plantas para llevar a cabo diferentes funciones dependiendo del tipo de fenol: defensa frente a patógenos y herbívoros, atracción de polinizadores o absorción de radiación ultravioleta evitando la fotooxidación de las hojas, entre otras funciones (Harborne, 1973).

Los flavonoides, nombre que deriva del latín “flavus”, cuyo significado es “amarillo”, constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal. Los flavonoides son compuestos polifenólicos solubles en agua y que, generalmente, aparecen en las plantas unidos a azúcares formando

glicósidos. En su estructura aparecen varios anillos aromáticos y presentan una intensa absorción en el espectro UV y el visible. Los flavonoides aparecen en todas las plantas vasculares y desempeñan diferentes funciones en estas como defensa frente a herbívoros, resistencia a la fotooxidación, protección frente a hongos patógenos de plantas y transporte de fitohormonas como la auxina (Nijveldt *et al.*, 2001).

La determinación de la capacidad antioxidante y la composición química de una especie se puede realizar de forma comparativa con otra especie de uso similar para lograr valores relativos. En este caso las comparaciones se han realizado con *M. piperita* L.

*Mentha piperita* L. es una planta herbácea perenne rizomatosa que crece de 30 a 90 cm de altura con tallos lisos (Taneja y Chandra, 2012). Las hojas miden de 4 a 9 cm de largo y de 1,5 a 4 cm de ancho, de color verde oscuro con nervaduras rojizas, ápice agudo y márgenes dentados gruesos. Las hojas y los tallos suelen ser ligeramente peludos. Las flores son de color púrpura, de 6 a 8 mm de largo con una corola de cuatro lóbulos de unos 5 mm de diámetro. Se producen en verticilos alrededor del tallo, formando espigas romas y gruesas (Figura 3). La floración ocurre generalmente desde mediados hasta finales del verano. Híbrido natural estéril tetraploide de *Mentha aquatica* L. y *Mentha spicata* L. Se adapta bien a casi todos los climas (Figura 4), resistiendo hasta 15 °C. Crece estupendamente en suelos ricos en materia orgánica, algo húmedos y en semisombra.



Figura 3. Detalle de tallo, hojas y flores de *M. piperita* L.

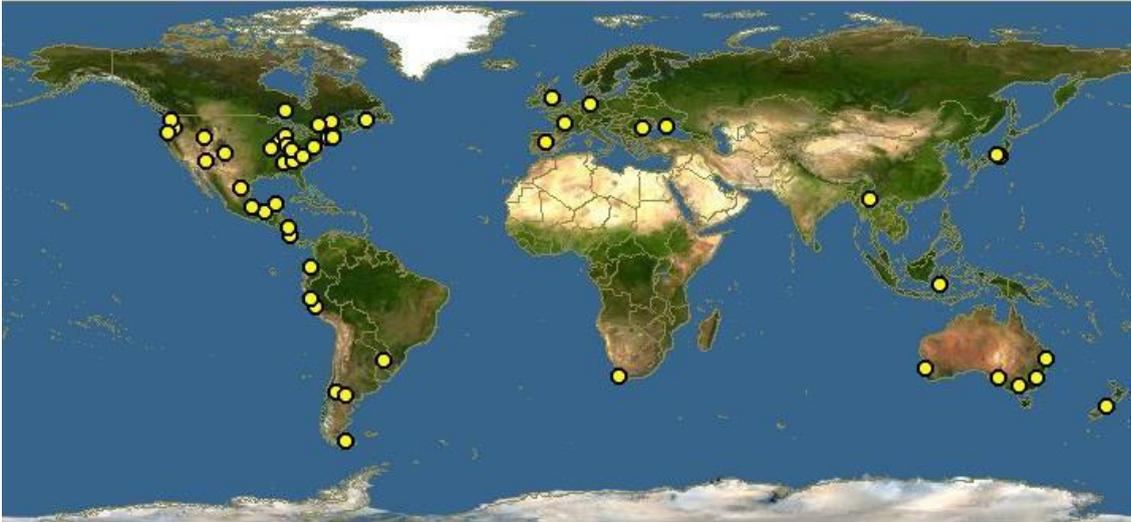


Figura 4. Área de distribución de *M. piperita* L. en el mundo y en España  
(Fuente: <https://www.discoverlife.org/20/q?search=Mentha+piperita>)

## 2. OBJETIVOS

Los objetivos de este capítulo son determinar la capacidad antioxidante y la composición del extracto acuoso de *Mentha longifolia* L. para determinar los metabolitos responsables de la misma.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal

Para realizar el análisis de los compuestos fitoquímicos y la capacidad antioxidante de *M. longifolia* L. se llevó a cabo un estudio comparativo con *M. piperita* L.

El material vegetal utilizado fueron hojas secas de ambas especies (*Mentha longifolia* L. y *M. piperita* L.) de origen comercial.

#### 3.2 Obtención del extracto acuoso de *M. longifolia* L. y *M. piperita* L.

El material vegetal de los dos tipos de Menta se congeló a -20°C durante 24 horas para posteriormente llevar a cabo su liofilización durante 24 horas.

Tras la liofilización, se trituraron en mortero las hojas liofilizadas hasta pulverizarlas y se procedió a la preparación de los extractos acuosos y metanólicos.

Los extractos acuosos se obtuvieron con 1 gr de material liofilizado y pulverizado en 100 mL de agua estéril hirviendo para la infusión. La infusión se filtró con papel de filtro estéril y se conservó a 4°C hasta su uso.

Los extractos metanólicos de material liofilizado y pulverizado fueron preparados a partir de 1g de material liofilizado y triturado en 20 mL de metanol (99%), en agitación durante 30 minutos.

Posteriormente, se centrifugó la suspensión durante 30 minutos a 5000 rpm. Tras la centrifugación se recuperó el sobrenadante y se almacenó en tubos

Falcon sellados, y se mantuvieron a 4°C en oscuridad hasta su posterior utilización.

### 3.3 Espectros UV-VIS

Para la obtención del espectro UV-Vis de los extractos obtenidos, se utilizó un espectrofotómetro de barrido UV-Vis provisto de un sistema óptico que permite obtener medidas de absorbancia o transmitancia, es decir, el grado de absorción de la luz por parte de la muestra. Esta técnica nos permite determinar el color de la muestra, haciendo posible inferir otras propiedades como la posible naturaleza de los componentes orgánicos (Porta *et al.*, 1999).

Los espectros de absorbancia se registraron en un rango entre los valores 1000 a 200 nm de longitud de onda con un intervalo de resolución de 2 nm.

### 3.4 Test fitoquímicos

Para determinar la presencia de compuestos fitoquímicos en los extractos de hoja de *M. piperita* L. y *M. longifolia* L. se realizó un test cualitativo de presencia/ausencia (Tabla 5) para la detección de saponinas, terpenoides, flavonoides, taninos, alcaloides, glicósidos, emodinas, antraquinonas y antocianinas (Yadav *et al.*, 2014):

Tabla 5. Test para la determinación de la presencia de fitoquímicos en los extractos acuosos de *M. longifolia* L. y *M. piperita* L.

<b>Fitoquímico</b>	<b>Test</b>	<b>Observación positiva</b>
Test de Saponinas (foam)	100 mg liofilizado 10 mL agua destilada Calentar	Formación de espuma
Test de Terpenoides (Salkowski)	100 µl extracto 2 mL cloroformo (CHCl <sub>3</sub> ) 3 mL Ácido sulfúrico concentrado (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Disco rojo o naranja en interfase
Flavonoides	100 µl extracto 1 mL hidróxido de sodio NaOH (1N) 1 mL Ácido Clorhídrico HCl(1N)	Desaparece el color amarillo al añadir HCl
Taninos	100 µl extracto Gotas de Cloruro de hierro FeCl <sub>3</sub> (60%)	Color verde
Alcaloides (Mayer)	1 mL extracto 2 mL HCl (2N) Agitar y esperar 10 minutos Gotas reactivas de Mayer	Precipitado color crema

Glicósidos (Liebermann)	200 µl extracto 2 mL cloroformo 2 mL acético (CH <sub>3</sub> COOH)	Color violeta, azul o verde
Emodinas	100 µl extracto 3 mL benceno (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> ) 2 mL hidróxido de amonio (NH <sub>4</sub> OH)	Color rojo o rosa
Antraquinonas (Borntrager)	100 µl extracto 3 mL benceno 5 mL Amoniacó (NH <sub>3</sub> )	Color rosa o violeta
Antocianinas	100 µl extracto 2 mL HCl (2N) 1 mL NH <sub>3</sub>	Color azul, violeta o rosa

### 3.5 Actividad Antioxidante (DPPH)

El barrido de radicales libres se midió como se describe por Brand-Williams *et al.* (1995). Se prepararon una serie de soluciones del extracto en metanol al 80% en el intervalo de concentración de 0,01 a 1,0 mg/mL, y el DPPH en la concentración de 0,3 mM en metanol al 80% con el propósito de la determinación de la actividad antioxidante.

Se mezclaron 0,3 ml de la solución de extracto de cada concentración y 2 mL de DPPH. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente en oscuridad, la absorbancia se midió a 517 nm de longitud de onda en el espectrofotómetro.

La capacidad de neutralizar los radicales libres se calcula según la siguiente ecuación:

$$I_{\text{DPPH}} \% = [(Abs_{\text{control}} - (Abs_{\text{muestra}} - Abs_{\text{blanco}})) / Abs_{\text{control}}] \times 100$$

### 3.6 Determinación del contenido total de compuestos fenólicos

El ensayo Folin-Ciocalteu se utilizó como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. El contenido total de compuestos fenólicos en los extractos se determina de acuerdo con el reactivo de Folin-Ciocalteu (FC) utilizando el ácido gálico como el estándar.

La solución de extracto en metanol 80% (0,1 mL de extracto) se mezcló con el reactivo de FC (0,5 mL) y una solución acuosa de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (4 mL, 7.5%) después de 30 min de incubación a temperatura ambiente, la absorbancia del compuesto se midió a 765 nm mediante un espectrofotómetro.

El contenido total de fenólicos se expresó como mg de ácido gálico/g de peso seco y se calcula usando la ecuación de la curva estándar ( $r^2=0,996$ ):

$$Abs_{765} = 12.722[\text{Ácido gálico } (\mu\text{l/mL})] + 0.0034$$

### 3.7 Determinación del contenido total de flavonoides

El contenido de los flavonoides totales en los extractos se determinó mediante el método espectrofotométrico que se basa en la producción de compuestos complejos de flavonoides con cloruro de aluminio.

Cada extracto de planta (2 mL) en metanol 80% se mezcló con 0,1 mL de cloruro de aluminio y 0,1 mL de acetato potásico y 2,8 mL de agua destilada.

Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, la absorbancia de la mezcla de reacción se midió a 415 nm en relación con el agua destilada.

La rutina fue elegida como el estándar y el contenido total de flavonoides se expresó como  $\mu\text{l}$  de rutina / g de extracto seco, y se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{Abs}_{415} = 7.2328 [\text{Rutina } (\mu\text{l}/\text{mL})] - 0.2286$$

### 3.8 Análisis cualitativo mediante GC-TOF

Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases 7890A (Agilent) acoplado a un espectrómetro de tiempo de vuelo GCT Premier (Micromass). Se introdujo 1  $\mu\text{L}$  de muestra en el inyector en modo dividido (relación 1: 5) a 250 °C. Los compuestos se separaron en una columna DB-wax UI (30 m 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ , Agilent). Se utilizó helio como gas portador con un caudal de 1 mL / min. La temperatura del horno se elevó de 60 °C a 90 °C a 15 °C / min, se mantuvo durante 5 min a 90 °C y se aumentó a 250 °C a 15

°C / min y se mantuvo durante 7 min. La fuente de iones utilizada fue el impacto de electrones y el intervalo de masas utilizado fue 50-500 m / z.

El análisis de los datos se realizó con el software Mass Lynx y la identificación de los metabolitos se realizó con los metabolitos con la biblioteca de espectros NIST MS 2.0. Este análisis se realizó en el Centro de Apoyo a la Investigación (CAI), Unidad de Espectrometría de Masas-UCM.

### **3.9 Análisis estadístico**

El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos en los experimentos realizados consistió en el análisis de la varianza mediante la realización de una ANOVA multifactorial, con la que se estableció si existía una diferencia significativa entre los distintos tratamientos, a la vez que nos aseguraba la inexistencia de datos aberrantes. Para dividir los resultados en grupos homogéneos se recurrió a un test de Duncan de múltiples rangos, considerando un nivel de significación de 0,05. Para todos los análisis se utilizó el programa estadístico STATISTICA 6.0.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Espectro UV-VIS

Las bandas de absorción en las regiones Ultravioleta y Visible que presentan los compuestos orgánicos se asocian con transiciones electrónicas en la capa de valencia. La Espectroscopia UV-Visible se ha aplicado en el campo de la elucidación de estructuras de compuestos orgánicos desde los años 40 del siglo XX y permanece como método válido para detectar con rapidez la presencia de insaturación conjugada, asociada siempre con intensa absorción en esta región del espectro. La presencia de bandas intensas en el espectro UV cercano o visible es una indicación clara de la presencia de este elemento estructural. En la literatura se pueden encontrar los espectros UV-Visible de cientos de miles de compuestos orgánicos.

La espectrofotometría ultravioleta-visible se encuentra entre las técnicas más utilizadas para la caracterización de compuestos en química analítica. Se trata de una técnica simple y robusta útil para realizar determinaciones analíticas en varias áreas. Por ejemplo, se puede utilizar en química orgánica para la cuantificación de compuestos polifenólicos en extractos naturales (Dos Santos Grasel *et al.*, 2016).

En el barrido espectroscópico de los extractos vegetales acuosos de las dos especies de menta destacan máximos de absorbancia en el rango de 300-380 nm en el caso de la *Mentha piperita* L. (figura 5a) y de 300-360 nm en el caso de la *Mentha longifolia* L. (figura 5b). En ambos espectros se ven picos entre los 300 y los 360 nm de longitud de onda. Sin embargo, en *M. piperita* L. se muestra un pico a 370 nm (6) y otro a 380 nm (7) de longitud de onda (Figura 5).

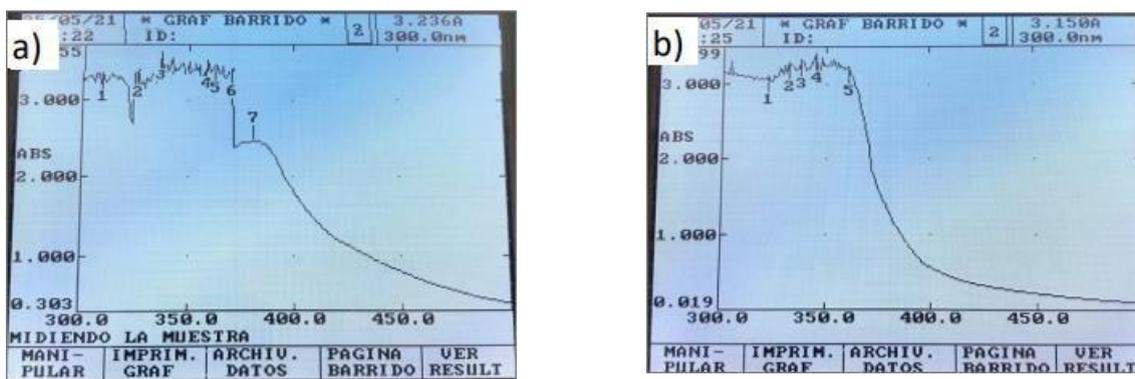


Figura 5: Espectro UV-Visible de los extractos acuosos. a) *Mentha piperita* L. b) *Mentha longifolia* L.

La región UV se define como el rango de longitudes de onda de 195 a 400 nm. Es una región de energía muy alta. Los compuestos con dobles enlaces aislados, triples enlaces, enlaces peptídicos, sistemas aromáticos, grupos carbonilos y otros heteroátomos tienen su máxima absorbancia en la región UV, por lo que esta es muy importante para la determinación cualitativa y cuantitativa de compuestos orgánicos.

En el estudio realizado por Adham (2015) se indica que ambas especies del género *Mentha*, presentan una alta concentración de alcaloides (siendo mayor en *Mentha longifolia* L. que en *Mentha piperita* L.) y una concentración moderada de saponinas, terpenoides, carbohidratos, glucósidos cardiotónicos, taninos y fenoles. Los alcaloides son compuestos orgánicos naturales de estructura cíclica que derivan de algunos aminoácidos. Los máximos de absorción entre 275 y 280 nm son causados por la absorbancia de los dos aminoácidos aromáticos triptófano (Trp) y tirosina (Tyr) y, en pequeña medida, por la absorbancia de cistina (es decir, de enlaces disulfuro) (Franz, 2001). En cuanto a los taninos, estos son transparentes en la región visible, absorben en la región ultravioleta ( $\lambda$  entre 204–284 nm). Los taninos absorben en la región característica aromática, siendo los anillos aromáticos los principales grupos cromóforos de estos extractos (Solomons y Fryhle,

2015). Los electrones conjugados del anillo aromático proporcionan absorciones características de intensidad moderada alrededor de la longitud de onda de 205 nm y una banda menos intensa en el rango de 250-275 nm. En consecuencia, el rango de análisis ( $\lambda < 300$  nm) de alcaloides y taninos mediante espectroscopía UV-Vis queda fuera del realizado en este trabajo.

Los resultados obtenidos en este trabajo en lo que se refiere al análisis espectroscópico UV-visible de los extractos acuosos de *Mentha piperita* L. y de *Mentha longifolia* L. muestran unos máximos de absorción en la región comprendida entre 300 y 380 nm que nos informa sobre la composición fitoquímica de los extractos de ambas especies, se trata de la región atribuida a los compuestos fenólicos. En estos rangos de absorbancia del espectro UV absorben los flavonoles, flavononas, isoflavonas, fenoles y emodinas según está descrito en los métodos fitoquímicos de Harbone (1973).

Estos resultados se pueden relacionar, en concreto, con la presencia de flavonoides. Los flavonoides son compuestos fenólicos diaril-propánicos, es decir, su estructura es del tipo C6-C3-C6, con dos anillos aromáticos (bencénicos) unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno (Figura 6a). De los tres anillos, el A se biosintetiza a través de la ruta de los policétidos y el B y la unidad C3 proceden de la ruta del ácido shikímico. Todos los flavonoides son estructuras hidroxiladas en el anillo aromático y, por tanto, son polifenólicas (López Luengo, 2002). La mayoría de los flavonoides exhiben dos principales bandas de absorción: la banda I (320-385 nm) representa la absorción de anillo B mientras que la banda II (250-285 nm) corresponde al anillo aromático A (Figura 6b).

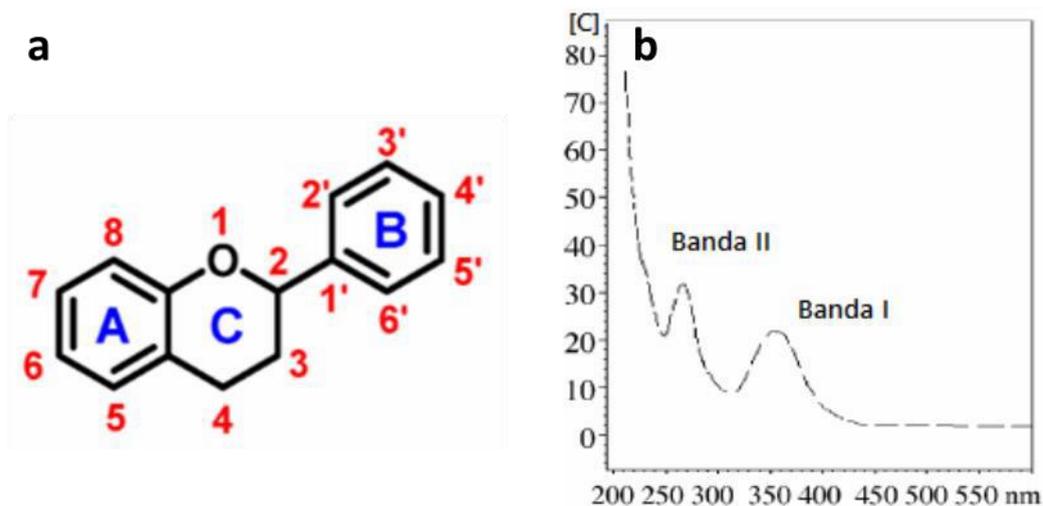


Figura 6. Flavonoides. a) Estructura básica de flavonoides que muestra los anillos A, B y C. b) Bandas características de los flavonoides (Fuente: Silva *et al.*, 2015).

En el análisis interespecífico ambas especies mostraron una absorción similar para las bandas 1 a 5, lo que puede estar relacionado con la superposición de absorción en esta región, el ensanchamiento de los picos de los espectros UV-vis de ambos extractos en esta región podría deberse a la presencia de numerosos metabolitos. Sin embargo, en la región de las bandas 6 y 7 ( $\lambda$  a 370 nm y 380 nm), *M. piperita* mostró valores de absorción significativamente diferentes a *M. longifolia*. Ese pico a aproximadamente 380 nm de longitud de onda podría pertenecer a la quercetina. La quercetina muestra un gráfico UV-Vis con dos picos más altos de 375 nm y 250 nm de longitud de onda respectivamente (Das *et al.*, 2020).

El uso de espectrofotometría UV-visible en el análisis de medios complejos es limitado debido a las dificultades inherentes a la asignación de los picos de absorción a cualquier constituyente particular del sistema. Por lo tanto, el análisis mediante el estudio del espectro UV-VIS debe complementarse con alguna otra técnica analítica, como GC / MS, etc., para permitir la caracterización de los extractos y la identificación de sus constituyentes.

## 4.2 Test fitoquímicos

Los compuestos fitoquímicos activos de *M. longifolia* L. y *M. piperita* L. fueron cualitativamente analizados para el extracto acuoso del material vegetal de ambas plantas mediante test fitoquímicos, los resultados se presentan en la Tabla 6. La detección de los fitoquímicos reveló algunas diferencias entre ambas especies de menta para todos los fitoquímicos analizados; *M. longifolia* L. mostro la ausencia de terpenoides, Taninos, Alcaloides, Glicósidos, Emodinas, Antraquinonas, Antocianinas, Saponinas, y solo era positivo para los Flavonoides, mientras que *M. piperita* L. mostró la ausencia de Terpenoides, Alcaloides, Glicósidos, Emodinas, Antraquinonas, Antocianinas, y era positivo en flavonoides y taninos. En este proceso de detección de los fitoquímicos de las plantas estudiadas, los flavonoides estuvieron presentes en ML con una concentración más elevado que en MP, y los taninos están presentes sólo en MP.

En los resultados de otro estudio (Adham, 2015), mostró que el uso de diferentes métodos de extracción y solventes afecta el porcentaje del rendimiento de diferentes extractos de tres especies de la familia Labiatae (*Mentha longifolia* L., *Mentha piperita* L. y *Ocimum basilicum* L.). Analizando el uso de diferentes disolventes, resultó que la cantidad de etanol al 80% extrae más que los extractos de n-hexano, ya que se encontró que el etanol tiene más facilidad de penetrar la membrana celular para extraer los ingredientes intracelulares del material vegetal (Wang, 2010), el etanol fue el más eficaz produciendo el mayor rendimiento de extracción (Bandar *et al.*, 2013). Según el estudio de Adham (2015), alcaloides, saponinas, fenoles, flavonoides, terpenoides, glucósidos cardioactivos, taninos y carbohidratos estaban presentes en el extracto etanólico 80% de las tres especies de Labiatae. Los flavonoides y glucósidos cardioactivos estaban presentes en *Ocimum basilicum* L. (albahaca) en niveles superiores de concentración

seguida por *Mentha longifolia* L. y luego *Mentha piperita* L., mientras que los alcaloides estaban presentes en mayor concentración en *Mentha longifolia* L. seguida por *Mentha piperita* L. y *Osimum basilicum* L. Se encontraron esteroides y glucósidos de antraquinona en *Osimum basilicum* L. solamente y estaban ausentes en otras plantas. Estos resultados contrastan con los obtenidos en este trabajo, la ausencia de Terpenoides, Alcaloides, Glicósidos, Emodinas, Antraquinonas, Antocianinas podrían deberse a que en este caso se ha analizado el extracto acuoso de las plantas estudiadas.

Tabla 6. Análisis cualitativo de extractos de metanol al 80% de hojas de *Mentha piperita* L. y *Mentha longifolia* L.

Test	<i>M. longifolia</i> L.	<i>M. piperita</i> L.
Terpenoides	-	-
Flavonoides	++	+-
Taninos	-	++
Alcaloides	-	-
Glicósidos	-	-
Emodinas	-	-
Antraquinonas	-	-
Antocianinas	-	-
Saponinas	-	-

### 4.3 Actividad Antioxidante (DPPH)

La capacidad antioxidante para los extractos obtenidos de *Mentha piperita* L. y *Mentha longifolia* L., muestra diferencias significativas entre ambas. En las plantas control la mayor capacidad se obtuvo para los extractos de *M. piperita* L. más del doble del obtenido para *M. longifolia* L. en extractos de plantas de una semana de edad y casi el triple en los obtenidos de plantas de dos semanas de edad (Figura 7).

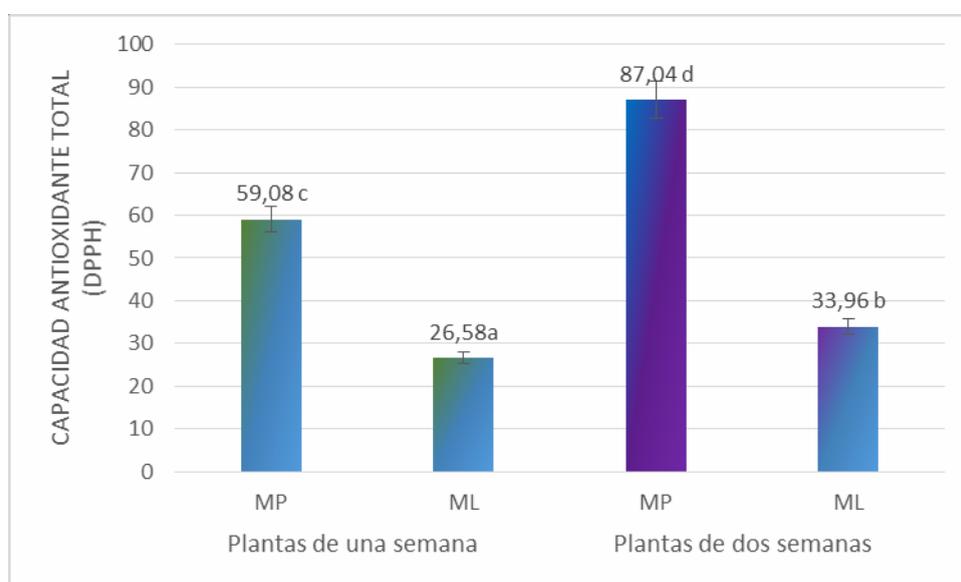


Figura 7. Capacidad antioxidante medida con el ensayo DPPH en plantas de una y dos semanas de edad de *M. piperita* L. (MP) y *M. longifolia* L. (ML). Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Duncan para  $p \leq 0.5$ .

La prueba de DPPH proporciona información sobre la reacción de los compuestos de ensayo con un radical libre estable. El DPPH presenta una fuerte banda de absorción a 517 nm en la región visible. La presencia de un antioxidante reduce la absorción y la solución de DPPH se decolora con un cambio de color de violeta oscuro a amarillo claro. El grado de reducción de

la medida de la absorbancia es indicativa de la potencia de captación de radicales (antioxidantes) del extracto. En el ensayo de DPPH, los antioxidantes fueron capaces de reducir el radical estable DPPH a color amarillo y esto es consistente con los resultados de nuestra prueba (Figura 7). Osman (2013), concluyó que *M. piperita* L. posee una fuerte actividad antioxidante y eso es debido al contenido de fenoles totales y flavonoides, ya que la especie es muy rica en comparación con otras especies cultivadas en diferentes regiones del mundo. Al-Ali *et al.* (2013) comprobaron que *M. longifolia* L. tiene una potente actividad antioxidante atribuida al contenido de compuestos flavonoides y Quercetin 3-O glycoside que apoyan la actividad antioxidante. En este caso los valores no son tan elevados, lo cual podría atribuirse al quimiotipo utilizado para el análisis o a una posible degradación de compuestos que podría producirse por efecto de la temperatura durante el secado de las hojas (Asekun *et al.*, 2007).

#### **4.4 Determinación del contenido total de compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos tienen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo y actúan como antioxidantes. En función de sus estructuras químicas, los compuestos fenólicos se pueden dividir en diferentes subgrupos, como ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, etc.

El ensayo demuestra que la *M. piperita* L. tiene un contenido de compuestos fenólicos más elevado que *M. longifolia* L. (Figura 8). Las concentraciones de fenoles en infusión generalmente son mayores que las del extracto de etanol (Bahadori *et al.*, 2018). La alta concentración de compuestos fenólicos en *M. longifolia* L. y *M. piperita* L. indica que tienen posibles beneficios para la salud. Esto está de acuerdo con trabajos anteriores que mostraron la presencia de alto contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en las dos especies de *Mentha* (Elansary y Mahmoud, 2015).

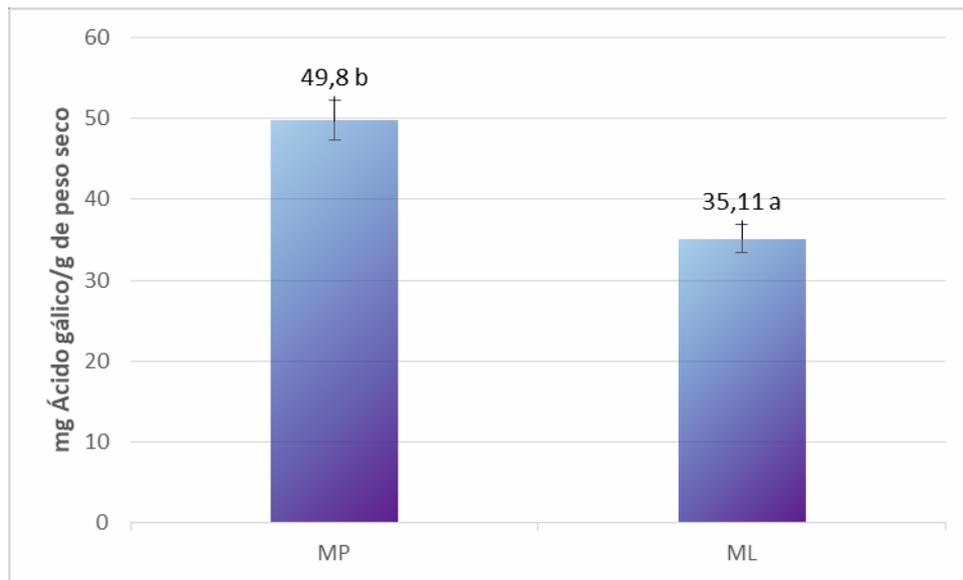


Figura 8. Contenido de fenoles totales calculado mediante el ensayo Folin-Ciocalteu plantas de *M. piperita* L. (MP) y *M. longifolia* L. (ML) de dos semanas de edad. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Duncan para  $p \leq 0.5$ .

Una reciente revisión de Čavar Zeljković *et al.* (2021) analiza el contenido en compuestos fenólicos de diferentes especies de *Mentha* de distintas localizaciones, entre las que se encuentran *M. piperita* L. y *M. longifolia* L. Según los datos publicados, *M. piperita* L. es bastante rica en compuestos fenólicos. En general, los valores del presente estudio se correspondieron con los encontrados en la literatura, aunque las diferencias podrían atribuirse a factores ambientales, factores fenológicos y genéticos. Por ejemplo, las plantas de origen mediterráneo, en general, poseen mayores cantidades de compuestos fenólicos en comparación con la misma especie cultivada bajo condiciones continentales. Sin embargo, los datos publicados pueden mostrar cierta disparidad derivada de problemas de metodología, como falta de información sobre la parte de la planta analizada o su estado fenológico. De hecho, las mayores variaciones en los datos disponibles se encontraron para

*M. piperita* L., lo cual es esperable dado que hay más cultivares diferentes de esta especie. Las especies de *Mentha* son ricas en compuestos fenólicos y especialmente en ácidos fenólicos. El ácido rosmarínico es el principal ácido fenólico que se encuentra en el género *Mentha*, seguido de la flavona luteolina y la flavanona eriocitrina.

*M. piperita* L. y *M. longifolia* L. se localizan en diferentes grupos de especies de *Mentha* cuando se analizan los diferentes compuestos fenólicos que poseen (Ćavar Zeljković *et al.*, 2021). *M. longifolia* L. presenta altos niveles de ácido clorogénico, ácido transcinámico y quercetina, y valores más bajos de ácido vainílico y rutina. Por otro lado, *M. piperita* L. muestra altos niveles de ácido 4-hidroxibenzoico, ácido salicílico, ácido salicílico-2-O- glucósido y los flavonoides naringenina y hesperidina.

#### 4.5 Determinación del contenido total de Flavonoides

El término flavonoide es generalmente utilizado para describir una amplia gama de productos naturales. Los flavonoides son parte de la clase de fitonutrientes polifenólicos con actividad antioxidante (Pietta, 2000; Rice-Evans *et al.*, 1976). Los flavonoides son uno de los mejores fitoquímicos que actúan como antioxidantes y así inhiben los factores causantes de enfermedades. La actividad antioxidante depende de la disposición de los grupos funcionales en el núcleo flavánico (Karak, 2019).

Hasta ahora se han identificado más de 4000 variedades de flavonoides. La estructura química básica del flavonoide es un esqueleto de difenil propano que contiene quince átomos de carbono en su núcleo primario: dos anillos unidos con una unidad de tres carbonos que puede o no ser parte de un tercer anillo (Middleton, 1984). Los anillos (A y B) están unidos entre sí a través de un tercer anillo de pireno heterocíclico que contiene oxígeno (Kuhnau,

1976). Por lo tanto, esta estructura C6-C3-C6 también se conoce como A, B y C (Figura 6).

Los flavonoides se dividen inicialmente en tres clases, dependiendo del sitio de unión del anillo B con el benzopirano (A): los flavonoides 1 (2-fenilbenzopiranos), isoflavonoides 2 (3-benzopiranos) y los neoflavonoides 3 (4-benzopiranos). Los flavonoides 1 (2-fenilpiranos), a su vez, dependiendo del grado de oxidación y saturación presente en el heterociclo se dividen en los siguientes grupos: Los isoflavonoides (3-benzopiranos 2) son una clase distintiva de flavonoides, estos compuestos poseen un esqueleto, 3-fenilcromano que es derivado biogénicamente de una migración 1,2-aril del precursor 2-fenilcromano. A pesar de su limitada distribución en el reino vegetal, los isoflavonoides son notablemente diversos en cuanto a sus variaciones estructurales, no sólo en el número y complejidad de los sustituyentes sobre el sistema básico, también en los diferentes niveles de oxidación y en la presencia de un heterociclo adicional.

En función de sus características estructurales los flavonoides se pueden clasificar en:

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

De acuerdo con la nomenclatura de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) pueden clasificarse, según su esqueleto y vía metabólica, en:

- Flavonoides, derivados de la estructura 2-fenilcromen-4-ona (2-fenil-1,4-benzopirona).
- Isoflavonoides, derivados de la estructura 3-fenilcromen-4-ona (3-fenil-1,4-benzopirona).
- Neoflavonoides, derivados de la estructura 4-fenilcumarina (4-fenil-1,2-benzopirona).

Los flavonoides son abundantes en las especies del género *Mentha*. Las flavanonas ("flavonoides cítricos") suelen ser una subclase importante de flavonoides en las mentas, junto con las flavonas (Pereira y Cardoso, 2013). Con respecto a *M. longifolia* L. los datos sobre ellos son esporádicos y la mayoría de las referencias informan solo la presencia de estos compuestos (eriocitrina, hesperidina y narirutina) sin datos cuantitativos.

Las flavanonas son compuestos relativamente extendidos en las mentas, pero una flavanona especial, longitina, se ha detectado en una muestra de *M. longifolia* L. de Pakistán (Ali *et al.*, 2002).

Las flavonas son una subclase de flavonoides que muestra una variabilidad muy amplia en las muestras de *M. longifolia* L. Entre ellas destacan algunos compuestos que se han detectado especialmente en *M. longifolia* L. Una nueva aglicona con un poco convencional patrón de sustitución, 5,7,40-trihidroxi-6,20,30-trimetoxi-flavona, fue detectada por Ghouami *et al.* (2001) de Marruecos. Además, una baja concentración de otra nueva aglicona, 5,8,40-trihidroxi-6,7,30-trimetoxi-flavona, que fue encontrada por Jahan *et al.* (2001) en Pakistán. Además, tres derivados de la tricetina desconocidos se han detectado en una muestra de *M. longifolia* L. de Arabia Saudita (Sharaf *et al.*, 1999). Según los autores, es la primera cita sobre

flavonas con el anillo B trisustituido en el conjunto de la familia *Lamiaceae*.

Los flavonoles están presentes con frecuencia en las especies de *Mentha*. La quercetina y el kaempferol junto con sus glucósidos son los que se notifican con mayor frecuencia en *M. longifolia* L.

Según los resultados obtenidos en este trabajo (Figura 9) *M. piperita* L. y *M. longifolia* L. difieren poco en el contenido total de flavonoides.

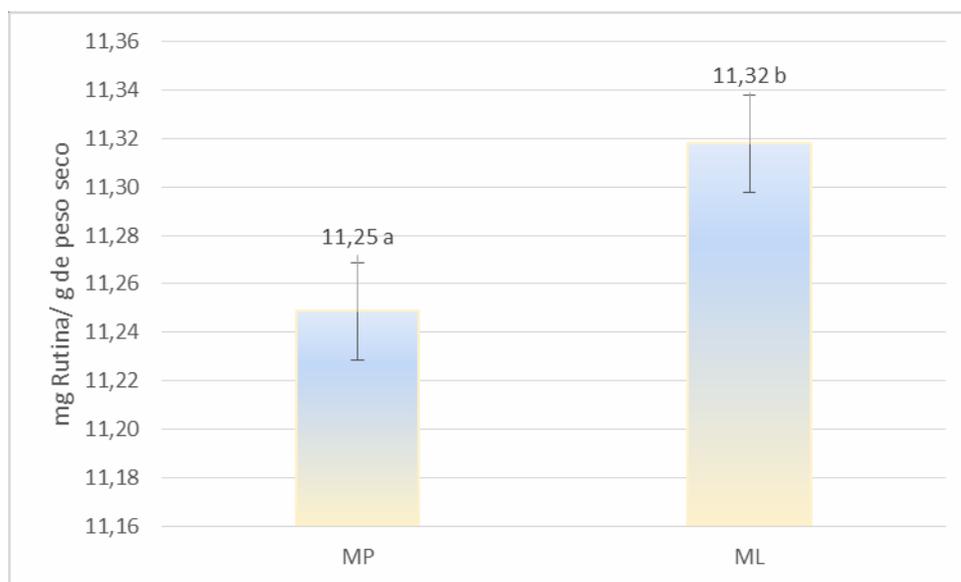


Figura 9. Contenido de flavonoides en plantas de *M. piperita* (MP) y *M. longifolia* (ML). Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Duncan para  $p \leq 0.5$ .

Los flavonoides, abundantes en la mayoría de las especies vegetales, se utilizan ampliamente en la medicina y en los estudios de desarrollo de fármacos fitoterapéuticos debido a sus diversas actividades biológicas. En el estudio de Baris *et al.* (2011), se aislaron en *Mentha longifolia* L. Hudson los flavonoides, apigenina-7-O-glucósido, apigenina-7-O-rutinósido y apigenina-7-O-glucurónido.

#### 4.6 Análisis cualitativo mediante GC-TOF

Existen muchas referencias bibliográficas en cuanto la composición, y los compuestos mayoritarios de las especies de menta, mediante el uso del extracto metanólico y etílico de las hojas de la menta analizándolo con el método GC-MS (Patonay y Nemeth-Zamborine, 2021). En nuestro estudio hemos optado por un análisis del extracto acuoso de la parte aérea de la planta.

La composición está considerablemente influenciada por factores ambientales como la temperatura, el fotoperíodo, la nutrición, la salinidad, el agua, el estrés, la edad de la planta, la cosecha y el tiempo de siembra (Charles *et al.*, 1990).

Monoterpenos como pulegona, mentona, isomentona, mentol, 1,8-cineol, borneol y piperitenona han sido reportados como los principales compuestos volátiles de *M. longifolia* (Mikaili *et al.*, 2013).

Los componentes principales del aceite de *M. piperita* L. que se informó anteriormente (Clark y Menary, 1980) incluyen mentol (29 a 48%), mentona (20 a 31%), mentofurano (6,8%) y acetato de metilo (3 a 10%) que representan casi 90% del total de aceites esenciales. La actividad antibacteriana se asocia al aporte del mentol (İşcan *et al.*, 2002).

A continuación, en la tabla 7, se muestra la composición química para cada uno de los extractos acuosos de los dos géneros de la menta estudiado: *M. piperita* L. y *M. longifolia* L.

Tabla 7. Compuestos identificados en *M. piperita* L. y *M. longifolia* L. mediante cromatografía de gases bidimensional de tiempo de vuelo GC–TOF, donde R-match, la coincidencia entre los valores de los índices de retención experimentales y de referencia, y RT, es el tiempo de retención. En rosa se señalan compuestos con valores similares entre ambas especies, en turquesa los que presentan mayores valores en *M. piperita* L. (MP) y en verde los que presentan mayores valores en *M. longifolia* L. (ML).

RT	Name	Rmatch	Area MP (ua)	Area ML (ua)
8.271	3methylcyclohexanone	732	244	
10.384	Methylformiate	984	533	556
10.607	Menthofuran	890	304	61
12.653	Phenyl-acetaldehyde	889	345	676
12.756	Pulegone	838	331	
12.896	2-methyl butanoic acid	810	221	
13.532	Methoxy-phenyl-oxime	862	582	
13.760	5-hexyn-3-ol	804	290	
15.061	2-methyl-2-(3-methyl-oxobutyl)-1-cyclohexanone	719	269	
15.154	Acrylamide	949	301	
15.258	Piperitenone	813	804	

15.686	(2Z)-(3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-ydiere)ethanenitrile	791	1313	
16.131	2-pyrrolidione	880	1348	221
17.159	o-acetyl-p-cresol	879	525	51
17.743	dihydro-4H-pyran-4-one	889	440,238	511
18.022	Glycerol	868	976,328	207
18.120	Mint furanone	812	398.873	879
18.498	Diethyl phtalate	909	766,146	601
18.637	Dihydrobenzofuran	854	2200,426	

En el extracto de *M. longifolia* L. destacan los mayores contenidos en Fenilacetaldehído, Mento furanone y 3,5-dihydroxy-6-methyl-2,3-dihydro-4H-pyran-4-one (Tabla 7).

## Fenilacetaldehído (Phenyl-acetaldehyde)

Fórmula molecular: C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O

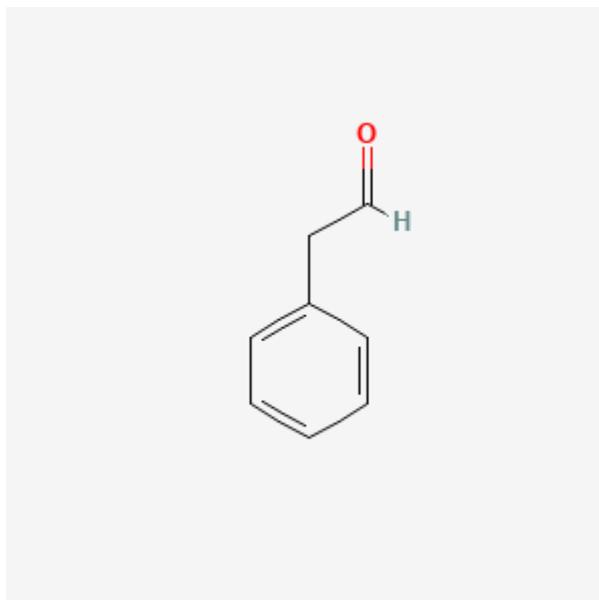


Figura 10. Estructura química del fenilacetaldehído. Fuente: National Center for Biotechnology Information (2021).

Este elemento se utiliza como potenciador del sabor, agente aromatizante o adyuvante alimenticio. El fenilacetaldehído es un componente volátil de varios aceites esenciales. La presencia de este compuesto aromático ha sido citada como componente del aceite esencial de *M. longifolia* L. aunque en pequeñas cantidades (Sharopov *et al.*, 2012).

Se produce la degradación de la L-fenilalanina a fenilacetaldehído y dióxido de carbono. El fenilacetaldehído es un producto intermedio en la fermentación del té (Saijō y Takeo, 1970) que se produce por la degradación de Strecker que es una reacción química que convierte un  $\alpha$ -aminoácido en un aldehído.

El fenilacetaldehído se ha utilizado en formulaciones fungicidas para el control postcosecha de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en mango (Kumar y Kudachikar, 2019).

## Mento furanona (Mint furanone)

Fórmula molecular:  $C_{11}H_{16}O$

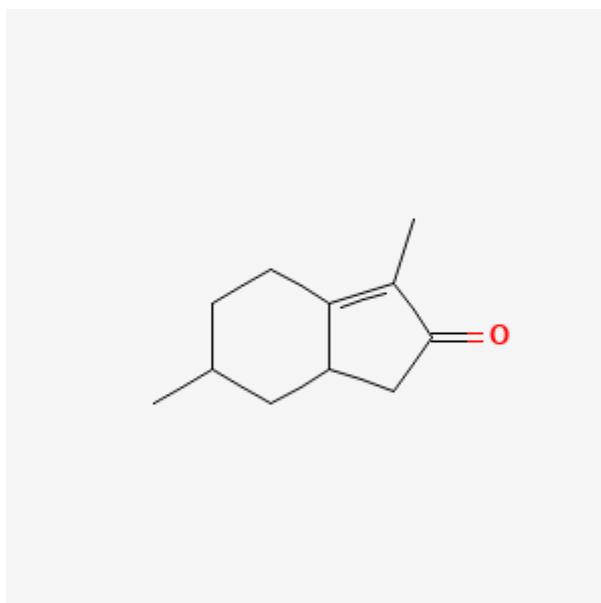


Figura 11. Estructura química de la mentofuranona. Fuente: National Center for Biotechnology Information (2021).

La mentofuranona es un policétido aromático, que son metabolitos secundarios que se encuentran ampliamente distribuidos en bacterias, hongos y plantas y son bien conocidos por sus diversas estructuras químicas y funciones biológicas. Entre sus diversas bioactividades se encuentran su uso como antibacterianos, antifúngicos, antivirales y antiparasitarios.

**3,5-dihidroxi-6-metil-2,3-dihidro-4H-piranona(3,5-dihydroxy-6- methyl-2,3-dihydro-4H-pyran-4-one (DDMP).**

Fórmula molecular: C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>

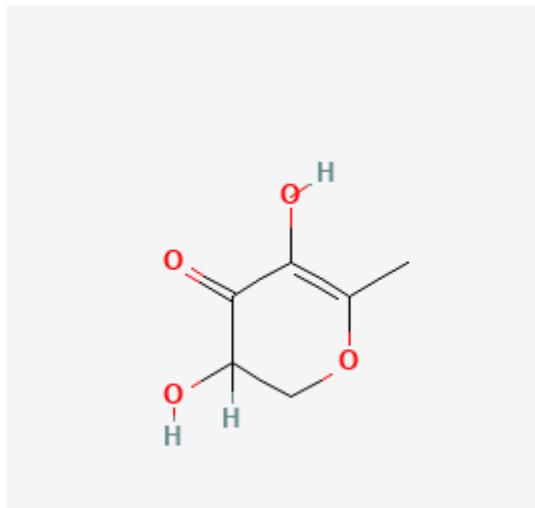


Figura 12. Estructura química de la 3,5-dihidroxi-6-metil-2,3-dihidro-4H-piranona. Fuente: National Center for Biotechnology Information (2021).

Este compuesto presenta una elevada capacidad electroquímica. Es un producto típico de transformación de hexosas de la reacción de Maillard, que se produce a temperaturas superiores a 75°C (Čechovská *et al.*, 2011). A raíz de los resultados obtenidos para el contenido en compuestos fenólicos, que no justificaría por sí sola la capacidad antioxidante detectada, se puede suponer que estos productos activos son componentes menores en la capacidad antioxidante, y el valor de la actividad antioxidante no podría atribuirse sólo a estos. Por lo tanto, parte de la capacidad antioxidante del extracto acuoso (té) de *M. longifolia* L. se atribuirían a este producto (DDMP), de forma similar a lo que ocurre en las ciruelas secas que se producen por tratamientos a alta temperatura (Čechovská *et al.*, 2011).

El DDMP es un producto de la reacción de Maillard que tiene lugar entre el grupo carbonilo de azúcares y el grupo amino de proteínas y otros compuestos nitrogenados. Por ejemplo, el sabor amargo de *Cynodon dactylon* L. y muchas especies de plantas se debe a la presencia de saponinas que

contienen DDMP (Mozafari *et al.*, 2018). Las especies del género *Mentha* también contienen azúcares y saponinas, (Padmini *et al.*, 2008; Adham, 2015).

La cantidad de metilformiato es similar entre las muestras de ambas especies.

### **Metilformiato (Methylformiate)**

Fórmula molecular:  $C_2H_4O_2$

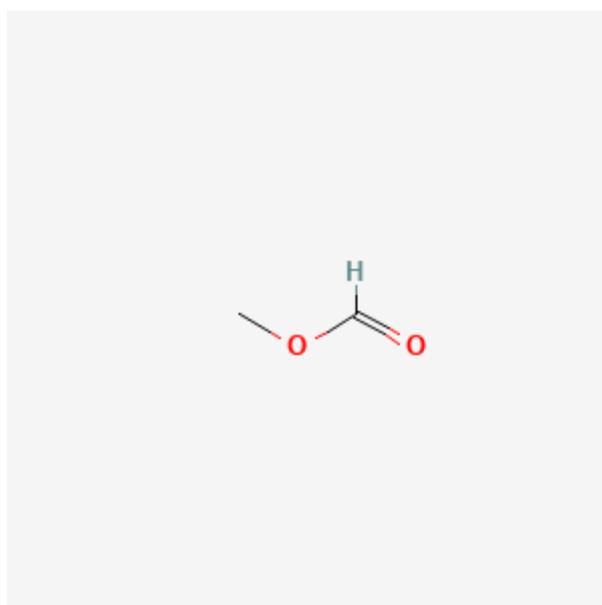


Figura 13. Estructura química del metilformiato. Fuente: National Center for Biotechnology Information (2021).

El formiato de metilo, también llamado metanoato de metilo, es el éster metílico del ácido fórmico. Son muy escasas las citas en la literatura de la presencia en plantas de *Mentha* (Chen *et al.*, 2011).

Por el contrario, se han detectado menores cantidades de mentofurano, 2-pirrolidiona, o-acetil-p-cresol, glicerol y dietil ftalato (Tabla 7).

## Mentofurano (Menthofuran)

Fórmula molecular:  $C_{10}H_{14}O$

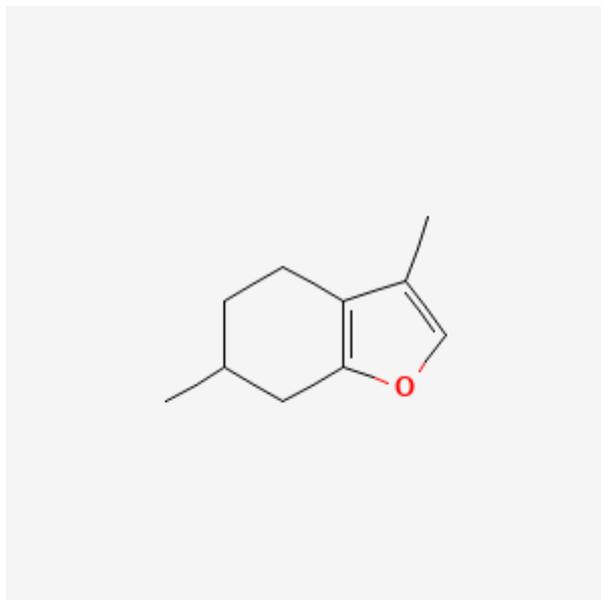


Figura 14. Estructura química del mentofurano. Fuente: National Center for Biotechnology Information (2021).

El monoterpeneo mentofurano se ha encontrado en poca cantidad en la muestra de *M. longifolia* (Tabla 7). La presencia de mentofurano está relacionada con la síntesis de pulegona (Mahmoud y Croteau, 2003) lo que se ratifica por la ausencia en la detección de pulegona en esta muestra. La pulegona es un insecticida natural que puede llegar a ser tóxico (Franzios *et al.*, 1997). Por su parte el mentofurano actúa como antifúngico (Boni *et al.*, 2016).

El mayor o menor contenido en mentofurano ha permitido establecer diversos quimiotipos de *M. longifolia* L. (Mimica-Dukic *et al.*, 1993; Viljoen *et al.*, 2006).

## 2-pirrolidione (2-pyrrolidione)

Fórmula molecular:  $C_4H_7NO$

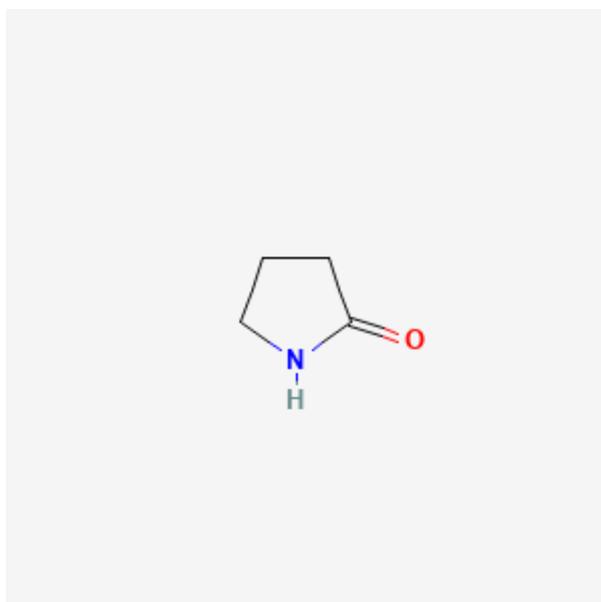


Figura 15. Estructura química de la 2-pirrolidiona. Fuente: National Center for Biotechnology Information (2021).

No hay datos disponibles sobre la 2-pirrolidinona en especies del género *Mentha*, sin embargo, se sabe que la fracción rica en la misma de las hojas de *Brassica oleracea* var. capitata ha mostrado actividades antioxidantes y anticancerígenas *in vitro* (Thangam *et al.*, 2013).

### **o-acetil-p-cresol (o-acetyl-p-cresol)**

Fórmula molecular:  $C_9H_{10}O_2$

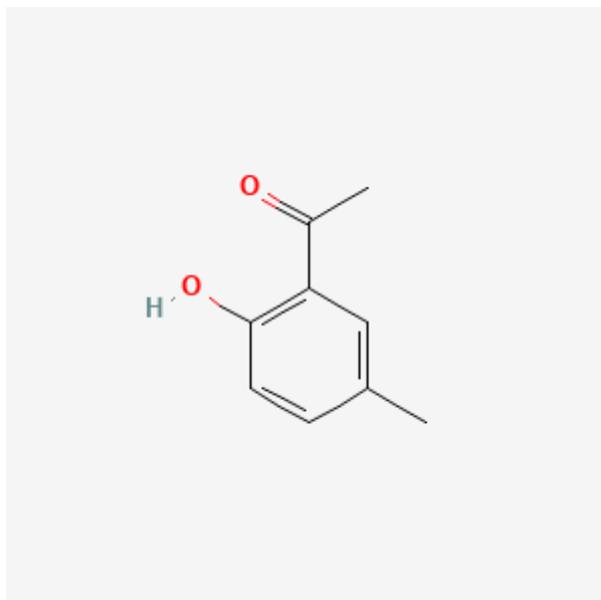


Figura 16. Estructura química del o-acetil-p-cresol. Fuente: National Center for Biotechnology Information (2021).

Este elemento es responsable del aroma de las mentas y los resultados muestran diferencias fundamentales entre las muestras de *M. piperita* L. y *M. longifolia* L. (Tabla 7). Estas diferencias entre especies de un mismo género ocurren también en especies del género *Citrus* (Guo *et al.*, 2018). Se encuentra catalogado por la FEMA (Flavor and Extract Manufacturers Association) con el número 4594. Su uso como aditivo está regulado por la JECFA (2011).

## Glicerol (Glycerol)

Fórmula molecular:  $C_3H_8O_3$

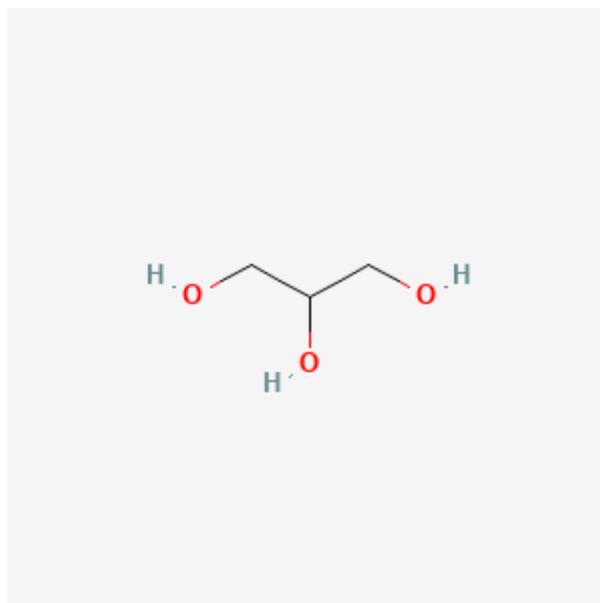


Figura 17. Estructura química del glicerol. Fuente: National Center for Biotechnology Information (2021).

En plantas superiores y algas el glicerol puede ser un producto final directo de la fijación de dióxido de carbono o la glicolisis que requiere solo dos enzimas adicionales. Parte del glicerol observado en las plantas proviene de la síntesis de glicerol en la raíz y el transporte a las hojas y parte es producido en las hojas (Gerber *et al.*, 1988). Se encuentra catalogado por la FEMA (Flavor and Extract Manufacturers Association) con el número 2525. Su uso como aditivo está regulado por la JECFA (2002).

## Dietil ftalato (Diethyl phthalate)

Fórmula molecular:  $C_{12}H_{14}O_4$

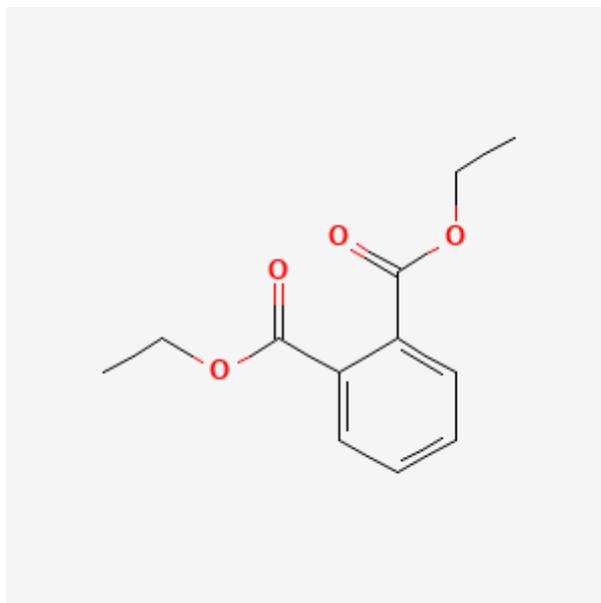


Figura 18. Estructura química del dietil ftalato. Fuente: National Center for Biotechnology Information (2021).

El ftalato de dietilo puede ser un eficaz repelente de insectos (Chen, 2005; Ataide *et al.*, 2020).

## 5. CONCLUSIONES

1. La muestra analizada de *Mentha longifolia* L. presenta menor actividad antioxidante que la muestra de *Mentha piperita* L.
2. Los compuestos fenólicos y, sobre todo los flavonoides, son responsables de parte de esta capacidad antioxidante de la muestra de *M. longifolia* L. tal y como se ha observado mediante el análisis del espectro UV-Vis, los tests fitoquímicos y la valoración de compuestos fenólicos totales (mediante el método de Folin-Ciocalteu) y de flavonoides (mediante el método espectrofotométrico).
3. Mediante el análisis GC-TOF se han identificado como componentes mayoritarios de la muestra de *M. longifolia* L. el fenilacetaldehído, la mentofuranona y el DDMP. Los dos primeros podrían proporcionar al extracto de la muestra de *M. longifolia* L. actividad antifúngica, mientras que el DDMP participaría también en la actividad antioxidante.



# ***CAPÍTULO 2***



## **CAPÍTULO 2: Tratamiento de aceitunas con extractos acuosos de *Mentha piperita* L. y *Mentha longifolia* L. en el control de *Colletotrichum gloeosporioides* (*Gloeosporium olivarum*), patógeno responsable de la aceituna jabonosa.**

### **RESUMEN**

Este estudio analiza el efecto del extracto acuoso de *M. longifolia* L. contra la antracnosis del olivo, enfermedad de la aceituna jabonosa, provocada por *C. gloeosporioides*. Para alcanzar este objetivo se realizó la comparación con otra especie de menta, *M. piperita* L. Además, se realizó la elicitación de la producción de metabolitos secundarios en las plantas de ambas especies mediante dos tipos de elicitores, el elicitor abiótico fue NaCl y el biótico *T. harzianum*. Se ha logrado inhibir el crecimiento del patógeno sobre las aceitunas mediante el extracto acuoso de *M. longifolia* L. Los síntomas de la enfermedad se redujeron cuando estas se sumergieron en el té, pero los resultados más prometedores se han logrado cuando el tratamiento realizado fue el uso de los volátiles del té de plantas de *M. longifolia* L. que habían sido sometidas al tratamiento de elicitación biótico con *T. harzianum* ya que no se visualizaron lesiones en las aceitunas, incluso en conservación a largo plazo.

Se han detectado 13 componentes en este extracto acuoso mediante el análisis de GC-MS. Los mayoritarios fueron p-cymen-2-ol, 1,2 epoxy-p- menthan-3-one, 2-pinen-4-one y mento furanona.

Estos resultados apoyan el potencial uso de este té como método de biocontrol del patógeno responsable de la antracnosis del olivo en postcosecha.

## 1. INTRODUCCIÓN

El aceite de oliva es el único aceite vegetal que se extrae de un fruto, todos los demás proceden de semillas. La palabra aceite deriva del nombre árabe “az-zait”, que significa “jugo de oliva”. El aceite de oliva se extrae por prensado en frío de la aceituna que se caracteriza por un color dorado o verdoso, elevada densidad y por poseer un perfumado aroma. Además de las propiedades organolépticas superiores del aceite de oliva (Kalua *et al.*, 2007), el cultivo del olivo está ganando popularidad debido a la creciente conciencia del público sobre los beneficios para la salud asociado al consumo de su aceite (Kolainis *et al.*, 2020).

Los principales países productores de aceite de oliva a nivel mundial son España (España es el primer productor mundial de aceite de oliva y aceituna de mesa), Italia, Grecia, Túnez, Turquía, Siria, Marruecos, Argelia y Portugal. En el Mediterráneo se produce el 98% del total de aceite de oliva y en la Unión Europea el 80% (International Olive Oil Council; 2021). La superficie olivarera ha aumentado notablemente en los últimos años en todo el mundo. Existen proyectos para expandir la superficie oleícola en nuevas zonas para este cultivo, como China, India, EE. UU. o Arabia Saudita.

Arabia Saudita es uno de los mayores consumidores de aceitunas y aceite de oliva, pero su contribución a la producción mundial de aceite de oliva es muy pequeña. El suelo y las condiciones climáticas del norte del Reino de Arabia Saudita, que se asemeja a la del clima mediterráneo, favorecen el cultivo del olivo y, por tanto, la producción de aceites de oliva con la misma alta calidad de los estándares internacionales. El área cultivada y la producción se están incrementando y en los últimos 15 años el Reino de Arabia Saudita se ha convertido en uno de los nuevos productores de aceite de oliva del mundo. En las últimas tres décadas, extensas plantaciones de olivo se han establecido en las partes del norte del país mediante el uso de material vegetal de propagación obtenido de países vecinos como Siria y Jordania (Al-Khalifah *et al.*, 2012),

donde muchos cultivares exóticos y autóctonos de aceitunas se cultivan extensamente (Al-Ruqaie *et al.*, 2016). De los ocho cultivares de olivos exóticos cultivados en Arabia Saudita, Koroneiki es de origen griego, cinco son españoles (Arbequina, Arbosana, Picual, Picual H-78, K-18) y Kaissy y Sorani tienen origen sirio. Estos cultivares, en el nuevo entorno desértico de Arabia Saudita, han mostrado variaciones significativas en su morfología y el contenido de ácidos grasos. El menor contenido de ácidos grasos que presentan, comparado con sus ubicaciones originales, se ha atribuido a una mayor temperatura y una humedad más baja durante el llenado del fruto (Al-Ruqaie *et al.*, 2016).

En cuanto a las características de calidad del aceite de oliva, debe existir un equilibrio entre diversos factores que la condicionan, como son el método de cosecha de la aceituna, el estado de madurez del fruto, la variedad, el sistema de extracción, el sistema de conservación y el medio de transporte, entre los más importantes (Di Giovacchino, 2003).

Las aceitunas deben ser tratadas o transformadas lo antes posible después de la recolección. Los frutos deben molturarse en el más breve espacio de tiempo posible, para obtener aceites de calidad a partir de frutos sanos. El atrojado (sabor y olor característico del aceite obtenido de aceitunas que han sufrido cierto grado de fermentación como consecuencia de permanecer amontonadas antes de la molturación o por estar en mal estado) es la principal causa del deterioro de la calidad de los aceites al producir grave alteración de los caracteres organolépticos, y elevada acidez (Jiménez *et al.*, 2002). Ya Columela (siglo I) en su tratado de Agricultura recomendaba la molturación inmediata: “*El fruto que se coja cada día, que se muele y se preñe al instante*”. El almacenamiento reduce el sabor afrutado del aceite como resultado de la reducción de compuestos fenólicos y aldehídos y este efecto se ve agravado con la presencia de patógenos.

Entre las enfermedades fúngicas que afectan al olivo se encuentran (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2014):

- El **Repilo** causado por *Fusicladium oleagineum* (*Spilocaea oleaginea*). Produce defoliación y, aunque es muy raro que este patógeno fúngico afecte al fruto, si lo hace afecta a la calidad del aceite.
- El **Emplomado** o repilo cobrizo causado por *Pseudocercospora cladosporioides*. Es una enfermedad poco frecuente que afecta a las hojas y, de llegar al fruto, puede producir caída prematura y afectar a la calidad del aceite.
- La **Verticilosis** causada por *Verticillium dahliae*. Se trata de un hongo del suelo que provoca apoplejía (muerte rápida de ramas o incluso del árbol completo) y decaimiento lento (con defoliación de hojas y, en ocasiones aparición de momias).
- El **Escudete** causada por *Bostryosphaeria dothidea*. Es una enfermedad de escasa importancia que afecta al fruto verde causando pequeñas lesiones redondeadas de color pardo en las que se forman puntitos de color negro lo que permite diferenciarla de otras enfermedades. También presenta momificado del fruto similar al de la Antracnosis.
- La **Lepra** causada por *Phlyctema vagabunda*. La enfermedad acaba causando el momificado del fruto que termina cayendo al suelo.
- La **Negrilla** causada por varios hongos entre los que destacan *Capnodium sp.*, *Limacinula sp.* y *Aureobasidium sp.* Se produce una película que impide la realización de la actividad fotosintética.
- La **Antracnosis o Aceituna jabonosa** causada por un complejo de especies fúngicas del género *Colletotrichum spp.* Los dos síntomas de esta enfermedad son la podredumbre de las aceitunas y la desecación de

las ramas. El síntoma más característico es la pudrición total o parcial de los frutos, sobre todo en frutos maduros. Las aceitunas se secan y caen al suelo o permanecen momificadas en las ramas. Esta enfermedad tiene un gran impacto en la calidad del aceite. La desecación y muerte apical de las ramas supone que no se formen nuevos brotes, síntomas que están asociados a la presencia de toxinas fúngicas.

La enfermedad más importante que afecta a la aceituna es la Antracnosis (Andrés, 1991; Trapero y Blanco, 2008; Moral *et al.*, 2009; Cacciola *et al.*, 2012), siendo además la que afecta más negativamente a la calidad del aceite (García, 1995, 1998; García *et al.*, 1997; Iannotta *et al.*, 1997; Mincione *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2008). Los zumos producidos a partir de los frutos afectados por antracnosis muestran alteraciones en su color (aceites colorados) y en sus cualidades químicas y organolépticas.

En ninguno de los estudios donde se aborda la influencia de la Antracnosis en la calidad del aceite de oliva se especifica la especie concreta de *Colletotrichum* involucrada (Moral *et al.*, 2014). El género *Colletotrichum* está compuesto por unas 600 especies que afectan a más de 3000 especies de plantas silvestres y cultivadas (Farr y Rossman, 2013). Está clasificado como el octavo grupo de hongos fitopatógenos más importante, desde el punto de vista económico, del mundo (Dean *et al.*, 2012). Entre las especies cultivadas afecta a numerosos cultivos leñosos (Prusky *et al.*, 2000), como: el olivo (*Olea europea* L.), el almendro (*Prunus dulcis* L.), el arándano (*Vaccinium spp.*), el mango (*Magnifera indica* L.), el melocotonero (*Prunus persica* L.), el aguacate (*Persea americana* L.) y los cítricos (*Citrus spp.*).

En el olivo, la enfermedad se detectó inicialmente en Portugal por Almeida (1899) y más tarde en España (donde es conocida como "aceituna jabonosa"). Actualmente, hay registros sobre su presencia en casi todos los países productores de aceite de oliva de la cuenca mediterránea (Moral *et al.*, 2017).

La infección primaria en el olivo ocurre durante la primavera pudiendo afectar a las inflorescencias, aunque en condiciones de campo tienen escasa importancia (Sergeeva *et al.*, 2008; Moral *et al.*, 2009). El patógeno también puede causar infecciones latentes (asintomáticas) en las aceitunas desde sus primeros estadios fenológicos (Moral *et al.*, 2009). La infección de las aceitunas se produce a temperaturas entre 10 y 30 °C, con un óptimo entre 17 y 20 °C, y se incrementa con el periodo de humectación (Graniti *et al.*, 1993; Oliveira *et al.*, 2005; Moral *et al.*, 2012). La epidemia suele iniciarse cuando las temperaturas están por debajo del óptimo lo que hace que la salida de la latencia del patógeno esté limitada. Como consecuencia, es frecuente que la incidencia de aceitunas con infecciones latentes sea entre dos y tres veces superior al de aceitunas con lesiones visibles (Moral y Trapero, 2012). En otoño, cuando las aceitunas infectadas cambian de color, el patógeno se reactiva causando la típica podredumbre de aspecto jabonoso (Cacciola *et al.*, 2012; Moral *et al.*, 2009). No se conocen los procesos que desencadenan la salida de latencia del patógeno, aunque las aceitunas disminuyen su resistencia con la madurez debido a la dinámica de compuestos fenólicos del fruto (Moral *et al.*, 2008). En etapas avanzadas de la infección, los frutos caen o permanecen en los árboles y se momifican. Estos últimos son considerados como las principales fuentes de inóculos para las infecciones que tendrán lugar a principios de la primavera. La incidencia de la enfermedad está relacionada con la tasa de maduración de las aceitunas y los síntomas se adelantan en olivos de cultivares susceptibles (Tabla 8) cuyas aceitunas maduran más rápido (Moral y Trapero, 2012).

Tabla 8. Susceptibilidad de las variedades de olivo a la antracnosis.

<b>Variiedad</b>	<b>Grado de susceptibilidad</b>
Alameño de Marchena	Resistente
Arbequina	Moderadamente susceptible
Arbosana	Resistente
Blanqueta	Altamente susceptible
Callosina	Altamente susceptible
Changlot Real	Susceptible
Cipressino	Susceptible
Cobrançosa	Resistente
Cornicabra	Altamente susceptible
Cornicabra de Mérida	Altamente susceptible
Dolce Agogia	Altamente resistente
Empeltre	Altamente resistente
Farga	Altamente susceptible
Frantoio	Altamente resistente
Galega Vulgar	Susceptible
Gordal Sevillana	Altamente susceptible
Hojiblanca	Altamente susceptible
Koroneiki	Altamente resistente
Leccino	Altamente susceptible
Lechín de Granada	Altamente susceptible
Lechín de Sevilla	Altamente susceptible
Manzanilla Cacereña	Moderadamente susceptible
Manzanilla de Agua	Altamente susceptible
Manzanilla de Guadix	Susceptible
Manzanilla de Hellín	Altamente resistente
Manzanilla de Jaén	Altamente susceptible
Manzanilla Sevilla	Altamente susceptible
Manzanilla de Tortosa	Susceptible
Manzanilla del Centro	Susceptible
Manzanilla del Piquito	Susceptible
Megaritiki	Altamente resistente
Meski	Altamente susceptible
Morisca	Altamente susceptible
Morrut	Moderadamente susceptible
Nabali	Resistente
Ocal	Altamente susceptible
Pajarero	Resistente
Pequeña de Casalbáñez	Altamente resistente
Perillo de Jaén	Altamente resistente
Picholine	Resistente
Picholine Marroquí	Altamente resistente
Picual	Resistente
Picual de Estepa	Altamente susceptible
Picual de Hoja Clara	Altamente susceptible
Picudo	Altamente susceptible
Picudo de Fruto Rojo	Altamente susceptible
Picudo de Montoro	Susceptible

Racimal de Jaén	Resistente
Sevillenca	Altamente susceptible
Verdial de Huévar	Susceptible
Verdial de Vélez-Málaga	Moderadamente susceptible
Villalonga	Altamente susceptible

Fuente: Moral *et al.* 2005

La protección contra la enfermedad se basa en la gestión integrada de plagas. Según la guía (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2014), los Aspectos Generales de la Gestión Integrada de Plagas incluyen:

1. En el control de plagas, enfermedades y malas hierbas se antepondrán, siempre que sea posible, los métodos biológicos, biotecnológicos, culturales y físicos a los métodos químicos. Estos métodos se utilizarán en el marco de estrategias que incluyan todos los aspectos de la explotación y del sistema de cultivo que favorezcan su control.
2. La evaluación del riesgo de cada plaga, enfermedad o mala hierba podrá realizarse mediante evaluaciones de los niveles poblacionales, su estado de desarrollo y presencia de fauna útil, fenología del cultivo, condiciones climáticas u otros parámetros de interés, llevadas a cabo en las parcelas sobre las que se ha de decidir una actuación. En el caso de cultivos que se realicen de forma similar en diversas parcelas, se podrá establecer que la estimación del riesgo se realice en unidades territoriales homogéneas mayores.
3. La aplicación de medidas directas de control de plagas y malas hierbas sólo se efectuará cuando los niveles poblacionales superen los umbrales de intervención, cuando estos se encuentren fijados. Salvo en los casos de intervenciones preventivas, las cuales deberán ser justificadas en cualquier caso.
4. En caso de resultar necesaria una intervención con productos químicos, las materias activas a utilizar se seleccionarán siguiendo el criterio de elegir aquellas que proporcionen un control efectivo y sean lo más compatibles posible con organismos no objeto de control, evitando perjudicar a

controladores naturales de plagas y a insectos beneficiosos como las abejas. Deberán presentar el menor peligro posible para humanos, ganado y generar el menor impacto para el medio ambiente en general.

Además, se tomarán las medidas oportunas para afectar lo menos posible a la biodiversidad, protegiendo la flora y la fauna en las inmediaciones de las parcelas. Las aplicaciones se realizarán con el equipo necesario y las condiciones climáticas adecuadas y evitando días lluviosos para minimizar riesgo de derivas de los productos fuera de las zonas a tratar.

En todo caso, sólo podrán utilizarse en cada momento productos autorizados para el uso pretendido inscritos en el Registro de Productos Fitosanitarios del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, y aprobados expresamente para el cultivo en que se apliquen. A fecha de hoy sólo hay tres materias activas autorizadas para la aceituna jabonosa en el cultivo del olivo: DODINA (comercializada por ARYSTA LIFESCIENCE BENELUX bajo dos formulaciones denominadas “Syllit Max” y “Syllit Flow”), PIRACLOSTROBIN (comercializada por BASF ESPAÑOLA S.L.U. bajo la formulación denominada “Cabrio”) y TRIFLOXISTROBIN (comercializada por BAYER CROPSCIENCE, S.L. bajo la formulación denominada “Flint”).

5. La aplicación de productos químicos se efectuará de acuerdo con sistemas de predicción y evaluación de riesgos, mediante las dosis, número y momento de la aplicación autorizados, tal y como se refleja en las etiquetas, siguiendo las recomendaciones e instrucciones dictadas por el asesor.

6. Se conservará un listado actualizado de todas las materias activas que son utilizadas para cada cultivo y en cada parcela y/o recinto SIGPAC. Este listado deberá tener en cuenta cualquier cambio en la legislación sobre fitosanitarios.

7. La presencia de residuos deberá minimizarse mediante cumplimiento estricto de los plazos de seguridad, para los que se encuentra autorizado el producto.

8. Con objeto de disminuir el riesgo de la contaminación proveniente de los restos de fitosanitarios que quedan en los envases de productos líquidos se efectuará un triple enjuagado de los mismos después de su empleo. El agua de enjuagado se añadirá al tanque de aplicación.

9. En el caso de que quede líquido en el tanque por un exceso de mezcla, o si hay tanques de lavado, éstos deben aplicarse sobre el mismo cultivo, siempre que no supere la cantidad de materia activa por hectárea permitida en la autorización del producto. No obstante, cuando estén disponibles, se dará preferencia a la eliminación de estos restos mediante instalaciones o dispositivos preparados para eliminar o degradar residuos de productos fitosanitarios, según lo dispuesto en el artículo 39 del Real Decreto 1311/2012. En el caso de no poder cumplir estas exigencias, se deberán gestionar por un gestor de residuos debidamente autorizado.

10. Los fitosanitarios caducados solamente pueden gestionarse mediante un gestor de residuos autorizado. Los envases vacíos deben entregarse a los puntos de recogida del sistema colectivo que los ampara o al punto de venta, previamente enjuagados tres veces cuando se trate de productos líquidos.

11. La maquinaria utilizada en los tratamientos fitosanitarios se someterá a revisión y calibrado periódico todos los años por el titular, así como a las revisiones oficiales establecidas en las disposiciones vigentes en la materia.

12. Los volúmenes máximos de caldo y caudal de aire en los tratamientos fitosanitarios se ajustarán a los parámetros precisos, teniendo en cuenta el estado fenológico del cultivo para obtener la máxima eficacia con la menor dosis.

13. Con objeto de reducir la contaminación de los cursos de agua se recomienda establecer y mantener márgenes con cubierta vegetal a lo largo de los cursos de agua/canales.

14. Con objeto de favorecer la biodiversidad de los ecosistemas agrícolas (reservorios de fauna auxiliar) se recomienda establecer áreas no cultivadas en las proximidades a las parcelas de cultivo.

15. Prácticas prohibidas:

- Utilización de calendarios de tratamientos, al margen de las intervenciones preventivas debidamente justificadas.
- Abandonar el control fitosanitario antes de la finalización del ciclo vegetativo del cultivo.
- El vertido, en el agua y en zonas muy próximas a ella, de líquidos procedentes de la limpieza de maquinaria.
- Aplicar productos fitosanitarios en condiciones meteorológicas desfavorables.

Se priorizarán siempre las medidas de prevención y/o culturales, seguidas por las medidas alternativas al control químico y por último los medios químicos.

En el caso de la Antracnosis en el olivar las medidas de prevención y culturales incluyen, en nuevas plantaciones, la utilización de variedades resistentes como “Picual” y “Frantoio” (ver Tabla 8) y evitar las altas densidades de plantación. El problema, en el caso del olivar, es la identificación que existe entre el cultivar y el aceite salvo que este se comercialice como aceite monovarietal. En cuanto a las técnicas culturales, es importante retirar los frutos afectados del suelo o ramas, o directamente eliminar las ramas con abundantes frutos momificados. En cuanto a la intervención, se recomienda tratar sólo si hay constancia de la presencia de la enfermedad, pudiendo hacerse tratamientos preventivos. Se incluye el uso de productos químicos fitosanitarios (los

fungicidas con base de cobre son los más comúnmente aplicados), aunque es preciso comprobar la pertinente autorización para su uso.

Sin embargo, la ineficacia para controlar la enfermedad indica que se requiere más investigación para adquirir conocimientos relativos que puedan ser explotados en el diseño de estrategias fitosanitarias avanzadas y optimizadas. Recientemente, se han desarrollado trabajos de biocontrol mediante el uso de agentes de control biológico como levaduras (Pesce *et al.*, 2018) y de extractos vegetales como el de cáscara de granada (Pangallo *et al.*, 2017).

Varias especies del género *Mentha* son conocidas por sus propiedades antifúngicas (Singh y Pandey, 2018). La efectividad de los tratamientos depende fundamentalmente de los metabolitos presentes en los aceites y extractos de estas especies.

Los metabolitos secundarios son conocidos por su capacidad para impedir el crecimiento de otros organismos, sobre todo microorganismos. Los metabolitos secundarios vegetales además de no presentar una función definida en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos. Presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies y algunos intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). La cantidad de estos metabolitos es un factor fundamental para establecer su actividad en el control de los hongos fitopatógenos (Freiesleben y Jäger, 2014).

La síntesis industrial de estos compuestos tiene un éxito limitado y, en consecuencia, el metabolismo secundario contribuye a la importancia

económica de las plantas, que pueden convertirse en biofábricas (Vasconsuelo y Boland, 2007). A pesar de los avances en el área de la biotecnología vegetal para la producción de metabolitos útiles, en la mayoría de los casos, los niveles obtenidos no permiten la producción comercial de compuestos naturales (Vasconsuelo y Boland, 2007). Sin embargo, la industria necesita un sistema de producción que garantice un producto funcional y rentable (Torres-Contreras *et al.*, 2014). Una estrategia biotecnológica sería la modificación del genoma vegetal para lograr la expresión de metabolitos de interés en diferentes especies (Marti *et al.*, 2020) o para incrementar la expresión de genes propios (Sanchez-Muñoz *et al.*, 2020; Samad *et al.*, 2020), pero esta alternativa es controvertida para la opinión pública.

La elicitación es un conjunto de técnicas en las que se somete las células a factores externos, induciendo mecanismos de defensa que en ocasiones incrementan la síntesis de metabolitos específicos. Dichos factores son llamados elicitors y se clasifican de acuerdo a su naturaleza, en bióticos y abióticos. La elicitación mediante la adición exógena de inductores en el medio de cultivo o mediante condiciones ambientales (estrés térmico, osmótico o ultravioleta) desencadena la respuesta al estrés con una mejora concomitante en la producción de metabolitos secundarios (Narayani y Srivastava, 2017; Thakur *et al.*, 2019).

En este trabajo se ha pretendido incrementar la cantidad de metabolitos secundarios en plantas de especies del género *Mentha* mediante tratamiento biótico como por ejemplo los producidos por organismos beneficiosos como *Trichoderma harzianum* y abiótico mediante estrés osmótico con tratamiento de NaCl.

El género *Trichoderma* fue descrito por Persoon en 1794. Posteriormente, Rifai hizo el primer agrupamiento en especies agregadas que se utiliza hasta el presente, a pesar de las dificultades que se presentan para la identificación de especies por este método, debido a la cercanía morfológica y la evolución de las

mismas. Son hongos saprofitos del suelo y la madera, de crecimiento muy rápido. Las especies de este género se encuentran ampliamente distribuidas por todas las latitudes, y se presentan naturalmente en diferentes ambientes, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición.

La acción de *Trichoderma* como micoparásito natural se demostró por Weindling en 1932, y su utilización en experimentos de control biológico se implementó a partir de 1970, cuando se incrementaron los estudios de campo para su uso en cultivos de hortalizas y ornamentales. No obstante, la información sobre su empleo en la producción agrícola es insuficiente y dispersa.

La capacidad de producir diversos metabolitos y de adaptación a diversas condiciones ambientales y sustratos, confiere a *Trichoderma* la posibilidad de ser utilizado en la industria biotecnológica. Una de las potenciales utilidades es la inducción de la producción de metabolitos secundarios en las plantas, entre los cuales se encontrarían antioxidantes (Vinale *et al.*, 2008).

La salinidad es un gran estrés que afecta adversamente el crecimiento de las plantas y a la producción de cultivos. Los tratamientos con NaCl provocan la deshidratación celular que provoca, a su vez, el estrés osmótico y la salida del agua del citoplasma provocando una reducción en el volumen del citoplasma y, como consecuencia, en el celular. El estrés iónico y/u osmótico generado en la planta por el cloruro sódico provoca la acumulación o reducción de metabolitos secundarios específicos (Tabla 9) en las plantas (Mahajan y Tuteja, 2005). Por ejemplo, el incremento del contenido en polifenoles en diferentes tejidos en plantas sometidas a estrés salino se ha demostrado en diversas especies vegetales (Bennet y Wallsgrave, 1994).

Tabla 9. Metabolitos secundarios en diferentes especies vegetales que alteran su cantidad por tratamiento con cloruro sódico. Adaptado de Parvaiz y Satyavati (2008).

<b>Metabolito secundario</b>	<b>Especie vegetal</b>
Sorbitol	<i>Lycopersicon esculentum</i>
GABA	<i>Sesamum indicum L.</i>
Flavonoids	<i>Hordeum vulgare</i>
Jasmonic acid	<i>Lycopersicon esculentum</i>
Polyphenol	<i>Cakile maritima</i>
Tropane alkaloids	<i>Datura innoxia</i>
Anthocyanins	<i>Grevillea spec.</i>
Trigonelline	<i>Glycine max</i>
Glycinebetaine	<i>Trifolium repens</i>
Polyamines	<i>Oryza sativa</i>
Glycine betaine	<i>Triticum aestivum</i>
Sucrose and Starch	<i>Cenchrus pennisetiformis</i>

## 2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es analizar la capacidad fungicida/fungistática del extracto acuoso de *M. longifolia* L. para el biocontrol de *C. gloeosporioides*, hongo responsable de la aceituna jabonosa o antracnosis, previo al procesamiento del fruto para la extracción de aceite en almazara.

Para lograr este objetivo general se han planteado los siguientes objetivos parciales:

- Elicitar la producción de diferentes metabolitos en plantas de *M. longifolia* L. mediante un elicitor biótico (*Trichoderma harzianum*) y otro abiótico (NaCl).
- Analizar el biocontrol de *C. gloeosporioides* por contacto directo con el extracto acuoso de *M. longifolia* L. y aceitunas.
- Analizar el biocontrol de *C. gloeosporioides* por contacto con los compuestos orgánicos volátiles del extracto acuoso de *M. longifolia* L. y aceitunas.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 El cultivo de plantas y el tratamiento inductor

En este experimento se germinaron dos especies de menta. Las semillas de *Mentha piperita* L. de origen comercial y las de *Mentha longifolia* L. fueron recolectadas en Al\_ Baha al sur de Arabia Saudí.

Se imbibieron las semillas con 50 mL agua estéril hasta su germinación en placas Petri con papel de filtro estéril, en cámara de cultivo a  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , con fotoperiodo 16 horas de luz/8 horas de oscuridad. Tras la emergencia de la radícula la humedad se mantuvo con 30 mL de agua estéril cada 3 días hasta que emergieron los cotiledones. Una vez germinadas las semillas, las plántulas fueron plantadas en semilleros con sustrato estéril y mantenidas en las mismas condiciones de cultivo.

A las cuatro semanas las plántulas fueron trasplantadas a macetas de aluminio de 500 mL; siete plántulas/maceta. Cada maceta constituye una unidad experimental (n). Todos los tratamientos se realizaron con tres réplicas y tres repeticiones (n=9).

Se mantuvieron en las mismas condiciones de cultivo una semana para su aclimatación al nuevo recipiente antes de comenzar los tratamientos.

Para los tratamientos se regaron las macetas con 10 mL de solución cada día. Las soluciones fueron las siguientes:

- 1.- Agua estéril para el tratamiento control.
- 2.- 0.2 mg de *Trichoderma harzianum* (Koppert) aplicados al sustrato el primer día y riego con agua estéril el resto de los días.
- 3.- 10 mL de una solución estéril de NaCl 0.5%.

### 3.2 Datos morfológicos

Los datos morfológicos que se tomaron de cada planta fueron los siguientes: peso seco, longitud del tallo, longitud de la raíz y número de hojas.

### 3.3 Obtención del extracto acuoso

Se recolectaron las hojas de las plantas y se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas previo a su liofilización durante 24 horas.

Tras la liofilización se trituraron en mortero las hojas liofilizadas hasta pulverizarlas y se procedió a la preparación del extracto acuoso. Los extractos acuosos se obtuvieron con 1 gr de material liofilizado y pulverizado en 100 mL de agua estéril hirviendo para la infusión. La infusión se filtró con papel de filtro estéril y se conservó a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Para su uso los extractos se filtroesterilizaron (Figura 19).



Figura 19. Protocolo de preparación de los extractos acuosos.

### 3.4 Actividad Antioxidante (DPPH)

El barrido de radicales libres se midió como se describe por Brand-Williams *et al.*, (1995). Se prepararon una serie de soluciones del extracto en Metanol al 80% en el intervalo de concentración de 0,01 a 1,0 mg/mL, y el DPPH en la concentración de 0,3 mM en metanol al 80% con el propósito de la determinación de la actividad antioxidante.

Se mezclaron 0,3 mL de la solución de extracto de cada concentración y 2 mL de DPPH. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente en oscuridad, la absorbancia se midió a 517 nm de longitud de onda en el espectrofotómetro.

La capacidad de neutralizar los radicales libres se calcula según la siguiente ecuación:

$$I_{\text{DPPH}} \% = [(Abs_{\text{control}} - (Abs_{\text{muestra}} - Abs_{\text{blanco}})) / Abs_{\text{control}}] \times 100$$

### 3.5 Determinación del contenido total de compuestos fenólicos

El ensayo Folin-Ciocalteu se utilizó como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. El contenido total de compuestos fenólicos en los extractos se determina de acuerdo con el reactivo de Folin-Ciocalteu (FC) utilizando el ácido galico como el estándar.

La solución de extracto en metanol 80% (0,1 mL de extracto) se mezcló con el reactivo de FC (0,5 mL) y una solución acuosa de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4 mL, 7.5%) después de 30 min de incubación a temperatura ambiente, la absorbancia del compuesto se midió a 765 nm mediante un espectrofotómetro.

El contenido total de fenólicos se expresó como mg de ácido gálico/g de extracto seco y se calcula usando la ecuación de la curva estándar:

$$\text{Abs}_{765}=12.722[\text{Ácido gálico } (\mu\text{l/mL})]+0.0034$$

### 3.6 Determinación del contenido total de flavonoides

El contenido de los flavonoides totales en los extractos se determina mediante el método espectrofotométrico, que se basa en la producción de compuestos complejos de flavonoides con cloruro de aluminio.

Cada extracto de planta (2mL) en metanol 80% se mezcló con 0,1 mL de cloruro de aluminio y 0,1 mL de acetato potásico y 2,8 mL de agua destilada.

Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, la absorbancia de la mezcla de reacción se midió a 415 nm en relación al agua destilada.

La rutina fue elegida como el estándar y el contenido total de flavonoides se expresó como mg de rutina / g de extracto seco, y se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{Abs}_{415}=7.2328 [\text{Rutina } (\mu\text{l/mL})]-0.2286$$

### 3.7 Análisis cualitativo de los extractos acuosos mediante GC-TOF

Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases 7890A (Agilent) acoplado a un espectrómetro de tiempo de vuelo GCT Premier (Micromass). Se introdujo 1  $\mu$ L de muestra en el inyector en modo dividido (relación 1: 5) a 250 ° C. Los compuestos se separaron en una columna DB-wax UI (30 m 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m, Agilent). Se utilizó helio como gas portador con un caudal de 1 mL / min. La temperatura del horno se elevó de 60 °C a 90 °C a 15 °C / min, se mantuvo durante 5 min a 90 °C y se aumentó a 250 °C a 15 °C / min y se mantuvo durante 7 min. La fuente de iones utilizada fue el impacto de electrones y el intervalo de masas utilizado fue 50-500 m / z.

El análisis de los datos se realizó con el software Mass Lynx y la identificación de los metabolitos se realizó con los metabolitos con la biblioteca de espectros NIST MS 2.0. Este análisis se realizó en el Centro de Apoyo a la Investigación (CAI), Unidad de Espectrometría de Masas-UCM.

### 3.8 Cultivo de *Colletotrichum gloeosporioides*

En la presente investigación, el patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* se obtuvo de la colección del Grupo de Investigación FiVe-A. El hongo se cultivó nuevamente en un medio sólido en el que se incubó por un mes a 28°C en oscuridad en la cámara del cultivo. El medio contenía 12 g de Maizena y 7,5 g de PDA en 500 mL de agua.

### 3.9 Tratamientos de aceitunas con extractos acuosos de plantas de *M. piperita* L. y *M. longifolia* L. mediante inmersión. Evaluación de los extractos acuosos en el control de *C. gloeosporioides*.

Se recolectaron aceitunas maduras en el mes de diciembre. Las aceitunas se pusieron en botes *meli* estériles con infusiones de *M. longifolia* L., *M. piperita* L. y, como especie ajena, *M. spicata* L. Las infusiones se prepararon según el apartado 3.3. Un total de 9 aceitunas se trataron en cada bote con el extracto correspondiente o el control con agua estéril. Previamente a sumergir las aceitunas en cada bote se realizó una asepsia en los frutos consistente en 1 minuto en etanol al 70% y tres lavados con agua destilada estéril. Se añadieron a cada bote tres discos miceliares de *Colletotrichum gloeosporioides* (causante de la enfermedad “aceituna jabonosa”) procedentes de cultivo (Figura 20). Todo el proceso se realizó en condiciones asépticas en cabina de flujo laminar. Se fueron tomando datos todos los días de los síntomas asociados a enfermedad en las aceitunas (aparición de micelios o manchas y/o podredumbres), durante cuatro semanas. Transcurrido este periodo se sacaron las aceitunas y se mantuvieron en placas Petri estériles y a condiciones ambientales durante una semana para valorar la aparición de síntomas, tomando datos en días alternos. De las aceitunas lavadas se obtuvo el aceite mediante procedimiento de extracción mecánica en frío.

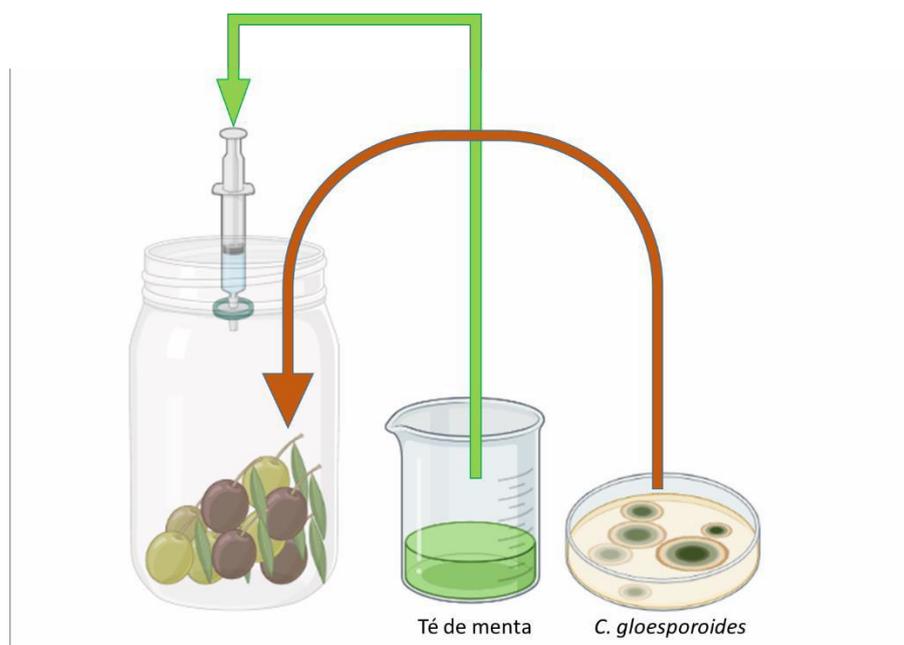


Figura 20. Protocolo de inoculación de *C. gloeosporioides* sobre aceitunas en el tratamiento de contacto directo (inmersión) con el extracto acuoso de *M. longifolia* L.

### 3.10 Tratamientos de aceitunas con extractos acuosos de plantas de *M. piperita* L. y *M. longifolia* L. sin contacto directo. Evaluación de compuestos orgánicos volátiles en el control de *C. gloeosporioides*.

Se recolectaron aceitunas maduras en el mes de diciembre. Las aceitunas se pusieron en botes *meli* estériles con infusiones de *M. longifolia* L. y *M. piperita* L.

Las infusiones se prepararon llevando 50 mL de agua estéril caliente con 1,50 g del material liofilizado y pulverizado, en este caso fueron 6 (*Mentha piperita* L., *Mentha piperita* L. tratada con NaCl, *Mentha piperita* L. tratada con *Trichoderma harzianum*, *Mentha longifolia* L., *Mentha longifolia* L. tratada con NaCl, *Mentha longifolia* L. tratada con *Trichoderma harzianum*).

Después se filtraron para eliminar restos de hoja y se esterilizaron con Filtros Jeringa Acetato de Celulosa Serie T de 20  $\mu\text{m}$  y se dejaron enfriar a temperatura ambiente hasta su uso.

Previamente antes de poner las aceitunas en cada bote, se realizó una asepsia en los frutos, consistente en 1 minuto en etanol al 70% y tres lavados con agua estéril. Se añadieron a cada bote tres discos micelares de *Colletotrichum gloeosporioides* (causante de la enfermedad “aceituna jabonosa”) procedentes de cultivo en PDA de un mes de antigüedad. Todo el proceso se realizó en condiciones asépticas en cabina de flujo laminar.

Después de filtrar las infusiones, y poner cada infusión filtrado en un bote, se colocó una rejilla de plástico y se pusieron nueve aceitunas encima de cada una, para examinar el efecto de los compuestos orgánicos volátiles en proteger las aceitunas del hongo (figura 21).

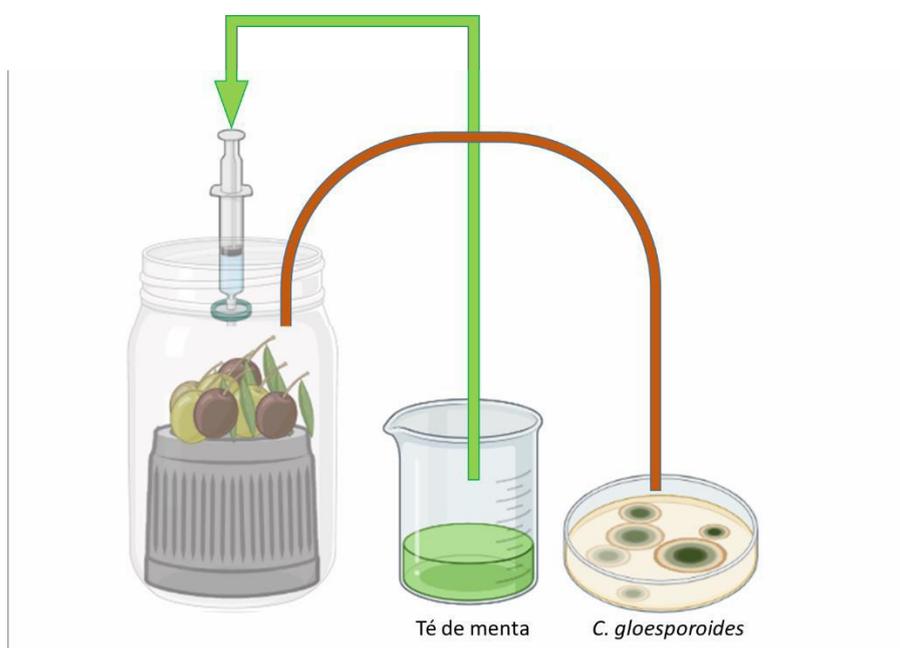


Figura 21. Protocolo de inoculación de *C. gloeosporioides* sobre aceitunas en el tratamiento con compuestos orgánicos volátiles del extracto acuoso de *M. longifolia* L.

Los botes se colocaron en una caja y se pusieron a incubar en la cámara del cultivo (figura 22). Se fueron tomando notas de los síntomas asociados a la enfermedad en las aceitunas (aparición de micelios o manchas y/o podredumbres), durante cuatro semanas.

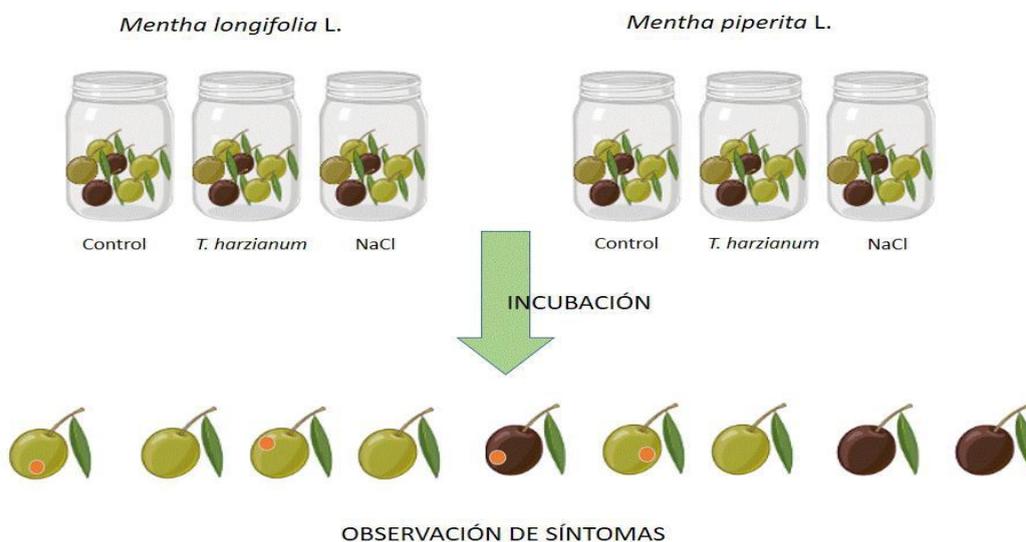


Figura 22. Representación de la incubación de los botes con aceitunas inoculados con *C. gloeosporioides* en el tratamiento con compuestos orgánicos volátiles del extracto acuoso de *M. longifolia* L. y *M. piperita* L.

### 3.11 Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos en los experimentos realizados consistió en el análisis de la varianza mediante la realización de una ANOVA multifactorial, con la que se estableció si existía una diferencia significativa entre los distintos tratamientos, a la vez que nos aseguraba la inexistencia de datos aberrantes. Para dividir los resultados en grupos homogéneos se recurrió a un test de Duncan de múltiples rangos, considerando un nivel de significación de 0,05. Para todos los análisis se utilizó el programa estadístico STATISTICA 6.0.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las plantas control, no sometidas a tratamientos de estrés biótico o abiótico no se apreciaron diferencias significativas entre las dos especies de menta analizadas, *M. piperita* L. (MP) y *M. longifolia* L. (ML), para los parámetros longitud de tallo (19.12 cm de media en MP y 14.13 cm de media en ML) y número de hojas (20.83 hojas de media en MP y 29.29 en ML) en plantas de una semana de edad. Sin embargo, si se observaron diferencias en el sistema radical y la longitud de la raíz principal de ML resultó ser superior a la de MP (Figura 23). En cuanto al peso seco, se encontraron diferencias significativas entre ambas especies 1,32 g para ML y la mitad (0,65 g) para MP.

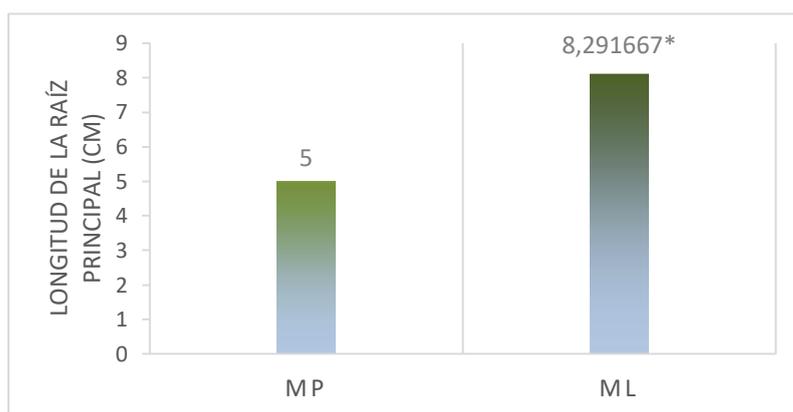


Figura 23. Longitud de la raíz principal de plantas de *M. piperita* L. (MP) y *M. longifolia* L. (ML) de una semana de edad. \* Indica diferencias significativas según el test de Duncan para  $p \leq 0.5$ .

Resultados opuestos se obtuvieron a las dos semanas de edad, la longitud de la raíz principal se había igualado en las plantas control de dos semanas de edad (6,84 cm de media para MP y 8,38 cm para ML), y lo mismo sucedió con el peso seco (1,35 g para ML y 1,46 g para MP). Los otros dos parámetros medidos, longitud del tallo y número de hojas (Figura 24) sí mostraron diferencias significativas entre ambas especies.

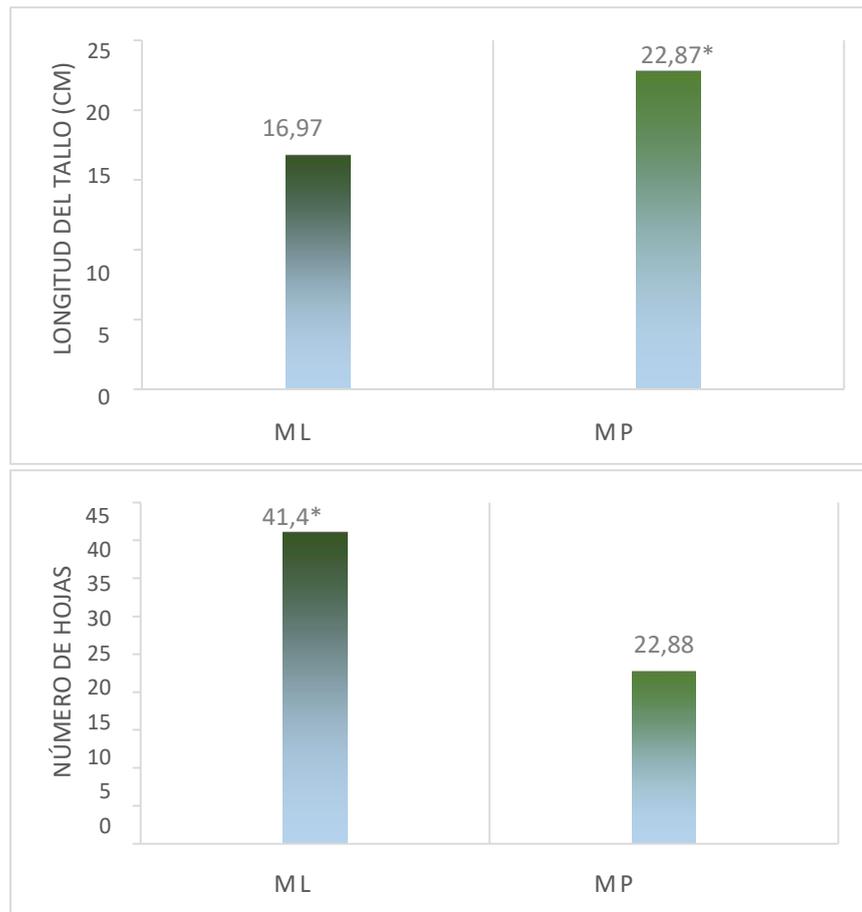


Figura 24. Longitud del tallo y número de hojas de plantas de *M. piperita* L. (MP) y *M. longifolia* L. (ML) de dos semanas de edad. \* Indica diferencias significativas según el test de Duncan para  $p \leq 0.5$ .

#### 4.1 Tratamiento de estrés abiótico (NaCl)

Cuando las plantas están expuestas a la salinidad en experimentos de laboratorio, se produce una caída rápida y temporal de la tasa de crecimiento, seguido de una recuperación de la misma. Los efectos temporales no se pueden atribuir de forma específica a la salinidad y pueden ser consecuencia además de estrés hídrico.

En este experimento los efectos del tratamiento con NaCl en el crecimiento resultaron más obvios en *Mentha piperita* L. que en *Mentha longifolia* L. (Figura 25). No se apreciaron diferencias significativas entre ambas especies para los parámetros longitud de tallo y longitud de la raíz principal, aunque se apreció cierta tendencia de *M. longifolia* L. hacia unas raíces más largas en las plantas sometidas a estrés salino que en las del control, mientras que en el caso de *M. piperita* L. la tendencia fue justo la inversa. Sí se observaron diferencias significativas en el parámetro número de hojas, la pérdida de hojas resultó mucho más importante en el caso de *M. longifolia* L. (Figura 25), mientras que no se apreciaron diferencias significativas en el caso de *M. piperita* L. En el caso de ambas especies se apreciaron daños en hojas y tallos que tenían aspecto seco/quemado (Figura 25). En cuanto al peso seco no se observaron diferencias entre las plantas tratadas y no tratadas para ninguna de las dos especies.

El estrés por salinidad tiene diversos efectos sobre las respuestas biológicas y fisiológicas de las plantas tales como el crecimiento, la floración, la nutrición mineral y el metabolismo secundario. Extensos estudios han puesto de manifiesto diversas respuestas al estrés salino en diferentes especies de plantas. En especies halófilas, el crecimiento no se ve afectado (e incluso puede verse estimulado) por la salinidad, pero en especies glicófilas, se observa la respuesta opuesta (Biswas *et al.*, 2011). Según los resultados del experimento este efecto se observó en *M. piperita* L. cuando el NaCl causó una reducción en la longitud de la raíz principal y en la longitud del tallo, mientras que en *M. longifolia* L. la longitud de la raíz principal mostró medidas más altas en las plantas tratadas que en las plantas no tratadas con NaCl (aunque las diferencias no son significativas) mientras que el número de hojas se redujo a causa del NaCl en las dos especies. Este resultado es coincidente con Oueslati *et al.* (2010) quienes encontraron que las hojas y tallos de *M. pulegium* L. son más sensibles que las raíces a la salinidad.

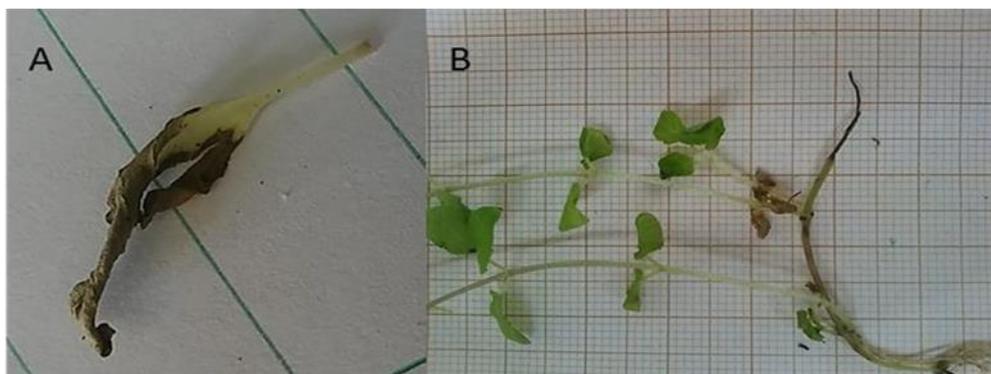
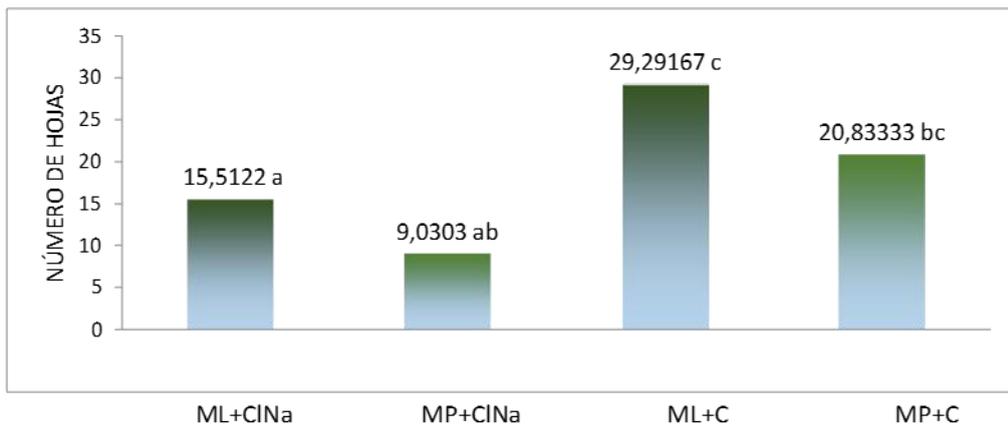
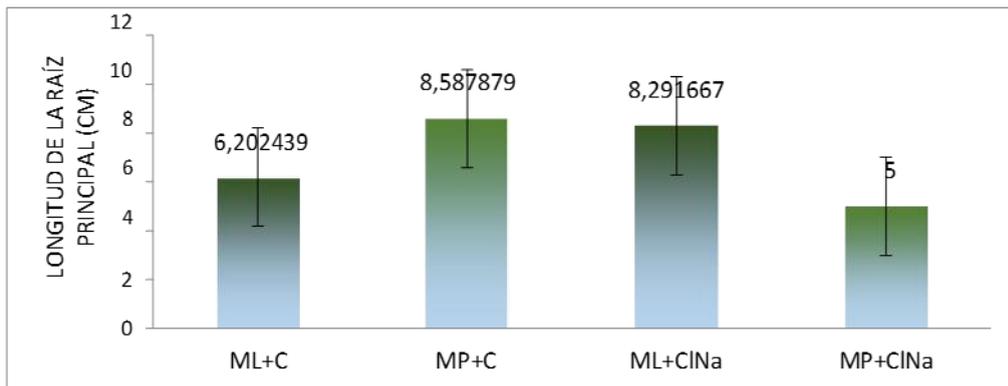
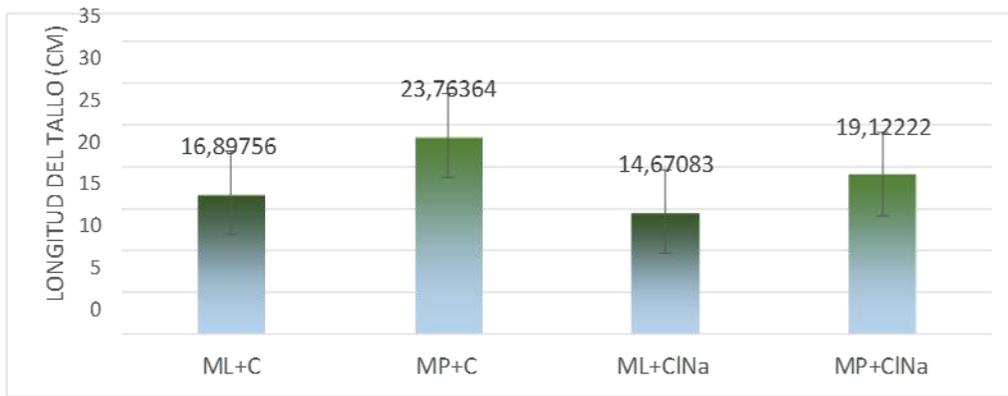


Figura 25. Longitud del tallo, longitud de la raíz principal y número de hojas de plantas de *M. piperita* L. (MP) y *M. longifolia* L. (ML) de una semana de

edad, sometidas a tratamiento con NaCl y plantas control (C). A) Detalle de hoja seca de planta de *M. longifolia* L. sometida a tratamiento con NaCl, B) Detalle de planta de *M. piperita* L. sometida a tratamiento con NaCl. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Duncan para  $p \leq 0.5$ .

#### 4.2 Tratamiento con *Trichoderma harzianum*

En las plantas que fueron tratadas con *Trichoderma harzianum* se observó una tendencia a un mayor crecimiento que en las plantas control (Figura 26). Este efecto resultó muy similar para ambas especies, aunque las diferencias no fueron significativas, salvo en el número de hojas, parámetro para el que *M. longifolia* L. sí mostró un efecto positivo.

En lo referente al peso seco sí se observó un incremento significativo del mismo en las plantas tratadas con *T. harzianum*. En el caso de *M. piperita* L. el peso medio alcanzó 2,59 g en las plantas tratadas mientras era de 1,46 g en las plantas control. En el caso de *M. longifolia* L. el peso medio alcanzó los 2,66 g en las plantas tratadas mientras era de tan sólo 1,35 g para las no tratadas.

La aplicación del producto en base a *Trichoderma* incrementa la altura del tallo, la longitud de la raíz y, de forma significativa, el número de hojas en las plantas de *M. longifolia* L. del ensayo. Varios estudios han demostrado que el mayor crecimiento de las plantas mediado por *Trichoderma* está relacionado con el nivel de colonización y el grado de micelio externo, siendo este último necesario para la absorción de fósforo (Sanders *et al.*, 1977; Tommerup, 1983). *Trichoderma harzianum* aumenta la solubilidad del fosfato y micronutrientes tales como iones zinc, cobre, hierro y manganeso que tienen baja solubilidad y, además, estimula la secreción de enzimas exógenas, sideróforos y vitaminas que juegan un papel importante en el crecimiento vegetal.

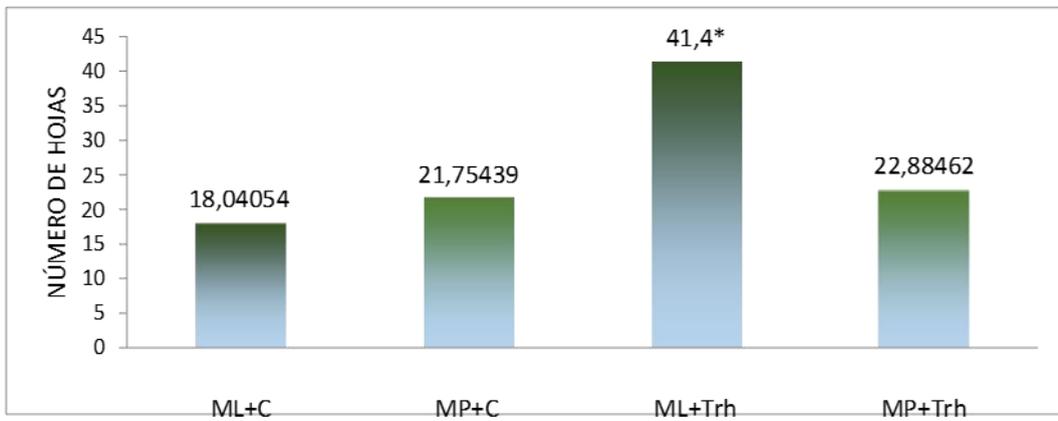
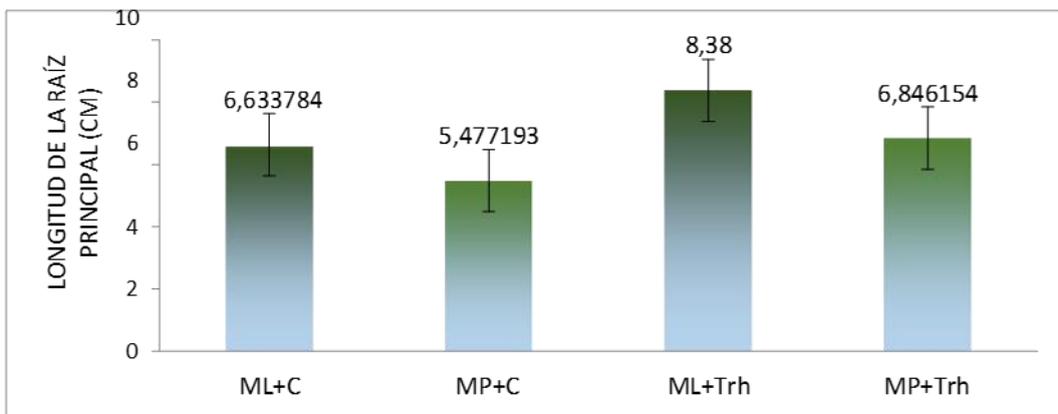
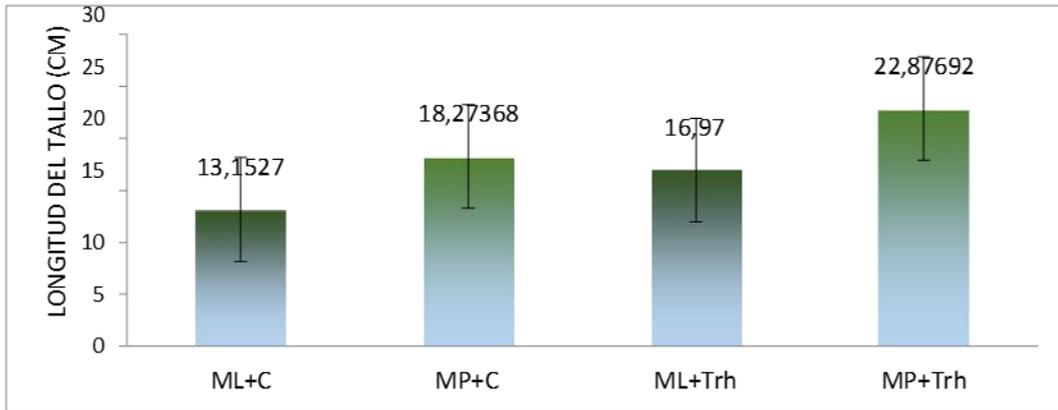


Figura 26. Longitud del tallo, longitud de la raíz principal y número de hojas de plantas de *M. piperita* L. (MP) y *M. longifolia* L. (ML) de dos semanas de edad, sometidas a tratamiento con *Trichoderma harzianum* (Trh) y plantas control (C). A) Plantas de *M. longifolia* L. en tratamiento con *T. harzianum*; B) Detalle de sistema radical de planta de *M. longifolia* L. en tratamiento con *T. harzianum*. El asterisco indica diferencias significativas según el test de Duncan para  $p \leq 0.5$ .

### 4.3 Capacidad antioxidante total

En el caso de los tratamientos efectuados sobre *M. piperita* L. tanto el NaCl como *T. harzianum* supusieron una reducción en la actividad antioxidante de las plantas tratadas (Figura 27). Un resultado diferente se obtuvo en el caso de *M. longifolia* L. El tratamiento de las plantas con NaCl no supuso un cambio significativo en la capacidad antioxidante, mientras que con el tratamiento con *T. harzianum* se produjo un incremento de la misma (Figura 27).

Las plantas de *M. piperita* L. en tratamiento con NaCl mostraron una capacidad antioxidante total muy inferior a las plantas control, mientras que no se detectaron diferencias en *M. longifolia* L. El hecho de que las plantas de *M. longifolia* L. mostraran menores reducciones en crecimiento y no viesen afectada su capacidad antioxidante podría estar relacionada con una mayor tolerancia de esta especie a la salinidad (Kaur *et al.*, 2014).

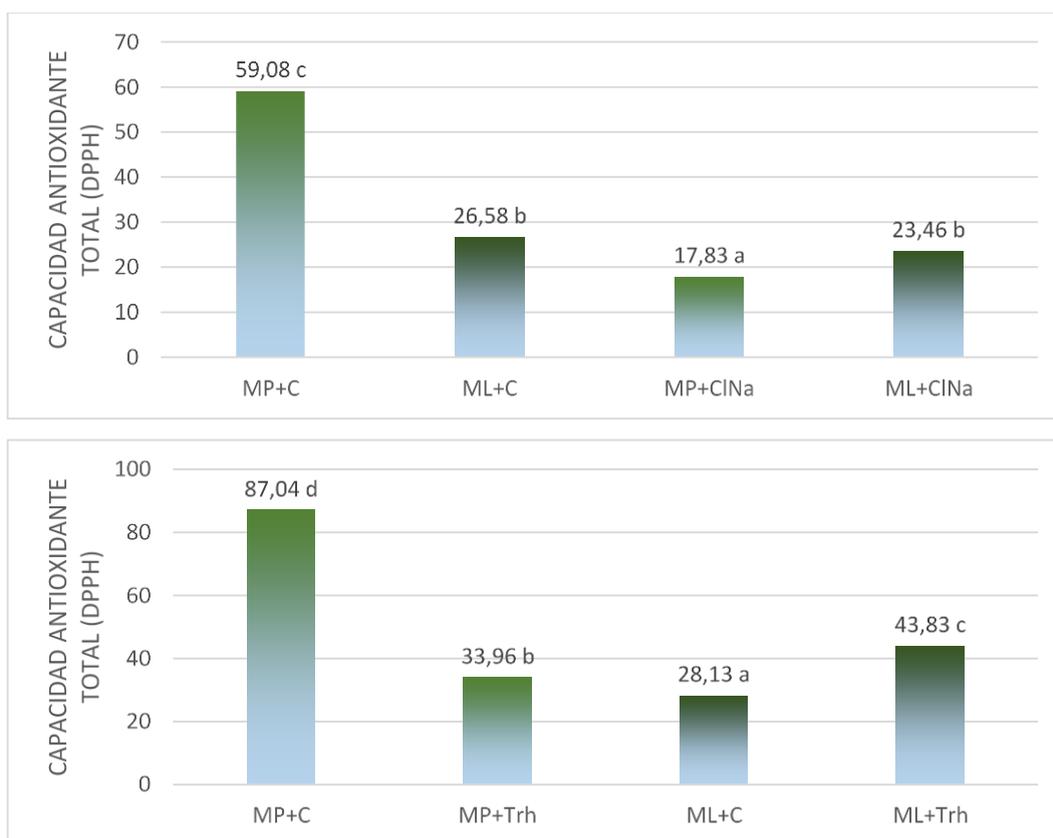


Figura 27. Capacidad antioxidante medida con el ensayo DPPH en plantas control y tratadas con NaCl y *Trichoderma harzianum* (Trh) de *M. piperita* L. (MP) y *M. longifolia* L. (ML). Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Duncan para  $p \leq 0.5$ .

En el caso de las plantas tratadas con *Trichoderma* se observan efectos inversos para la capacidad antioxidante entre las dos especies, mientras que en *M. longifolia* L. se produce un incremento, en *M. piperita* L. se produce una reducción. Estos resultados están también relacionados con el crecimiento de las plantas ya que los efectos positivos sobre el mismo se observan fundamentalmente en *M. longifolia* L. La capacidad antioxidante de las plantas se puede ver incrementada en el tratamiento con *Trichoderma* (Singh y Singh, 2015).

#### 4.4 Contenido de compuestos fenólicos totales

El ensayo demuestra que la *M. piperita* L. tiene un contenido de compuestos fenólicos más elevado que *M. longifolia* L. Este contenido se incrementó en las plantas tratadas con *T. harzianum* mientras que el tratamiento con NaCl produjo una reducción significativa del mismo. El contenido de compuestos fenólicos en *M. longifolia* L. no se vio alterado por el tratamiento con *T. harzianum* (Figura 28).

El estrés salino reduce los fenoles totales (Figura 28) y como consecuencia la capacidad antioxidante fue menor en las plantas tratadas con NaCl.

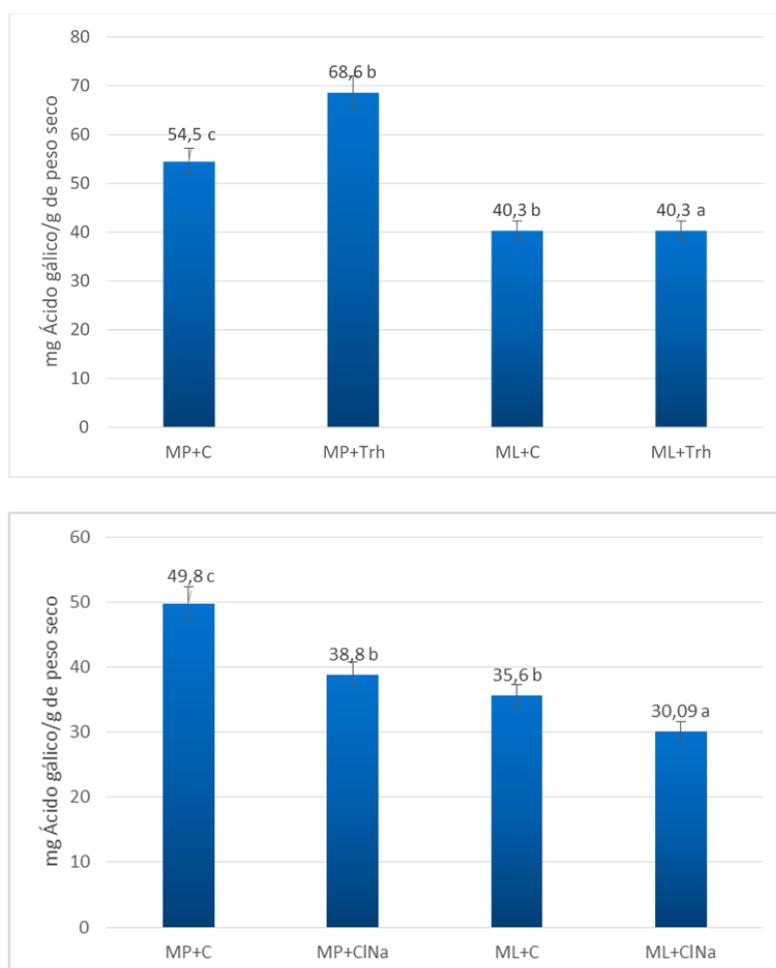


Figura 28. Contenido de fenoles totales calculado mediante el ensayo Folin-Ciocalteu plantas control (C) y tratadas con NaCl y *Trichoderma harzianum* (Trh) de *M. piperita* L. (MP) y *M. longifolia* L. (ML). Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Duncan para  $p \leq 0.5$ .

#### 4.5 Contenido total de flavonoides

Según este experimento *M. piperita* L. y *M. longifolia* L. no difieren en el contenido de flavonoides (Figura 29). El NaCl disminuye el contenido de flavonoides en ambas especies, aunque ligeramente más en el caso de las plantas de *M. longifolia* L. que en las de *M. piperita* L. El resultado en el caso de las plantas tratadas con *T. harzianum* es diferente, en *M. longifolia* L. se redujo de las plantas control a las tratadas mientras que en *M. piperita* L. se incrementaron para las tratadas.

El contenido total de flavonoides y fenoles de las dos especies no justifica su capacidad antioxidante en el tratamiento con *Trichoderma harzianum*. Los compuestos fenólicos y flavonoides se consideran el compuesto antioxidante principal en la infusión. Sin embargo, de acuerdo con (Bohnert y Jensen, 1996), los hidratos de carbono también pueden actuar como eliminadoras de ROS y contribuir a la estabilización del estrés oxidativo.

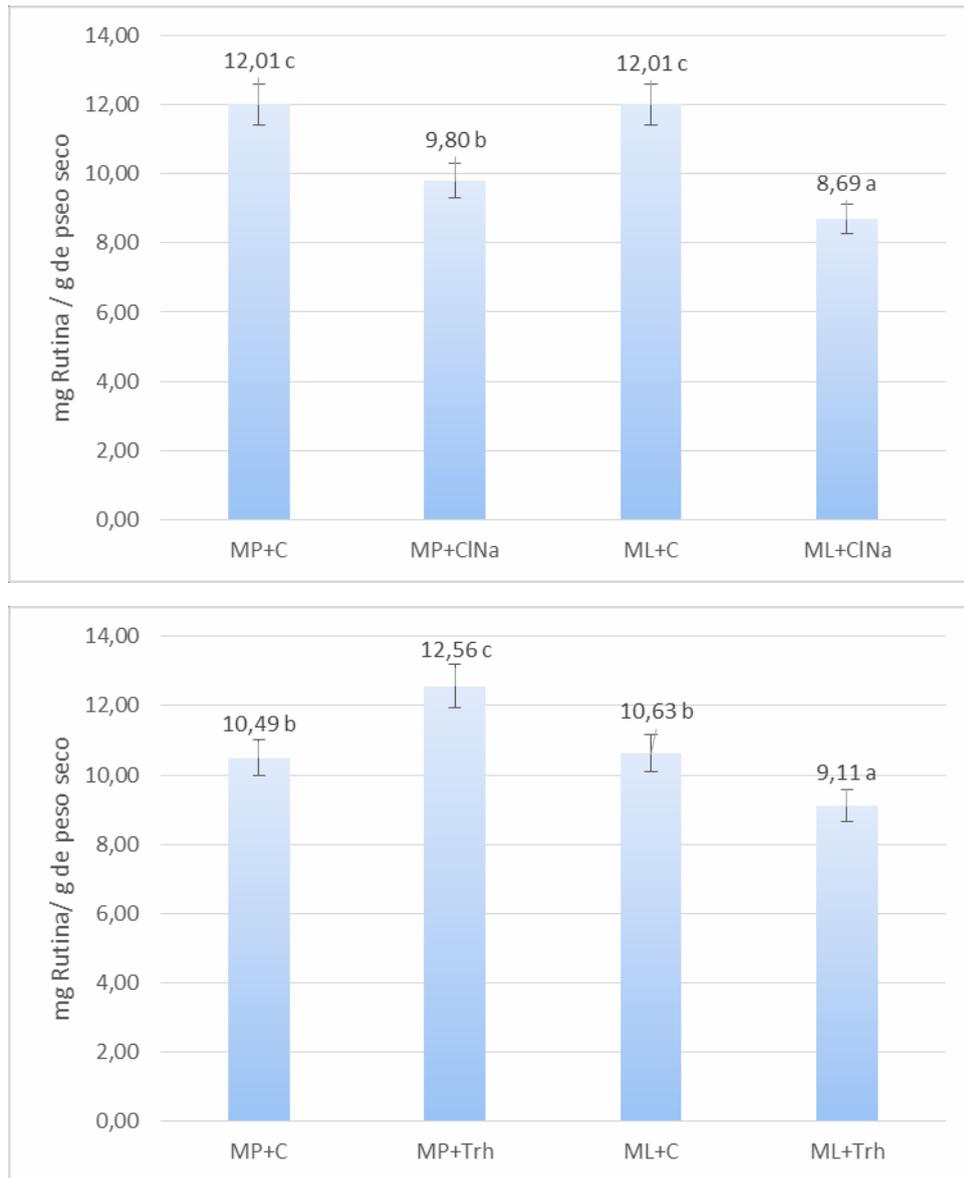


Figura 29. Contenido de flavonoides en plantas control (C) y tratadas con NaCl y *Trichoderma harzianum* (Trh) de *M. piperita* L. (MP) y *M. longifolia* L. (ML). Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Duncan para  $p \leq 0.5$ .

#### 4.6 Análisis cualitativo mediante GC-TOF

Existen muchas referencias bibliográficas en cuanto la composición, y los compuestos mayoritarios de los géneros de menta, mediante el uso del extracto metanólico y etílico de las hojas de la menta analizándolo con el método GC-MS. En nuestro estudio hemos optado por análisis el extracto acuoso de la parte aérea de la planta.

A continuación, en la Tabla 10, se muestran la composición química para cada uno de los extractos acuosos de los dos géneros de la menta estudiado: *M. piperita* L. (MP) y *M. longifolia* L. (ML) con los tratamientos de NaCl y *T. harzianum* (Trh).

Tabla 10. Análisis cualitativo mediante GC-TOF, del extracto acuoso de plantas control (C) y tratadas con NaCl y *Trichoderma harzianum* (Trh) de *M. piperita* L. (MP) y *M. longifolia* L. (ML).

Número	Nombre del compuesto	Área	Área	Área	Área	Área	Área
		MP Control (ua)	MP Trh (ua)	MP NaCl (ua)	ML Control (ua)	ML Trh (ua)	ML NaCl (ua)
1	3methylcyclohexanone	324	129				
2	3,4-dimethylstyrene	196	149	172			
3	Methylformiate	533	373	696	526	537	487
4	Trimethylsilylfluoride					991	1032
5	Burneol					137	
6	1.2 epoxy-p-menthan-3-one				700	1007	2174

7	Methoxy-phenyl-oxime	164	210	201			
8	1,2Cyclopentanedione					173	
9	P-Menthan-1,8-dien-3-one					150	
10	2-pinen-4-one	151			1579	2539	
11	Mint furanone	2097	1155	2919	1089	2129	433
12	2-allyl-4-methylphenol					284	
13	Phenol	438	466	704	567	813	489
14	p-cymen-2-ol	943	226	338	1557	1886	1599
15	2-propenyloxymethyl-oxirane	418	221	217			
16	Thymol	507	321	317	404	459	401
17	2,6-dimethoxyphenol	172			253	243	
18	Acetoveratrone	439	126				
19	Glycerol				237	249	
20	2-chloro-1-ethyl-5-methoxy-3-methylbenzene	750	751	5194			365
21	Diethyl phtalate	281	201	305		345	
22	Dihydrobenzofuran	197			217	208	

Con base en el GC-TOF, se identificaron 22 compuestos en las muestras de extracto acuoso extraídas de *Mentha longifolia* L., *Mentha piperita* L. y las plantas elicidadas tratadas con *Trichoderma* y NaCl (Tabla 10). Los compuestos volátiles orgánicos aparecieron en proporciones variables. La composición química de las plantas de *Mentha* está influenciada por muchos factores (por ejemplo, la geografía, la región, el clima o las condiciones de crecimiento de las plantas), pero la composición fitoquímica es poco variable entre las especies (Baliga y Rao, 2010).

En el área de plantas tratadas con *Trichoderma* solo, o con NaCl y en los controles, mostró notables diferencias cuantitativas (Tabla 10). Por ejemplo, Trimethylsilylfluoride, Methylformiate, Mint furanone, Phenol, p-cymen-2-ol, Thymol, fueron relativamente abundantes en todas las muestras. En el área de *Mentha longifolia* L. tratada con *Trichoderma* fueron, Borenol (2.74%), 1,2 Cyclopentanedione (3.45%), P-Menthan-1,8-dien-3-one (3%), Diethyl phtalate (6.9%), y 2-chloro-1-ethyl-5-methoxy-3-methylbenzene (7.3%) en el área de *Mentha longifolia* L. tratada con NaCl destacan Trimethylsilylfluoride y 1.2 epoxy-p-menthan-3-one. Este resultado coincide con que, los compuestos fenólicos están involucrados en varios procesos en las plantas, como el crecimiento y la reproducción y también se sintetizan como un mecanismo de defensa contra el estrés biótico o abiótico (Cohen y Kennedy, 2010); por lo tanto, su producción puede mejorarse mediante el tratamiento con ciertos elicitores, que se definen como elementos, cuando se introduce en pequeñas concentraciones al sistema de un ser vivo, inicia o mejora la biosíntesis de compuestos específicos (Edreva *et al.*, 2008; Ferrari, 2010). No es sorprendente la elicitación mediada por la presencia de *Trichoderma* ya que los genomas del micoparásito *Trichoderma spp.* son ricos en genes que codifican enzimas como quitinasas y glucanasas, y del metabolismo secundario como los péptidos no ribosomales (NRPs) (Reino *et al.*, 2008; Kubicek *et al.*, 2011).

El NaCl tuvo un efecto diferente en las plantas, mientras que *Trichoderma* contribuyó a la aparición de compuestos que no se encontraban en otras plantas, y su efecto fue claro en *Mentha longifolia* L. El NaCl comparado con *Trichoderma* tuvo un efecto claro en la concentración de los compuestos casi en todas las plantas del experimento, aumentando la concentración como en el caso del Mint furanone, Phenol y 2-chloro-1-ethyl-5-methoxy-3-methylbenzene en *Mentha piperita* L., o disminuyendo la concentración como en el caso del Mint furanone en *Mentha longifolia* L. También ocultando la aparición de algunos compuestos como la ausencia de Acetovanone en *M. piperita* L. y Glycerol en *M. longifolia* L. o la aparición de 2-chloro-1-ethyl-5-methoxy-3-methylbenzene en *M. longifolia* L. Sin embargo, se sabe poco sobre el efecto de la salinidad en las plantas medicinales y aromáticas, aunque esta restricción abiótica puede afectar el crecimiento de las plantas (Ashraf y Orooj, 2006) y la biosíntesis y secreción de aceites esenciales (Heuer *et al.*, 2002). Aunque varias investigaciones han estudiado la bioquímica y las respuestas fitoquímicas a la influencia de la sal en las especies de menta, sólo *M. pulegium* L. (poleo), que contiene mentona como el principal compuesto en el aceite, ha sido examinado en detalle, y mostró que el estrés salino disminuyó el nivel de mentona y cambió el quimiotipo de la planta (Karray-Bouraoui *et al.*, 2009; Oueslati *et al.*, 2010). Morales *et al.* (1993) sugirieron que el aumento en el contenido de aceite en algunas de las plantas estresadas por sal podría atribuirse a la disminución de los metabolitos primarios debido a los efectos de la salinidad, haciendo que los productos intermedios estén disponibles para la síntesis de metabolitos secundarios. De hecho, el efecto de la salinidad sobre el aceite esencial y sus constituyentes puede deberse a sus efectos sobre la actividad enzimática y el metabolismo (Burbott y Loomis, 1969).

Nuestros resultados concuerdan con el aumento del contenido de polifenoles a salinidad moderada (Navaro *et al.*, 2006). Estos datos sugieren que el grado

de daño celular oxidativo en plantas expuestas a estrés abiótico está controlado por la capacidad de protección contra los agentes oxidativos (Ksouri *et al.*, 2007).

El tratamiento con *Trichoderma* y NaCl, dio lugar a la presencia de metabolitos que no fueron detectados en el control. Algunos estudios han demostrado que un aumento en el contenido de carbohidratos está relacionado con la síntesis de compuestos fenólicos en las plantas, ya que la vía de síntesis de estos metabolitos utiliza productos del metabolismo de los carbohidratos como precursores (Ghasemzadeh y Jaafar, 2012; Ibrahim y Jaafar, 2011). Los efectos pueden estar relacionados, por ejemplo, con el aumento de los parámetros de crecimiento de las plantas tratadas con 2,0 mM de ácido salicílico (Marely *et al.*, 2014), y en nuestro estudio eso puede estar relacionado con el tratamiento con NaCl y *Trichoderma*.

La bioactividad de los compuestos detectados se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Análisis de algunos de los compuestos detectados mediante el análisis GC-TOF de plantas tratadas y no en plantas control, o que fueron detectados en un alto porcentaje en ambas, o solo en una de las plantas que fueron sometidas a tratamiento de estrés biótico o abiótico.

<b>Planta</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Nombre del compuesto</b>	<b>Bioactividad y usos</b>
ML Trh	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub>	2-ally-4-methylphenol  "4-methyl-2-prop-2-enylphenol"	Antimicrobiano,  Antioxidante.
ML Trh	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub>	Diethyl phthalate	Como fijador en Fragancias / Perfumes.

MP Trh NaCl			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Disolvente eficaz para perfumes, ampliamente utilizado en varitas de incienso (Agarbatti).</li> <li>- Como disolvente para nitrocelulosa y acetato de celulosa.</li> <li>- En formulaciones repelentes de mosquitos.</li> <li>- Como desnaturalizante para alcohol.</li> <li>- Como sustituto del alcanfor.</li> <li>- Como plastificante, en fábrica de plástico.</li> </ul>
ML Trh NaCl  MP Trh NaCl	$C_{10}H_{14}$	2-p-Cymenol  "Carvacrol"	<p>Antiinfeccioso, Antiséptico, Nematicida, Antimicrobiano, Antifúngico, Aromatizante.</p>
ML Trh	$C_{10}H_{16}$	1.2 epoxy-p-menthan-3-one	<p>Anticáncer Antimicrobiano</p>
NaCl		"piperitone oxide"	Antioxidante
Trh NaCl	$C_3H_9FSi$	Trimethylsilyl fluoride	-Los compuestos con

		“Fluorotrimethylsilane”	<p>grupos trimetilsililo normalmente no se encuentran en la naturaleza.</p> <p>-Los químicos a veces usan un reactivo de trimetilsililación para derivatizar compuestos bastante no volátiles como ciertos alcoholes, fenoles o ácidos carboxílicos.</p> <p>-Los grupos trimetilsililo de una molécula tienden a hacerla más volátil, lo que a menudo hace que los compuestos sean más fáciles de analizar mediante cromatografía de gases o espectrometría de masas.</p> <p>-Acciones antimicrobianas del flúor para las bacterias bucales.</p>
ML Trh NaCl	$C_{10}H_{14}O$	Thymol	<p>Anestésico</p> <p>Pesticida</p> <p>Desinfectante</p>

MP Trh NaCl			Se utiliza como estabilizador en preparaciones farmacéuticas. Antibacteriano Antifúngico Vermífugo
ML Trh NaCl  MP Trh NaCl	$C_{11}H_{16}O$	Mint furanone	Aromatizante Antibacteriano Antifúngico Analgésico
ML Trh NaCl  MP Trh NaCl	$C_6H_5OH$ o $C_6H_6O_2$	Phenol	Antipruriginoso Desinfectante Antiséptico Se usa en la preparación de cosméticos y se utiliza en la producción de medicamentos
ML Trh  MP	$C_{10}H_{14}O$	2-pinen-4-one "verbenone"	Aromatizante
MP	$C_8H_9NO_2$	Methoxy-phenyl-oxime	Antitumoral

Trh NaCl			Actividad citotóxica
ML Trh NaCl  MP Trh NaCl	$C_2H_4O_2$  $HCOOCH_3$	Methyl Formate	Larvicidas para tabaco y cultivos alimentarios  Tiene un papel como disolvente aprótico polar  Fumigante  Insecticida  Refrigerante
ML Trh	$C_{10}H_{14}O$	P-Menthan-1,8-dien-3-one  "Isopiperitenone"	Feromonas sexuales femeninas
MP Trh NaCl	$C_{10}H_{12}$	3,4-dimethyl styrene  "Benzene"	Aromatizante  Producción de poliestireno
ML Trh	$C_3H_8O_3$	Glycerol	Diurético  Laxante  La glicerina eleva la osmolalidad del plasma sanguíneo  Solvente  Humectante  Vehículo en diversas preparaciones farmacéuticas.

			Industria del biodiesel
ML Trh	$C_{10}H_{18}O$	Borneol	<p>Analgésico</p> <p>Antibacteriano</p> <p>Antifibrosis</p> <p>Antifúngico</p> <p>Antiinflamatorio</p> <p>Antioxidante</p> <p>Anti-ansiedad</p> <p>Antiproliferativo</p> <p>Anticoagulante</p> <p>Neuroprotectivo</p> <p>El borneol tiene “efectos sinérgicos” combinado con otros terpenos, cannabinoides y medicamentos porque reduce la barrera hematoencefálica,</p>

			lo que permite una mayor absorción de otros medicamentos que un paciente podría recibir
ML Trh	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	1,2-Cyclopentanedione  "Cyclotene"	Aditivo alimentario

Destaca la presencia en las plantas de *M. longifolia* L. elicidadas con NaCl y con *T. harzianum* del compuesto óxido de piperitona (1.2 epoxy-p-menthan-3-one). Según la bibliografía, el óxido de piperitona es uno de los compuestos mayoritarios en el aceite esencial de *M. longifoila* L. (Mimica-Dukić *et al.*, 2003; Džamić *et al.*, 2010). El óxido de piperitona tiene actividad antifúngica (Oumzil *et al.*, 2002; Džamić *et al.*, 2010).

#### 4.7 Tratamientos de aceitunas con extractos acuosos de plantas de *M. piperita* L. y *M. longifolia* L. mediante inmersión. Evaluación de los extractos acuosos en el control de *C. gloeosporioides*.

Una vez que fueron filtradas las infusiones de *M. longifolia* L. y *M. piperita* L. realizadas con 1 g de hoja seca y 100 mL de agua estéril llevada a ebullición, se pudieron apreciar las diferencias en cuanto a color y olor de cad especie de Menta. Especialmente destaca el color verde intenso de la infusión de *M. longifolia* L. (Figura 30).

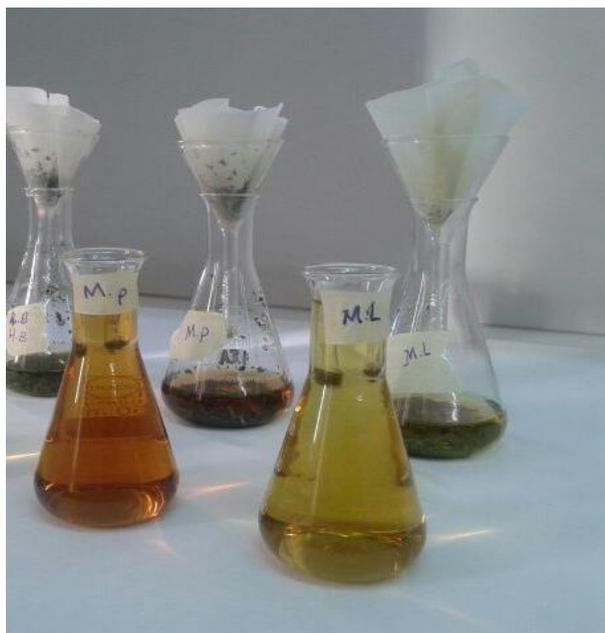


Figura 30. Infusiones de *M. piperita* L. (MP) y *M. longifolia* L. (ML)

Las aceitunas recolectadas del árbol en diciembre de 2015 se mantuvieron en los botes con cada infusión con el inóculo del patógeno (Figura 31) durante un plazo de una semana hasta que se apreciaron daños en algunas de ellas.



Figura 31. Aceitunas recolectadas del árbol y puestas en frascos meli con las infusiones de *M. piperita* L. (MP) y *M. longifolia* L. (ML) y control con agua e inóculo del patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*.

En todos los tratamientos y el control, después de una semana, se infectaron las aceitunas en un porcentaje del 55.6% mientras que en las tratadas con la infusión de *M. longifolia* L. sólo se infectaron el 33%. A las tres semanas todas las aceitunas mostraron alteraciones morfológicas, independientemente del tipo de tratamiento (Figura 32).

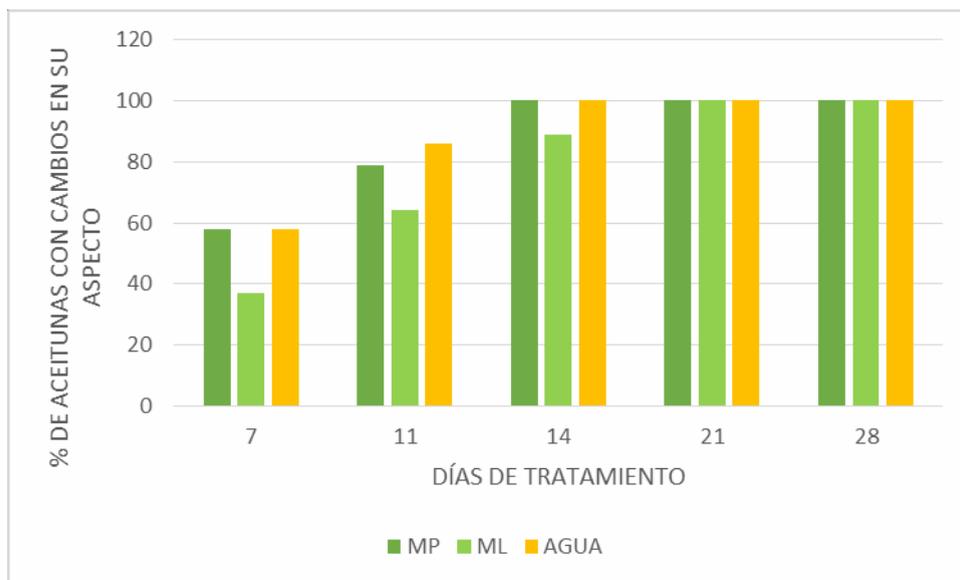


Figura 32. Porcentaje de aceitunas con afectación morfológica de las sometidas a diferentes infusiones (*M. piperita* L. (MP); *M. longifolia* L. (ML) y control con agua.

El efecto del patógeno se apreció en la mayoría de las aceitunas como manchas blancas (micelio blanco) que evolucionaron a manchas más extensas de color marrón y, en algunas, se desarrolló a una pérdida total del color de aceituna a un color claro como el beige. Las aceitunas que habían estado tratadas con la infusión de *M. longifolia* L. mostraban pequeñas manchas oscuras (Figura 33). Este efecto de “aclorado” se apreció en todos los tratamientos. El color y olor de las infusiones también variaron de los iniciales (Figura 30) a excepción de la infusión de *M. longifolia* L. que mantuvo su olor y color verde intenso característico (Figura 33 A).

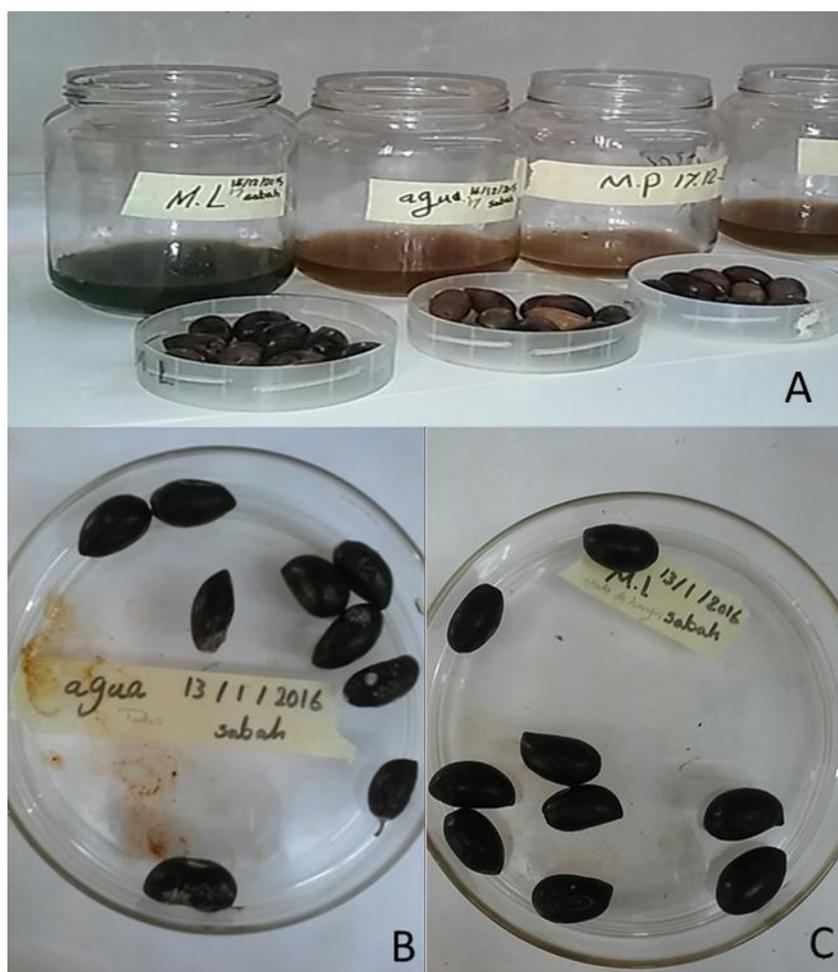


Figura 33. Aceitunas sometidas a diferentes tratamientos con infusiones del género *Mentha* e inóculo del patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* tras cuatro semanas: A) se observa la pérdida de coloración, especialmente en los tratamientos control y *M. piperita* L.; B) Aceitunas del tratamiento control donde se aprecian manchas blancas; C) Aceitunas del tratamiento con la infusión de *M. longifolia* L.

Tras cuatro semanas de tratamiento las aceitunas se dispusieron en placas Petri estériles y se observó su evolución. El micelio se observó en todas las aceitunas de todos los tratamientos y el control, a excepción de las sometidas al tratamiento con la infusión de *M. longifolia* L. que no alcanzó el 80 % de aceitunas afectadas y sólo tras una semana (Figura 34).

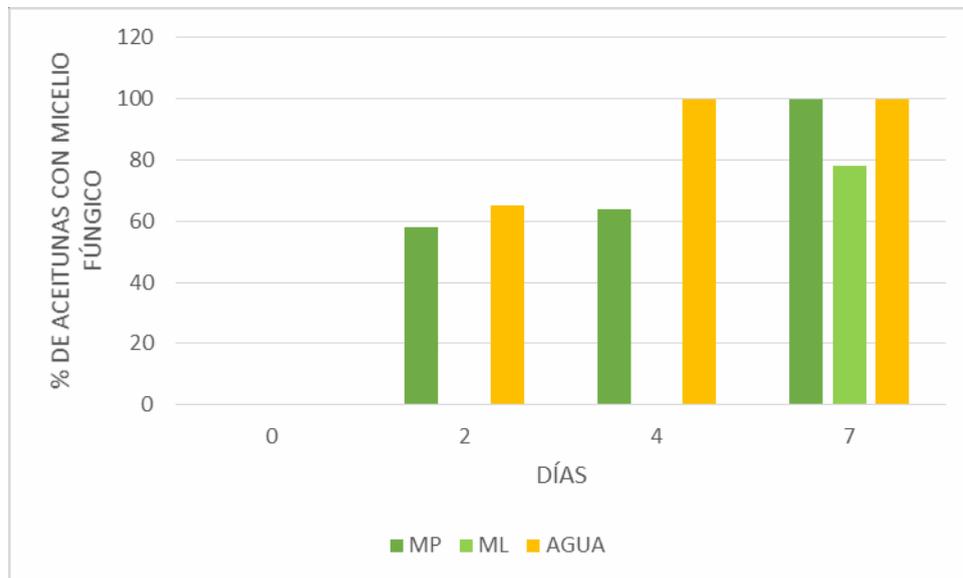


Figura 34. Porcentaje de aceitunas con micelio fúngico de las sometidas a diferentes infusiones (*M. piperita* L. (MP); *M. longifolia* L. (ML) y control con agua.

El peor aspecto lo presentaron las aceitunas que habían estado sometidas al tratamiento control (Figura 35), se pueden apreciar las aceitunas momificadas propias de la enfermedad “aceituna jabonosa” causada por el patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* y el color anaranjado del micelio característico del aislado utilizado para la infección.

Los flavonoides rompen las membranas microbianas (Tuschiya *et al.*, 1996), las saponinas que tienen propiedades detergentes actúan como agentes líticos (Abukakar *et al.*, 2008), los alcaloides en los extractos son agentes intercalantes con el DNA (Phillipson y O'Neill, 1987), los taninos precipitan las proteínas microbianas (Prasad *et al.*, 2008).

Existe una relación entre los fitoquímicos como los taninos y flavonoides y la actividad de eliminación de radicales libres y la actividad antimicrobiana. Taninos y flavonoides tienen características antifúngicas. Los extractos de *Mentha* muestran actividad sobre hongos patogénicos (Guerin y Reveille, 1988, Blaszczyk *et al.*, 2000; Duarte *et al.*, 2005; Tampieri *et al.*, 2005).

Una alícuota de 1 mL de cada infusión y del control se dispusieron en placas Petri con medio PDA, el experimento se realizó por duplicado y en todos los casos se observó la aparición de micelio después de una semana (Figura 36).



Figura 35. Aspecto de las aceitunas de los diferentes tratamientos con las infusiones de plantas del género *Mentha* e inóculo del patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* después de una semana post-tratamiento: A) tratamiento control con agua, B) tratamiento con *M. piperita* L. y C) tratamiento con *M. longifolia* L. Los círculos indican el color anaranjado del micelio.



Figura 36. A) Placas de PDA inoculadas con 1 ml de infusión de diferentes especies de *Mentha* (M.L: *M. longifolia*; M.P: *M. piperita*) y el control con agua, después del tratamiento de un mes con aceitunas e inóculo del patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. B y C) detalle del anverso de dos de las placas en los que se aprecia el color característico del micelio de *C. gloeosporioides*.

Los aceites obtenidos de las aceitunas de cada uno de los tratamientos tras el lavado, mostraron en todos los casos graves defectos de color y olor. La excepción fue el aceite obtenido de las aceitunas tratadas con *M. longifolia* L. que presentó un intenso color verde y un olor a aceite de oliva mentolado (Figura 37).



Figura 37. Aceite de oliva obtenido de aceitunas tratadas con infusión de *M. longifolia* L. e inoculación con *Colletotrichum gloeosporioides* durante cuatro semanas.

La actividad fungicida de aceite de *M. piperita* L. se demostró sobre 11 hongos diferentes por Pattnaik *et al.* (1995). La actividad antimicrobiana y antifúngica de *M. piperita* L. es atribuible a la presencia de taninos y flavonoides por lo que su incremento al elicitarla con *T. harzianum* puede resultar beneficioso en el control del patógeno.

Los resultados obtenidos en el proceso de medición de la actividad antioxidante y antimicrobiana de los aceites esenciales de *M. longifolia* L. proporcionan un punto de apoyo para el uso tradicional de los aceites esenciales y abren la posibilidad de utilizarlos como conservantes naturales en productos alimentarios. En este trabajo se muestra la mayor eficacia de la infusión de esta especie en el control del patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, aunque el efecto es fungistático y no fungicida como se desprende de la aparición de daños en fruto y la aparición del patógeno en el cultivo a partir de la infusión. El tratamiento de aceitunas con infusión de *M. longifolia* L. prolonga la vida del fruto desde su cosechado hasta su transformación en almazara permitiendo la obtención de un aceite no tan alterado como correspondería al ataque de *C. gloeosporioides* pero con características organolépticas diferentes que determinarían su uso.

#### 4.8 Tratamientos de aceitunas con extractos acuosos de plantas de *M. piperita* L. y *M. longifolia* L. sin contacto directo. Evaluación de compuestos orgánicos volátiles en el control de *C. gloeosporioides*.

Las aceitunas se trataron con los extractos de las plantas sin contacto directo para analizar el efecto de los compuestos orgánicos volátiles (Figura 38).



Figura 38. Botes Meli con las infusiones filtroesterilizadas y tres discos micelares del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, y nueve aceitunas encima de una rejilla de plástico.

Después de una semana de tratamiento en oscuridad y a temperatura ambiente ( $22 \pm 2$  °C) se analizó la aparición de síntomas, visualizándose flacidez, cambio de color y aparición de pequeñas lesiones puntuales de color negro. En la Figura 39 se muestran los resultados para los extractos de *M. piperita* L. Se apreciaron los síntomas en el 55% de las aceitunas tratadas con el extracto de las plantas control (Figura 39a). En el caso de las aceitunas tratadas con los extractos de las plantas elicidadas mediante estrés biótico y abiótico sólo el 11% de las aceitunas de cada caso presentaron síntomas.

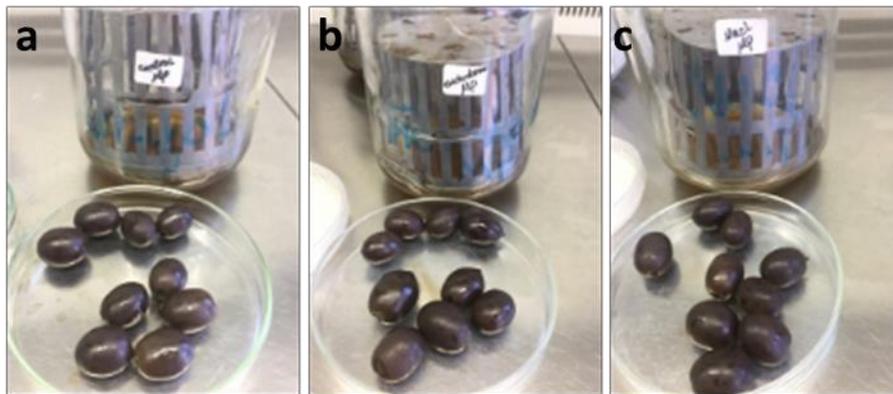


Figura 39. Aceitunas inoculadas con *C. gloeosporioides* y sometidas a tratamiento con compuestos orgánicos volátiles del extracto acuoso (Té) de *M. piperita* L. a) tratamiento control; b) plantas tratadas con *T. harzianum* y c) plantas tratadas con NaCl, tras una semana de tratamiento.

En la Figura 40 se muestran los resultados para los extractos de *M. longifolia* L. En este caso los síntomas de flacidez y cambio de color eran más leves y no aparecieron manchas ni en las plantas control ni en las aceitunas tratadas con los extractos de las plantas elicitadas mediante estrés biótico y abiótico.

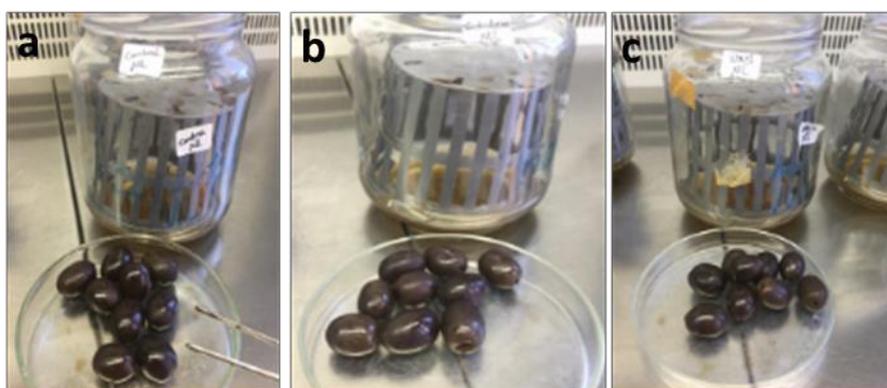


Figura 40. Aceitunas inoculadas con *C. gloeosporioides* y sometidas a tratamiento con compuestos orgánicos volátiles del extracto acuoso (Té) de *M. longifolia* L.: a) tratamiento control; b) plantas tratadas con *T. harzianum* y c) plantas tratadas con NaCl, tras una semana de tratamiento.

Después de un mes de tratamiento en oscuridad y a temperatura ambiente ( $22 \pm 2$  °C) se analizó la aparición de síntomas, aparición de micelio (Figura 41). Se pudo apreciar la aparición de micelio en una de las aceitunas del tratamiento control con extracto de *M. piperita* L. obtenido de plantas no sometidas a tratamiento de elicitación.



Figura 41. Aceitunas inoculadas con *C. gloeosporioides* y sometidas a tratamiento con compuestos orgánicos volátiles del extracto acuoso (Té) de *M. piperita* L. de plantas sin tratamiento de elicitación, tras un mes de tratamiento. La flecha indica la presencia de micelio sobre una de las aceitunas.

Se mantuvo el experimento para valorar los efectos a largo plazo de los tés de *M. piperita* L. y *M. longifolia* L. para la conservación de aceitunas con posible infección de *C. gloeosporioides*. Observando la aparición de micelio se comprobó que el hongo afectó a las aceitunas de todos los tratamientos a excepción de aquellas tratadas con el té de *M. longifolia* L. obtenido de plantas sometidas a tratamiento de elicitación con *T. harzianum* (Figura 42). Se observa la presencia de micelio en todos los casos a excepción del bote central en la imagen 42 b.

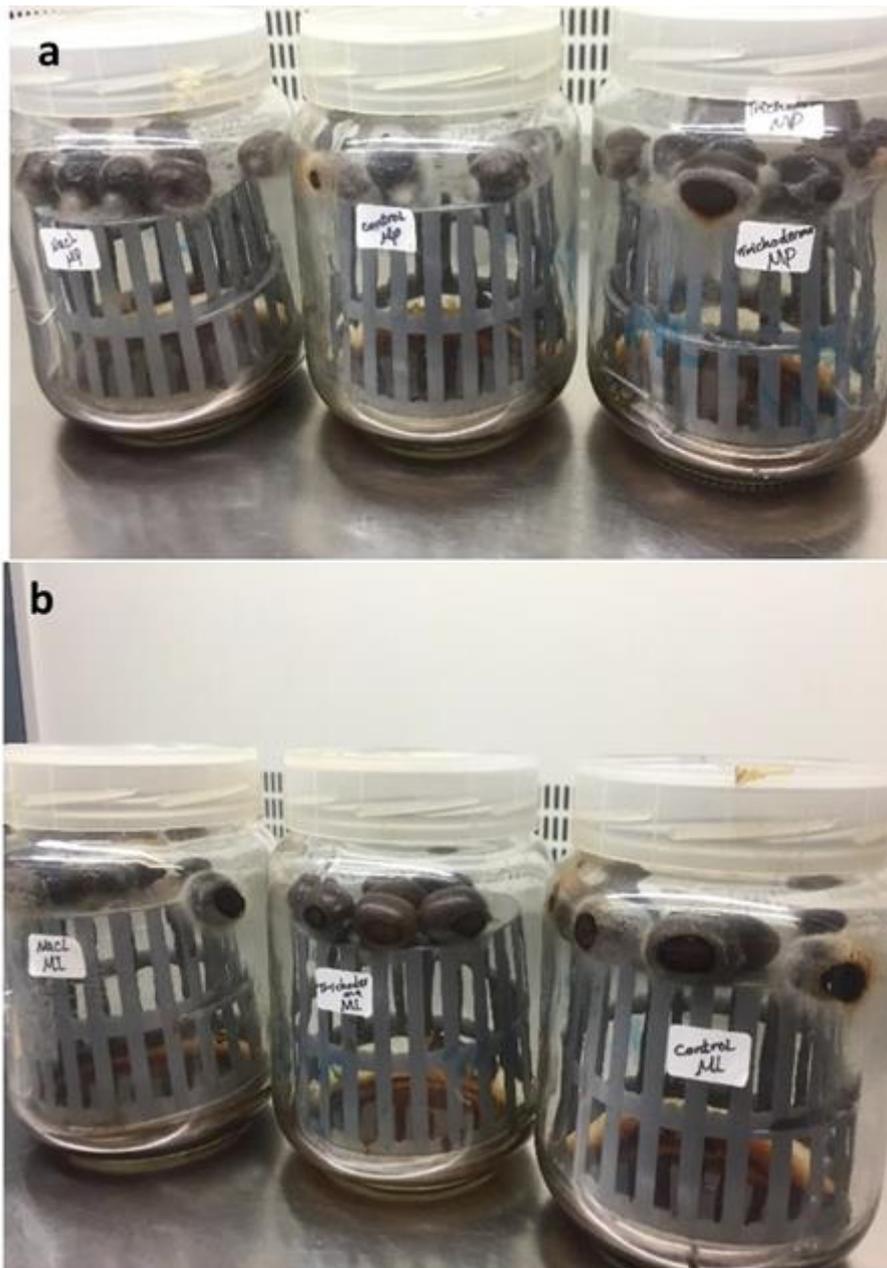


Figura 42. Aceitunas inoculadas con *C. gloeosporioides* y sometidas a tratamiento con compuestos orgánicos volátiles del extracto acuoso (Té) de *M. piperita* L. (a) y *M. longifolia* L. (b). Se incluyen los tratamientos control; plantas tratadas con *T. harzianum* y plantas tratadas con NaCl. Tras cuatro meses de tratamiento.

Los síntomas que se visualizaron en estas aceitunas varían entre los tratamientos y, aunque la presencia de micelio fue común a la mayoría de ellos (a excepción de *M. longifolia* L. de plantas elicitadas con *T. harzianum*), la extensión de los mismos difería de forma apreciable (Figura 43).



Figura 43. Aspecto de las aceitunas de los diferentes tratamientos con las infusiones de plantas del género *Mentha* e inóculo del patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* después de cuatro meses post-tratamiento: *M. piperita* L. (MP); *M. longifolia* L. (ML); Trichoderma: plantas elicidadas con *T. harzianum*; NaCl: plantas elicidadas con NaCl. El círculo indica las lesiones características del patógeno.

El crecimiento del micelio de *Colletotrichum gloeosporioides*, fue completamente inhibido por los compuestos orgánicos volátiles del té de plantas de *M. longifolia* L. tratadas con *Trichoderma harzianum*. Es posible que los compuestos orgánicos volátiles de *M. longifolia* L. tratada con *Trichoderma harzianum* actuasen como barrera limitando la penetración del tubo germinativo de *C. gloeosporioides* (Bautista-Baños *et al.*, 2003). Varios ensayos experimentales han demostrado la capacidad de varios compuestos orgánicos volátiles para inhibir la germinación y el crecimiento de patógenos de plantas, pero los mecanismos de acción siguen siendo desconocidos (Brilli

*et al.*, 2019). Sin embargo, otros eventos fisiológicos podrían estar involucrados en el control de la antracnosis durante el almacenamiento, ya que también se sabe que el quitosano induce varios mecanismos de defensa del huésped, como la inducción de barreras físicas y la producción de fitoalexinas (Hadwiger y Beckman, 1980; El Ghaouth *et al.*, 1997).

Para establecer si el efecto del tratamiento era fungicida o fungistático se sembró un fragmento de aceituna de cada tratamiento en placas Petri con medio PDA (Figura 44). Se pudo observar el crecimiento del patógeno en todos los casos, aunque con diferentes grados, mayor crecimiento en las aceitunas del control y el menor en aquellas que procedían del tratamiento con las plantas elicidadas con *T. harzianum* (Figura 44c). Además, entre estas últimas, el menor crecimiento se observó para las que habían estado sometidas a los volátiles de *M. longifolia* L. (Figura 44d).

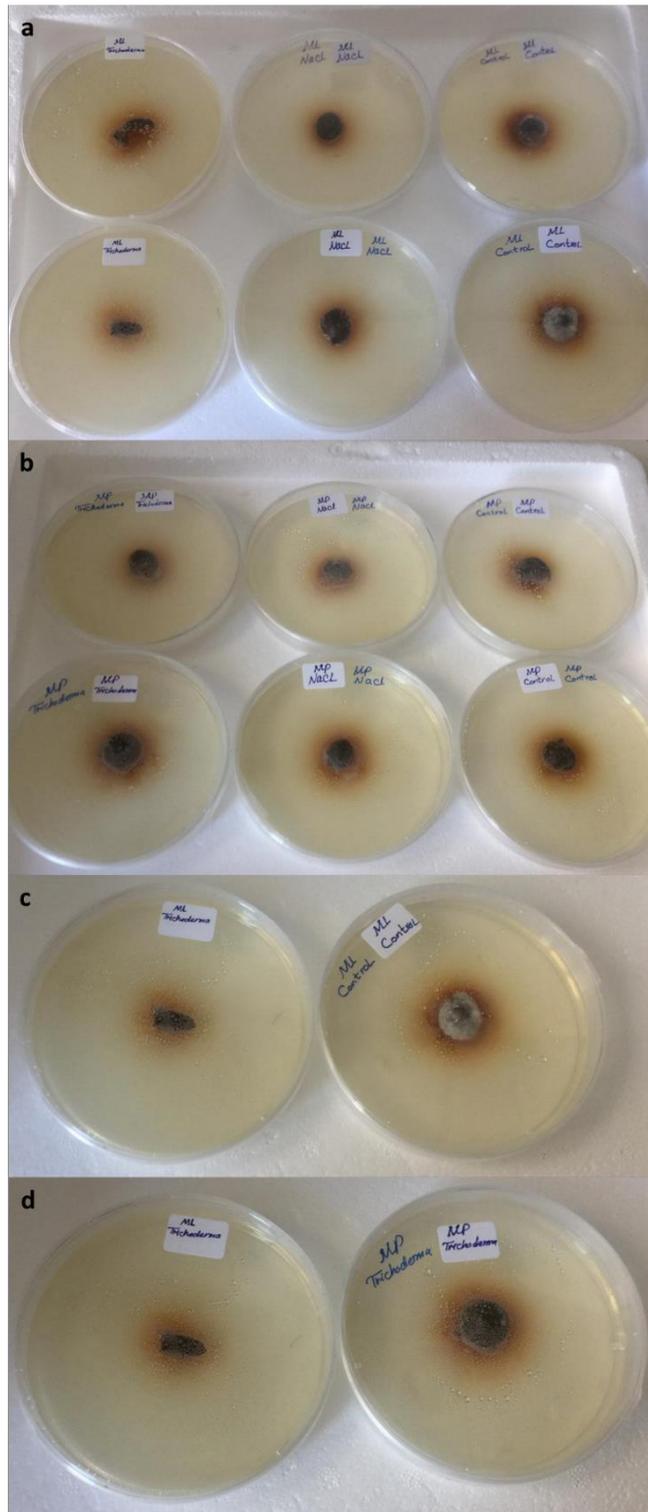


Figura 44. a) Placas de PDA con un fragmento de aceituna después del tratamiento con los volátiles de infusiones de *M. longifolia* L. (ML), de tratamientos control, *T. harzianum* y NaCl en planta, y el patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. b) Placas de PDA con un fragmento de aceituna después del tratamiento con los volátiles de infusiones de *M.*

*piperita* L. (MP), de tratamientos control, *T. harzianum* y NaCl en planta, y el patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. c) Placas de PDA con un fragmento de aceituna después del tratamiento con los volátiles de infusiones de *M. longifolia* L. (ML), de tratamientos control y *T. harzianum* en planta, y el patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. d) Placas de PDA con un fragmento de aceituna después del tratamiento con los volátiles de infusiones de *M. longifolia* L. (ML) y *M. piperita* L. (MP) de tratamientos con *T. harzianum* en planta, y el patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*.

En conclusión, el extracto de *M. longifolia* L. inhibe el desarrollo de *C. gloeosporioides* en aceitunas inoculadas artificialmente y podría utilizarse en el manejo integrado de la antracnosis del olivo en postcosecha. La incidencia de las infecciones después del tratamiento postcosecha con los compuestos orgánicos volátiles de *M. longifolia* L. se reduce significativamente. La menor incidencia corresponde al tratamiento con los compuestos orgánicos volátiles del té elaborado con las plantas de *M. longifolia* L. tratadas con *Trichoderma harzianum*. La naturaleza volátil de los compuestos orgánicos podría emplearse potencialmente con éxito para los tratamientos en un proceso definido como "biofumigación".

Otras consideraciones, más allá de la efectividad, están relacionadas con el proceso de registro y con su degradación, pero también con los posibles residuos sobre el fruto, su formulación y el impacto organoléptico, y son aspectos que deben estudiarse antes de la comercialización. Además, hay que considerar su papel eficaz desde el punto de vista ecoquímico en el control de enfermedades postcosecha, ya que estos productos de base biológica, si se comparan con los convencionales, pueden ofrecer claros beneficios ambientales debido a su renovabilidad, biodegradabilidad e hipotoxicidad (Mari *et al.*, 2016).

La importancia de este trabajo se encuentra también en la baja toxicidad del activo para los seres humanos, de hecho, el té de *M. longifolia* L. es ampliamente consumido, formando parte de los Compuestos GRAS (generalmente considerados seguros; *Generally Regarded as Safe*), aplicables en tratamientos seguros para el mercado de EE. UU.

Según la normativa europea, si su uso previsto es el control de enfermedades de las plantas, debe considerarse producto fitosanitario y cumplir los mismos procedimientos de registro que los plaguicidas químicos (Alabouvette *et al.*, 2006). Además, el aceite esencial de menta se incluye en la lista de plaguicidas aprobados, según aparece en la base de datos de plaguicidas de la Comisión Europea ([http://ec.europa.eu/food/plant / pesticides / eu-pesticides-database-redirect / index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/plant / pesticides / eu-pesticides-database-redirect / index_en.htm)).

## 5. CONCLUSIONES

1. La infusión de *M. longifolia* L. actúa como conservante con efecto fungistático del hongo *C. gloeosporioides* (patógeno responsable de la antracnosis del olivo, aceituna jabonosa) en la conservación de aceituna, mediante inmersión, de la que se produce un aceite aromático.

2. Es posible la elicitación abiótica con NaCl y biótica con *T. harzianum* de las plantas de *M. longifolia* L., obteniéndose, sobre todo, óxido de piperitona (1.2 epoxy-p-menthan-3-one) con propiedades antifúngicas.

3. También se elicitaron en las plantas de *M. longifolia* L. cultivadas con *T. harzianum*: Borneol, 1,2Cyclopentanedione, P-Menthan-1,8-dien-3-one, 2-pinen-4-one, Mento furanona, 2-ally-4-methylphenol, Phenol, p-cymen-2-ol y Dietil phtalate. Entre ellos, el borneol, la mento furanona, y el p-cymen-2-ol con actividad antifúngica.

4. Los compuestos orgánicos volátiles del extracto acuoso de las plantas de *M. longifolia* L. que han sido elicitados mediante el tratamiento biótico con *T. harzianum* muestran un potente efecto fungistático del hongo *C. gloeosporioides*.

5. *M. longifolia* L. ha mostrado que es una especie de interés en la industria agroalimentaria, apta para su cultivo en zonas áridas o salinas y útil en la conservación de alimentos.

# ***CAPÍTULO 3***



## **CAPÍTULO 3: Síntesis verde de nanopartículas de plata con extractos acuosos de *Mentha piperita* L. y *Mentha longifolia* L. Papel de los principales antioxidantes vegetales en la biosíntesis.**

### **RESUMEN**

Los extractos acuosos de *M. longifolia* L. y *M. piperita* L. permiten la síntesis verde de nanopartículas de plata. Las nanopartículas obtenidas se han caracterizado con espectrometría ultravioleta visible (UV-Vis), con espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), con difracción de rayos X (DRX) y con microscopía electrónica de transmisión (TEM) y su reactividad se ha determinado con cianuro (CN). La presencia de metabolitos del extracto asociados a las nanopartículas se ha determinado mediante FTIR. Las AgNPs sintetizadas con el extracto de *M. longifolia* L. tienen forma ovalada-esférica, con un tamaño medio de 42 nm en una concentración 3.61 nM. La diferencia en los metabolitos del extracto asociados a las nanopartículas con respecto a las nanopartículas sintetizadas con *M. piperita* L. se ha determinado mediante FTIR por la presencia de CH<sub>2</sub> adsorbido. La reactividad de las nanopartículas con CN se visualiza en las imágenes de TEM por la presencia de estructuras con forma de hoja de helecho y filamentos. Las AgNps sintetizadas con el extracto de *M. piperita* L. tienen forma ovalada-semiesférica, con un tamaño medio de 27 nm en una concentración 3.85 nM. La reactividad de las nanopartículas con CN se visualiza en las imágenes de TEM por la presencia de estructuras espinosas tridimensionales.

Con el objetivo de determinar los metabolitos de los extractos acuosos que han participado en la síntesis de las AgNPs, se ha comprobado que los principales antioxidantes presentes en los extractos de plantas (quercetina, β-caroteno, ácido gálico, ácido ascórbico, ácido hidroxibenzoico, ácido

cafeico, catequina y escopoletina) son capaces de sintetizar nanopartículas de plata cuando reaccionan con una solución de  $\text{AgNO}_3$ . El espectro de absorción UV-visible de las nanopartículas de plata sintetizadas con la mayoría de los antioxidantes muestra la característica banda de resonancia de plasmón superficial. Las nanopartículas sintetizadas con ácidos ascórbico, hidroxibenzoico, cafeico y gálico y escopoletina son esféricas. Las nanopartículas sintetizadas con quercetina se agrupan para formar estructuras micelares. Las nanopartículas sintetizadas por  $\beta$ -caroteno, presentan formas triangulares y poliédricas con esquinas truncadas. Se sintetizaron nanopartículas pentagonales con catequina. La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier ha mostrado que las biomoléculas recubren las nanopartículas de plata sintetizadas. Los difractogramas de rayos X en polvo mostraron la presencia de plata,  $\text{AgO}$ ,  $\text{Ag}_2\text{O}$ ,  $\text{Ag}_3\text{O}_4$  y  $\text{Ag}_2\text{O}_3$ . Como consecuencia de la reactividad de las nanopartículas de plata con el cianuro se obtuvieron estructuras en forma de varilla con quercetina y ácido gálico y estructuras *cookie-like* en las nanopartículas obtenidas con escopoletina. Este análisis explicó el papel que juegan los distintos agentes responsables de la biorreducción que desencadena la síntesis de nanopartículas en su forma, tamaño y actividad. Este estudio facilitará la síntesis dirigida y la aplicación de técnicas biotecnológicas para optimizar la síntesis verde de nanopartículas.

## 1. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología, ciencia y tecnología a nanoescala de átomos y moléculas, ayudará a abordar los principales desafíos sociales como el cambio climático, la reducción de las emisiones de carbono, el desarrollo de energías renovables, el uso de los recursos de manera más eficiente y cumpliendo con las necesidades médicas de una población que envejece (European Commission, 2018).

En los últimos años ha aumentado el interés por la búsqueda de nuevas estrategias para sintetizar nanopartículas, para minimizar los residuos y lograr un desarrollo más sostenible y respetuoso con el medioambiente. El uso de sustancias de origen biológico y los materiales renovables se han convertido en la clave para el desarrollo de la síntesis de nanopartículas (Raveendran *et al.*, 2006). Las técnicas biogénicas se incluyen en las denominadas *Green* tecnologías (tecnologías verdes) porque no implican el uso de productos químicos tóxicos o un elevado gasto energético que acompañan a la síntesis química o física (Saratale *et al.*, 2018). Dentro de la síntesis biológica, hay diferentes tipos de síntesis en función del material biológico que se utilice. Algunos ejemplos son la síntesis a partir de hongos, de bacterias y de diferentes extractos vegetales.

Este tipo de síntesis a partir de extractos vegetales se basa en la capacidad de algunos fitoquímicos presentes en el extracto como agentes reductores y estabilizadores. Algunos de estos compuestos son aminoácidos, enzimas, proteínas, esteroides, ácidos fenólicos, terpenoides, taninos, azúcares y flavonoides (Ghotekar, 2019; Narayanan y Rakesh, 2018; Akintelu *et al.*, 2020). Los componentes fenólicos presentes en el extracto vegetal son los encargados de la reducción de los iones metálicos, mientras que los

componentes heterocíclicos solubles en agua estabilizan las nanopartículas (NPs) que se forman. La síntesis verde de NPs metálicas por reducción de la sal del metal correspondiente, depende del extracto utilizado, ya que serán formadas y estabilizadas por diferentes compuestos presentes en dicho extracto (Sutradhar *et al.*, 2013).

Las nanopartículas metálicas son de gran interés científico y tecnológico por sus propiedades específicas, que difieren de las de los materiales a granel convencionales, lo que los hace nuevas herramientas técnicas (Rotello, 2004). Entre las nanopartículas metálicas obtenidas por síntesis verde, las de plata destacan con numerosos usos en electrónica, confección, pinturas, cosmética, bactericidas, biofungicidas, aplicaciones biomédicas, en el ámbito médico-farmacéutico e industrias alimentarias, etc. (Srikar *et al.*, 2016).

Las AgNPs tienen una serie de características fisicoquímicas que las hacen notables con respecto a otras NPs, como su estabilidad y alta conductividad, su actividad catalítica y sus capacidades antimicrobianas (Ab razak *et al.*, 2021). Por ello, son utilizadas en diversos ámbitos como la cosmética, la alimentación o la medicina. Se sabe que estas NPs, e incluso el metal en sí tiene propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes. Hay registros de uso de AgNPs en ungüentos para curar heridas y evitar infecciones (Husen y Siddiqi, 2014). En particular, las nanopartículas de óxido de plata (I) se emplean en la producción de polímeros y nanofármacos muy prometedores para su uso en medicina (Korkmaz y Karada, 2021).

Existen numerosas publicaciones en los últimos años en las que se refiere la síntesis de AgNPs utilizando bioorgánicos presentes en muchas especies de plantas (véanse, por ejemplo, las revisiones de Saratale *et al.*, 2018; Srikar *et al.*, 2019; Iravani, 2011; Sharma *et al.*, 2019). Los extractos de plantas tienen el potencial de convertirse en un recurso excelente debido a su

disponibilidad, fácil adquisición y capacidad para producir nanopartículas no tóxicas de forma segura y económica (Abdelghany *et al.*, 2018).

Las plantas tienen la capacidad de reducir los iones metálicos en su superficie o absorberlos por las raíces y transportarlos a varios órganos y tejidos donde también puede producirse la reducción. Los extractos de plantas pueden actuar sobre la síntesis de AgNP al reducir los iones  $\text{Ag}^+$ . La capacidad de un extracto vegetal para sintetizar nanopartículas depende del compuesto activo responsable de la reducción de iones de  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$  y varía según el organismo o extracto vegetal utilizado (Siddiqi *et al.*, 2018).

Las plantas tienen una capacidad innata para biosintetizar una amplia gama de antioxidantes capaces de mitigar el daño oxidativo inducido por especies reactivas de oxígeno (ROS). Los agentes reductores consisten en una gran cantidad de moléculas orgánicas como carbohidratos, grasas, proteínas, enzimas, coenzimas, fenoles, flavonoides, terpenos, alcaloides, etc. (Kasote *et al.*, 2015), que son capaces de producir nanopartículas de plata a partir, por ejemplo, de la reducción de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) (Geoprincy *et al.*, 2013).

En las células vegetales, existen tres orgánulos en los que se produce principalmente el estrés oxidativo con la generación de ROS. Las ROS se generan en los fotosistemas I y II de los cloroplastos, en ubiquinona y complejo III en la cadena de transporte de electrones mitocondrial y, en menor medida, en la membrana y matriz del peroxisoma (Janků *et al.*, 2019). La mayor parte del tiempo la producción de estos radicales libres está regulada porque actúan como moléculas de señalización. El control de estos radicales se basa de manera altamente eficiente en dos sistemas complementarios: enzimático y no enzimático (Ahmad *et al.*, 2010). El sistema enzimático comprende varias enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa que son muy específicas

del sustrato. El sistema de control no enzimático comprende antioxidantes de bajo peso molecular como el ácido ascórbico, glutatión, prolina, carotenoides, ácidos fenólicos, flavonoides, etc. y metabolitos secundarios de alto peso molecular, como taninos, que actúan como captadores de radicales libres, agentes reductores y quelantes de metales.

Muchas familias y especies de plantas sintetizan cientos de sustancias fitoquímicas únicas. (Kessler y Kalske, 2018). Se han descrito alrededor de 200.000 compuestos en aproximadamente el 30% de plantas superiores y muchos taxones permanecen sin explorar. Esta diversidad se amplifica aún más por plasticidad, ya que la fitoquímica varía con la ontogenia y la filogenia en respuesta a factores abióticos e interacciones bióticas (Barton y Boege, 2017; Dicke y Baldwin, 2010; Yang *et al.*, 2018). Además, la diversidad fitoquímica varía entre ramas, órganos, e incluso tejidos dentro de órganos (Shelton, 2005; Herrera, 2009). Como organismos sésiles, las plantas se han adaptado a su entorno sintetizando una enorme variedad de secundarios de bajo peso molecular metabolitos, con funciones ecológicas y evolutivas (Lopresti y Weber, 2016).

El perfil metabólico de una especie vegetal determinada, su contenido en compuestos fitoquímicos y, particularmente, en metabolitos secundarios, varía con el tiempo, el espacio y la etapa de desarrollo (Kutchan, 2005).

Entre los antioxidantes destacan:

La vitamina C (ácido ascórbico / ascorbato) que se genera en el metabolismo aeróbico y fácilmente dona un electrón a radicales oxidantes potencialmente dañinos como hidroxilo, radical ( $\text{HO}^\cdot$ ), radical alcoxilo ( $\text{RO}^\cdot$ ), radical peroxilo ( $\text{ROO}^\cdot$ ), radical tiol ( $\text{RS}^\cdot$ ) y tocoferoxilo radicales (Phaniendra *et al.*, 2015).

El  $\beta$ -caroteno, que es el carotenoide más común en las plantas. Es un pigmento soluble en grasa con actividad antioxidante. Como antioxidante, su actividad se produce sobre el oxígeno singlete y otras moléculas excitadas electrónicamente que se generan en reacciones de foto o quimioexcitación. También reacciona con los radicales alcoxilo ( $\text{RO}^\cdot$ ) y peroxilo ( $\text{ROO}^\cdot$ ) (Gulcin, 2020).

Los compuestos fenólicos se clasifican en cinco grupos principales (Figura 45): taninos, flavonoides, ácidos hidroxicinámicos, ácidos hidroxibenzoicos y otros (De la Rosa *et al.*, 2018). Los compuestos fenólicos tienen en común la presencia de un fenol en su estructura. Dependiendo del número de fenoles, se clasifican en: fenoles simples con un solo fenol (ácidos fenólicos); Polifenoles con dos fenoles (flavonoides y estilbenos) o más (taninos). Los ácidos fenólicos tienen un grupo carboxílico en dos estructuras de carbono diferentes, lo que resulta en estructuras derivadas de ácido hidroxicinámico (por ejemplo, ácido cafeico) o hidroxibenzoico ácido (Kumar *et al.*, 2019).

Los flavonoides, como la quercetina, son compuestos polifenólicos cuya característica básica es la estructura del núcleo de flavona (2-fenil-benzogamma-pirano) formado por dos anillos benceno (A y B) unidos por un anillo de pirano (C) que contiene oxígeno (Panche *et al.*, 2016).

Los taninos hidrolizables son compuestos con un núcleo central de glucosa u otro poliol esterificado con ácido gálico o con ácido hexahidroxidifénico (Okuda *et al.*, 2009). Estos compuestos están presentes solo en las angiospermas dicotiledóneas. Los taninos condensados, también llamados proantocianidinas, son oligómeros o polímeros con un núcleo 3-flavanol. Ambos taninos, los hidrolizables (como el ácido gálico) y los condensados (como la catequina) eliminan la actividad del radical superóxido, hidroxilo ( $\text{HO}^\cdot$ ), radical peroxilo ( $\text{ROO}^\cdot$ ) y NO (Smeriglio *et al.*, 2016).

Las cumarinas son compuestos químicos con un anillo de benceno condensado en una lactona. Todas las cumarinas exhiben actividad antioxidante. La escopoletina, en particular, exhibe una actividad antioxidante significativa (Borges Bubols *et al.*, 2003).

En el caso de *M. longifolia* L. se ha determinado la presencia, sobre todo, de terpenoides y flavonoides (Nagell *et al.*, 1974; Alí *et al.*, 2002; Idrissi y Fkih-Tetouani, 2001) y así ha quedado también patente en los Capítulos 1 y 2 de esta tesis doctoral. Estos componentes son conocidos por su importante acción como agentes reductores de sales metálicas (Javed y Mashwani, 2020) y han permitido la síntesis de nanopartículas de plata y de oro (Javed y Mashwani, 2020; Javed *et al.*, 2020c; Javed *et al.*, 2020d; Rauf *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021).

A pesar de las muchas ventajas de los extractos de plantas para la síntesis de AgNP, existen también desventajas. El tamaño y la morfología de las partículas son difíciles de controlar. El uso de estos todavía tiene limitaciones debido principalmente a la baja eficiencia de los métodos de síntesis y la falta de estandarización del tamaño (De Souza *et al.*, 2019). Además, la variabilidad y funcionalidad de extractos de plantas a menudo se desconoce, lo que dificulta la comprensión de la formación mecanismos en comparación con los enfoques químicos establecidos (Khan *et al.*, 2018). Las diferencias en los agentes responsables de la síntesis de nanopartículas desencadenada por la bio-reducción dan como resultado la producción de nanopartículas con diferentes formas, tamaños y bioactividad.

Lograr una producción rentable a gran escala de nanopartículas requiere investigación relacionada con los metabolitos vegetales responsables de su síntesis, facilitando así la aplicación de técnicas de ingeniería genética y metabólica (Saratale *et al.*, 2018).

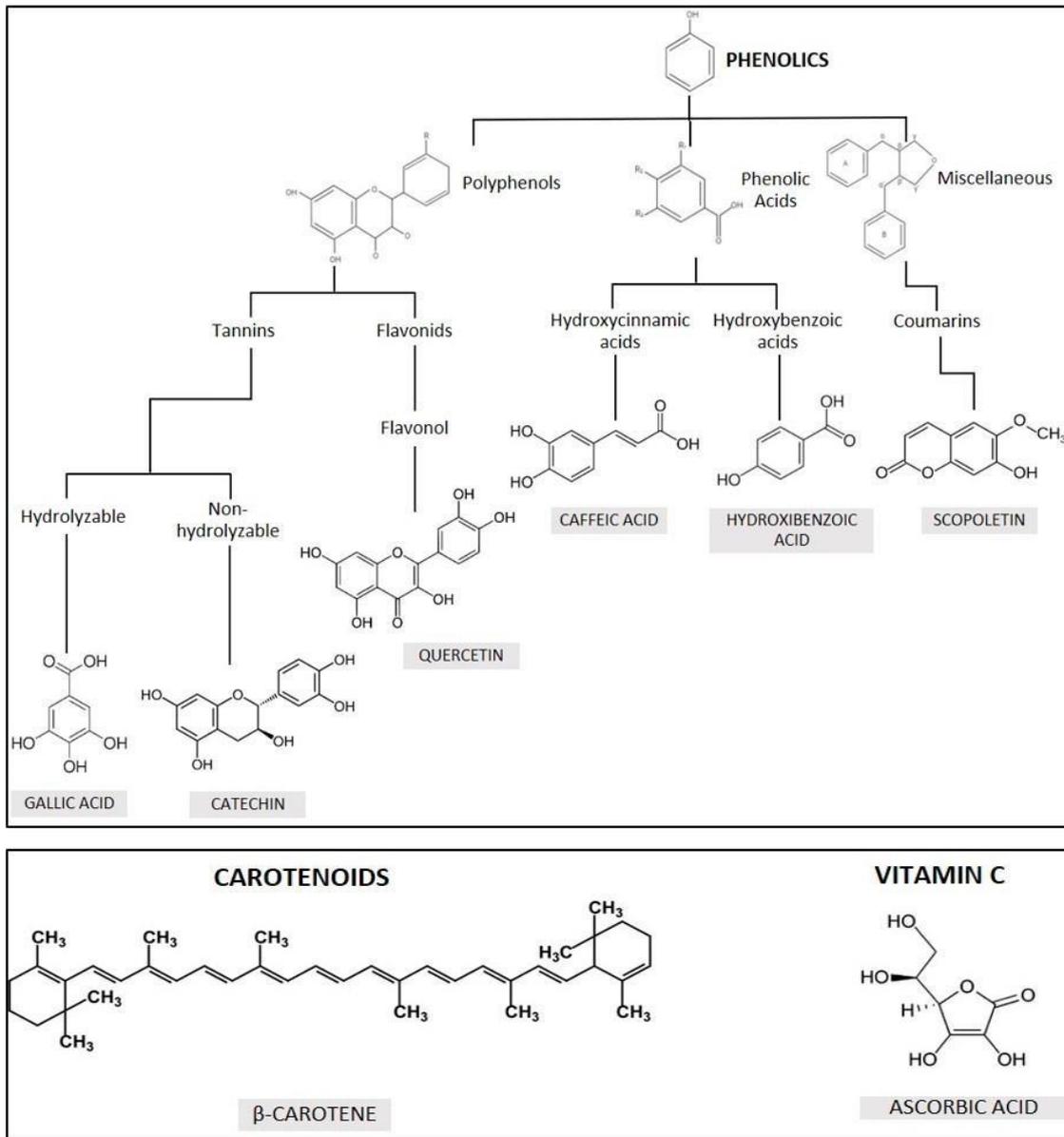


Figura 45. Antioxidantes naturales no enzimáticos presentes en plantas y utilizados en esta tesis doctoral.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este capítulo es la síntesis de nanopartículas de plata con el extracto acuoso (té) de *Mentha longifolia* L. y su caracterización.

Para alcanzar este objetivo se han planteado los siguientes objetivos parciales:

1. Síntesis de nanopartículas de plata a partir de  $\text{AgNO}_3$  y té de *M. longifolia* L.
2. Caracterización de las nanopartículas de plata sintetizadas con el té de *M. longifolia* L., y estudio comparativo con las nanopartículas de plata sintetizadas con el té de *M. piperita* L., mediante: Espectrometría UV-Vis, FTIR, TEM y DRX.
3. Estudio de la reactividad con cianuro de las nanopartículas de plata sintetizadas con el té de *M. longifolia* L.

El objetivo secundario es la síntesis, caracterización y estudio de la reactividad con cianuro de las nanopartículas de plata obtenidas por la reacción de  $\text{AgNO}_3$  y los principales antioxidantes presentes en las plantas para determinar su posible papel en la síntesis de nanopartículas de plata sintetizadas con el té de *M. longifolia* L.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Obtención del extracto acuoso.

El material utilizado para obtener los extractos de *Mentha piperita* L. y *Mentha longifolia* L. fueron hojas secas de ambas especies que se comercializan para infusiones. El proceso para la obtención de los extractos acuosos se muestra en la Figura 46. Se pulverizaron estas hojas con una espátula hasta obtener un polvo fino, que se conserva a temperatura ambiente.

Se pesaron 500 mg de polvo de hojas de menta y se añadieron 50 mL de agua destilada estéril. Se incubó en un baño maría a 80 °C en agitación durante 30 minutos. Pasado este tiempo se filtró con papel de filtro y después se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se recogió y se filtró con filtros estériles de 0,22 µm, y el extracto acuoso obtenido se conservó a 4 °C en oscuridad.

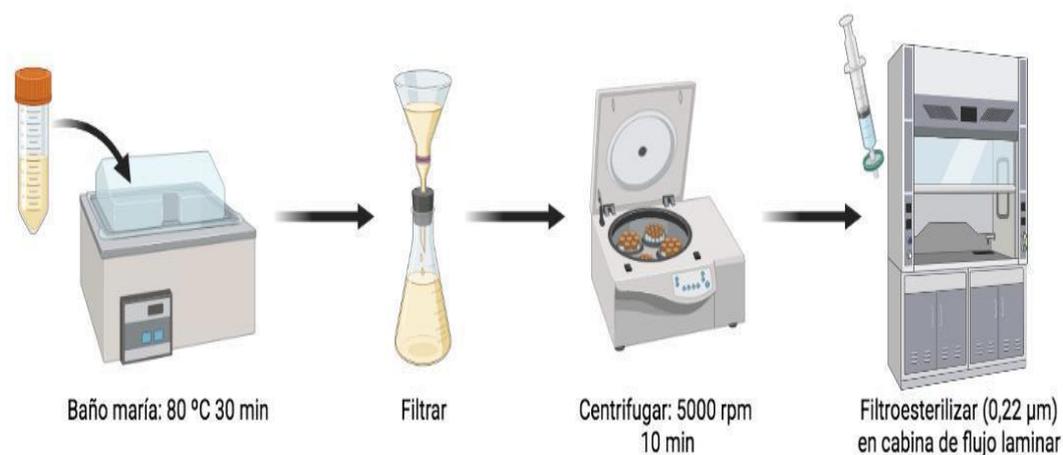


Figura 46. Proceso de obtención de extractos vegetales a partir de hojas de *Mentha* sp.

### 3.2 Caracterización de las disoluciones de nitrato de plata.

Las disoluciones de sal metálica de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), fueron caracterizadas en el espectrofotómetro. Se realizó un barrido de 250 a 450 nm de longitud de onda utilizando un espectrofotómetro UV-Visible (Espectrofotómetro Unicam modelo Helios  $\beta$ ).

### 3.3 Síntesis verde de nanopartículas de plata a partir de extractos de *Mentha longifolia* L. y *Mentha piperita* L.

La biosíntesis de nanopartículas (NPs) se realizó a partir del extracto acuoso obtenido de las hojas de los dos tipos de menta, que contienen compuestos fitoquímicos que actúan como agentes reductores y estabilizadores de las sales metálicas. Como precursor se utilizó  $\text{AgNO}_3$  (nitrato de plata).

El proceso de síntesis de NPs metálicas se ilustra en la figura 47. En primer lugar, se preparó una disolución madre de la sal metálica a una concentración 1M (849 mg de nitrato de plata en 5 mL de agua destilada estéril). A partir de esta disolución madre se ensayaron diferentes concentraciones de la sal metálica (1 mM, 5 mM, 10 mM, 100 mM y 200 mM) para sintetizar las AgNPs, como aparece en la Tabla 12. Estas reacciones se llevan a cabo en tubos de ensayo de cristal en un volumen de 10 mL. El volumen final de las mezclas son 2,5 mL, de los cuales 2 mL son extracto acuoso de la menta y el resto son cantidades variables de la disolución madre de la sal metálica y de agua destilada.

Tabla 12. Preparación de las diferentes concentraciones de sales metálicas para la síntesis de nanopartículas de plata con extracto acuoso de *Mentha sp.*

Concentración de sal metálica (mM)	Extracto vegetal (mL)	Solución Madre sal metálica (μL)	Agua destilada estéril (μL)
0	2	0	500
1	2	2,5	497,5
5	2	12,5	487,5
10	2	25	475
100	2	250	250
200	2	500	0

Durante las primeras horas se realizaron observaciones para comprobar los diferentes cambios visibles, como por ejemplo cambio en el color del extracto, resultado de la formación de NPs. Tras esto, las soluciones ensayadas fueron incubadas en la estufa a 60 °C hasta que se evaporó todo el sobrenadante.

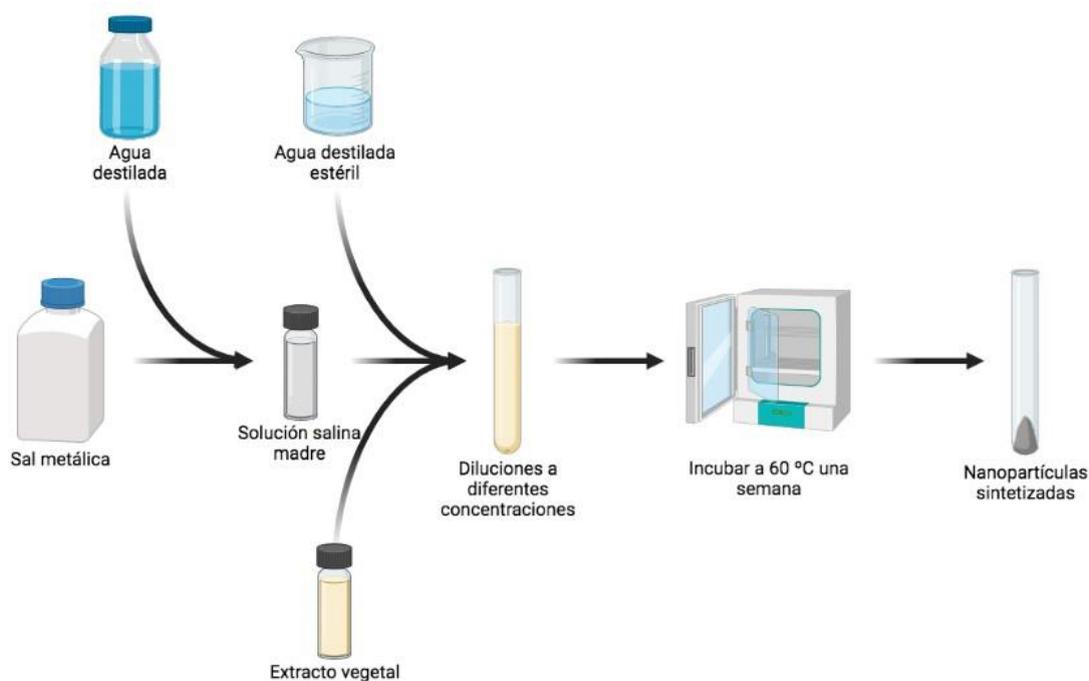


Figura 47. Proceso de síntesis verde de nanopartículas metálicas a partir de un extracto vegetal de hojas de *Mentha sp.* utilizando nitrato de plata como precursor.

### **3.4 Síntesis verde de nanopartículas de plata a partir de agentes reductores presentes en plantas.**

Para la síntesis de nanopartículas de plata, se utilizó nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) y los siguientes agentes reductores (Figura 45): quercetina,  $\beta$ -caroteno, ácido gálico, ácido ascórbico, ácido hidroxibenzoico, ácido cafeico, catequina y escopoletina. Se obtuvieron todos los reactivos de Sigma-Aldrich Química SL, Madrid, España. Todos los reactivos se utilizaron directamente.

Todas las soluciones madre se prepararon utilizando agua destilada, la solución de nitrato de plata en concentración 2 M y soluciones 100  $\mu\text{M}$  de cada antioxidante. Los dos antioxidantes menos hidrofílicos (quercetina y  $\beta$ -caroteno) se mantuvieron en constante agitación.

Para la preparación de la mezcla de reacción, se mezcló la solución de nitrato de plata con el volumen apropiado de solución de cada antioxidante para lograr las siguientes concentraciones de nitrato de plata en el volumen final: 1 mM, 2,5 mM, 5 mM y 10 mM con una concentración de 100  $\mu\text{M}$  del antioxidante. La reacción de reducción se llevó a cabo a 40 °C durante 5 h. Se utilizó agitación constante para preparar y utilizar las soluciones antioxidantes.

### 3.5 Caracterización de las nanopartículas.

Existen diferentes técnicas de caracterización para estudiar las propiedades fisicoquímicas (tamaño, forma, peso molecular, pureza, composición química, estabilidad y solubilidad) de las NPs obtenidas por síntesis verde. Algunos de los métodos utilizados para tener una información detallada sobre la naturaleza del producto obtenido son el análisis espectroscópico UV-VIS, la microscopía electrónica de transmisión (TEM), el análisis FTIR y el análisis de difracción de rayos X (DRX).

#### 3.5.1 Análisis espectrofotométrico UV-Vis.

La espectroscopia de absorción UV-vis es el método más utilizado para caracterizar las propiedades ópticas y las estructuras electrónicas de las nanopartículas, ya que las bandas de absorción están relacionadas con el diámetro y la relación de aspecto de las nanopartículas metálicas y semiconductoras. Las soluciones de nanopartículas de Ag coloidal tienen un color distintivo que surge de sus pequeñas dimensiones. En dimensiones nanométricas, la nube de electrones puede oscilar sobre la superficie de la partícula y absorber radiación electromagnética a una energía particular. Esta resonancia conocida como resonancia de plasmón de superficie o absorbancia de plasmón de nanopartículas es una consecuencia de su pequeño tamaño, pero puede verse influenciada por numerosos factores, en particular, las funcionalizaciones de superficie y solvente son los contribuyentes importantes a la frecuencia e intensidad exactas de la banda.

El tamaño y la forma de las nanopartículas metálicas determinan la posición espectral de la absorción de la banda de plasmón, así como como su ancho. Los metales nanométricos, como la plata, se ha demostrado que exhiben propiedades ópticas dependientes del tamaño (Smitha *et al.*, 2008).

Se realizó un barrido en el espectrofotómetro en el rango de 300 a 500 nm de las soluciones de extracto vegetal a las que se les añadió una concentración 100 mM de sal metálica, tanto de nitrato de plata como de aluminio cada 15 minutos durante 2 horas, y a las 24 horas de producirse la reacción.

En el caso de las síntesis mediante los agentes reductores, se analizaron los espectros de absorción UV-visible de las soluciones de nanopartículas de Ag en el rango de longitud de onda de 300 a 500 nm usando un espectrofotómetro UV-visible. Los resultados se presentan como gráficos de barras cuando la longitud de onda del plasmón de resonancia se ha podido determinar, de lo contrario solo se presenta el espectro.

### *3.5.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).*

La microscopía electrónica de transmisión es una técnica muy popular para la caracterización de nanomateriales. Esta técnica ofrece imágenes con alto detalle espacial de resolución en un rango atómico y ofrece detalles de la composición química del metal (Smith, 2015). La manera en que funciona es que se dispara un haz de electrones a la muestra que, si es de menos de 100 nm de grosor es atravesada por estos. Al hacerlo, se da una interacción electrón-electrón que los transforma. Estos electrones transformados son detectados por una serie de lentes que generan una imagen con la información obtenida (Anukiruthika *et al.*, 2020).

Además, mediante el TEM se puede analizar con la espectroscopía de rayos X de dispersión de energía (EDS, también abreviado EDX o XEDS) la caracterización química / análisis elemental de las nanopartículas.

Las nanopartículas se dispersaron en 1 mL de agua. Las rejillas TEM fueron preparadas colocando una gota de la suspensión de partículas en una rejilla de cobre recubierta de carbón y secándola a temperatura ambiente. Este análisis se realizó con un microscopio JEOL JEM-2100 en el Centro de Apoyo a la Investigación (CAI) e Instalación Científico Tecnológica Singular (ICTS) de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica.

### *3.5.3 Análisis de difracción de rayos X (DRX).*

Esta técnica es utilizada para conocer las propiedades de las superficies de los nanomateriales, que aportan datos cuantitativos, de estado químico y de distribución energética. Permite la identificación de las fases cristalinas en la muestra mediante la comparación de su espectro de difracción con una base de datos internacional reconocida y que contiene más de 190.000 fases. La muestra se excita por radiación electromagnética a una longitud de onda determinada, de manera que la muestra emite fotoelectrones. Esta energía emitida es detectada por un fotomultiplicador, y nos da información sobre la muestra (Anukiruthika *et al.*, 2020).

Los perfiles de difracción de rayos X en polvo se obtuvieron de un Empyrean Cu LFF Difractómetro de rayos X con un rango de  $2\theta$  de 2 a 80. Los análisis se realizaron en el Centro de Apoyo a la Investigación (CAI) de Difracción de Rayos X de la Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria s / n, 28040 Madrid. Los patrones de difracción resultantes (medidos con DRX) se compararon con patrones de referencia de la base de

datos de patrones de difracción patrones (Centro Internacional de Datos de Difracción; base de datos ICDD).

El tamaño medio de las nanopartículas se calculó de acuerdo con el método de Scherrer (Patterson, 1939; Scherrer, 1918):

$$\tau = \frac{0,9 \lambda}{\beta * \cos\theta}$$

Donde:

D = el tamaño medio de cristal (nm),

k = constante de Scherrer,

$\lambda$  = Longitud de onda de rayos X,

$\beta$  = ancho completo a la mitad del máximo del pico (FWHM). Esto tiene que ser convertido a radianes

$\theta$  = ángulo de difracción.

La evaluación del análisis DRX se utilizó para identificar la naturaleza de las nanopartículas sintetizadas. Primero, los valores  $2\theta$  estándar para las nanopartículas de plata en forma de nanocristales dados en la literatura fueron indexados a los planos (111), (200), (220), (311) y (222). Luego, la presencia de otros picos de  $2\theta$  entre 20 a 80 en el difractograma DRX indicó la presencia de óxidos de plata. Las fases identificadas para los óxidos de plata se han indicado y la lista de patrones identificados se ha insertado como tablas en los gráficos.

### 3.5.4 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) se basa en el hecho de que la mayoría de las moléculas absorben la luz en la región infrarroja del espectro electromagnético, convirtiéndola en vibración molecular. Esta absorción es característica de la naturaleza de los enlaces químicos presentes en una muestra.

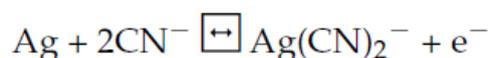
Con un espectrómetro, esta absorción se mide como una función de longitud de onda (como números de onda, típicamente de  $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ ). El resultado es un espectro que sirve como una característica "huella digital molecular" que se puede utilizar para identificar muestras orgánicas e inorgánicas.

La FTIR permite el análisis *in situ* de interfaces para investigar la adsorción superficial de grupos funcionales en nanopartículas (Imali *et al.*, 2014). Los datos moleculares obtenidos a través de esta técnica permiten establecer cambios estructurales y conformacionales de los grupos funcionales autoensamblados en la superficie de las nanopartículas (Baraton y Merhari, 2007).

Las mediciones de espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier se realizaron con un Espectrofotómetro JASCO (FT / IR-6200) en el CAI de Técnicas Físicas y Químicas, Unidad de Espectroscopia y Correlación de la Universidad Complutense de Madrid, Plaza de Ciencias, 2, 28040 Madrid. El análisis de los resultados se realizó según las tablas de espectroscopía infrarroja (Callejas, 2000).

### 3.5.5 Oxidación de AgNPs en presencia de cianuro.

La interacción entre las nanopartículas de plata (AgNP) sintetizadas con los agentes antioxidantes e iones de cianuro fue estudiada usando la absorción UV-Visible. El método se basa en la oxidación de las AgNP con oxígeno disuelto en presencia de iones cianuro, lo que produce una disminución en la intensidad de la banda de absorción de resonancia del plasmón superficial de las AgNPs (Hajizadeh *et al.*, 2011). Este fenómeno ocurre como consecuencia de la formación del complejo  $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$  incoloro según la siguiente reacción:



El espectro de absorción entre 300 y 500 nm de longitud de onda fue analizado añadiendo un volumen igual de cada antioxidante a la solución madre de nitrato de plata (2 M) y en comparación con el espectro cuando se añadió la mitad de volumen de una solución de cianuro 5 mM.

### 3.5.6 Estimación de la concentración de nanopartículas de plata.

Se utilizaron dos métodos diferentes para estimar la concentración de nanopartículas de plata sintetizadas por cada uno de los agentes reductores.

- a) A partir del espectro UV-visible y el tamaño medio de las nanopartículas determinado por TEM según Paramelle *et al.* (2014). La concentración molar de nanopartículas de plata ( $\text{mol L}^{-1}$ ) se calcula aplicando la Ecuación de la ley de Lambert- Beer:

$$C = A/\epsilon$$

Donde: C es la concentración molar, A es la absorbancia máxima y  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar.

- b) Calculando la concentración molar según Kalishwaralal *et al.* (2010). Según la fórmula propuesta por la Ecuación de Liu *et al.* (2017):

$$C = N_T / N \cdot V \cdot N_A$$

Donde: C es la concentración molar de nanopartículas,  $N_T$  es el número total de átomos de plata agregado como  $\text{AgNO}_3$ , N es el número de átomos de cada nanopartícula, V es el volumen de la reacción de síntesis en L (litros) y  $N_A$  es el número de Avogadro ( $6.023 \times 10^{23}$ ).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Síntesis verde de nanopartículas de plata a partir de extractos de *Mentha longifolia* L. y *Mentha piperita* L.

Siguiendo el método de preparación de los extractos acuosos se obtuvieron: uno de color amarillo-verdoso en el caso de *Mentha longifolia* L. (figura 48a) y otro de color marrón-caramelo en el caso de *Mentha piperita* L. (figura 48b).

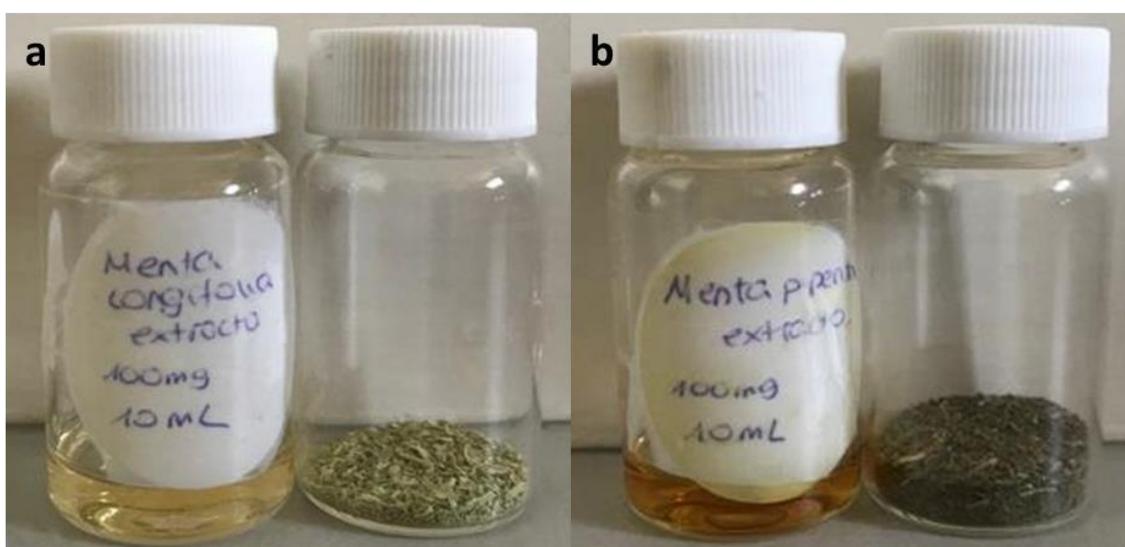


Figura 48. Extractos acuosos y hojas secas de a) *Mentha longifolia* L. y b) *Mentha piperita* L.

La formación de las AgNPs por síntesis verde fue determinada de manera visual, ya que se espera un cambio de color en el extracto a lo largo del tiempo al añadir el nitrato de plata. En este caso fue más rápido: una vez añadido el nitrato de plata se pudo observar un cambio en el color a un tono muy oscuro a los 10 minutos (Figuras 48b y 49b). Se pudo observar de manera clara la diferencia entre las diferentes concentraciones de nitrato de

plata, ya que cuanto mayor era la concentración, más rápido se tornaba oscuro el color de la disolución y más oscura era esta. Se observaron rápidamente unas deposiciones de color negro que precipitan al fondo del tubo de ensayo.

Entre las diluciones de AgNPs de *Mentha longifolia* L. (Figura 49) y las de *Mentha piperita* L. (Figura 50) no hay mucha variación: ambas forman precipitado de una tonalidad similar al poco tiempo de añadir el nitrato de plata. En el caso de las mentas, se ha atribuido a los terpenos, fundamentalmente sesquiterpenoides y monoterpenoides, la principal acción reductora en reducir Ag a Ag<sup>0</sup> del nitrato de plata (Javed *et al.*, 2020c).

Una vez se pusieron los tubos en la estufa a 60 °C los cambios se hicieron más notorios y se observaron en los días posteriores. Conforme pasaban los días, el extracto fue evaporándose y fueron quedando cada vez más depósitos en el fondo de los tubos de ensayo. A la semana, el líquido se había evaporado por completo y en el fondo de los tubos aparecieron unas estructuras cristalinas de color negruzco.

Se observó que en todas las concentraciones se formaron estas estructuras, pero que el tamaño de este producto depositado variaba en función de la concentración inicial de nitrato de plata que había en los tubos de ensayo. Entre las distintas concentraciones no se observan diferencias de color: todas las concentraciones presentan un color negro (Figura 50). Tampoco aparecen diferencias a la hora de disgregar la masa metálica, ya que todas tenían una textura similar, sin poros, y estaban muy adheridas al fondo del tubo de ensayo.

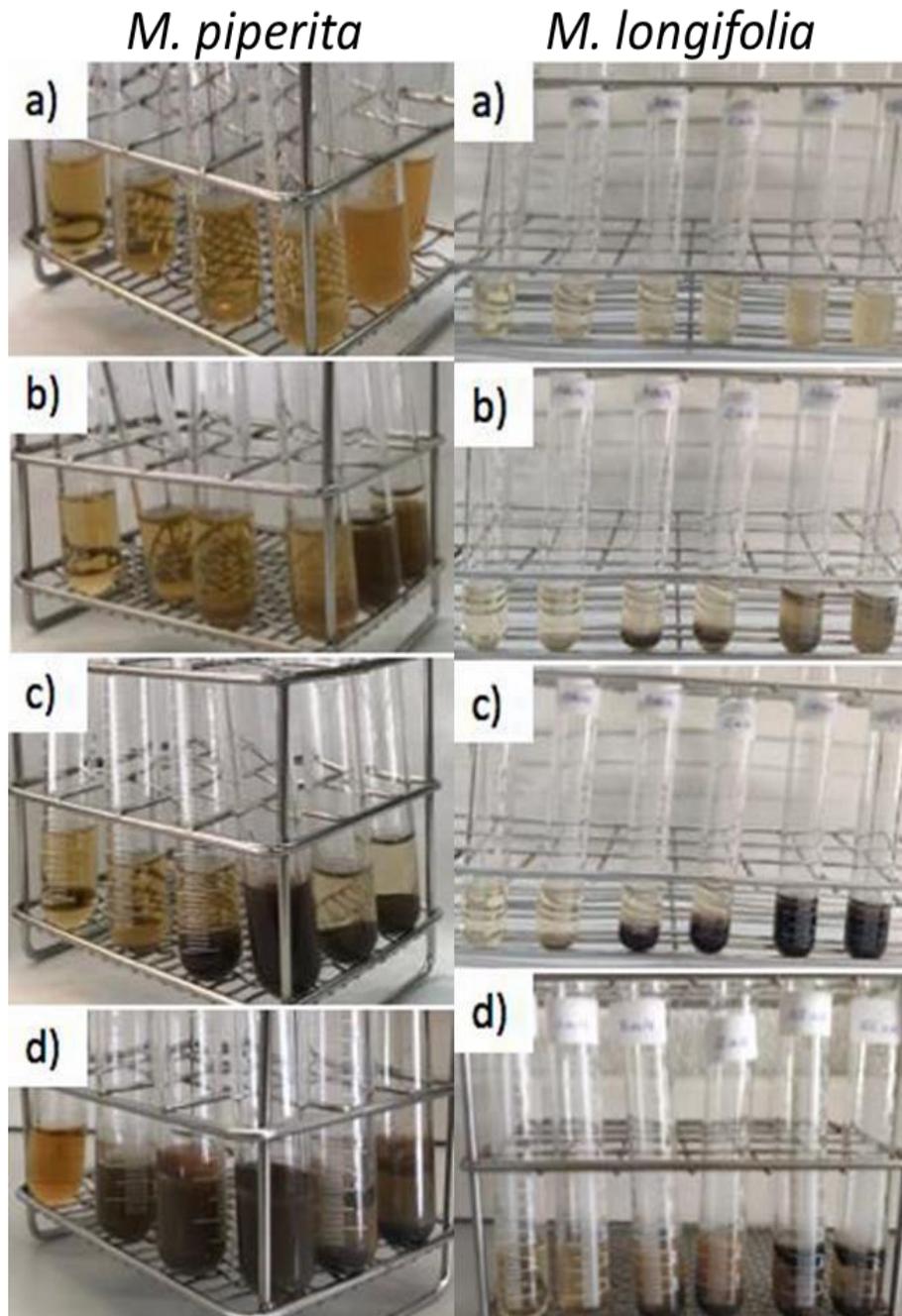


Figura 49. Extractos acuosos de *Mentha piperita* L. y *M. longifolia* L. con nitrato de plata, a diferentes concentraciones (de izquierda a derecha: 0, 1, 5, 10, 100 y 200 mM). (a) a tiempo 0; (b) a 1 hora; (c) a 24 horas y (d) a 1 semana.

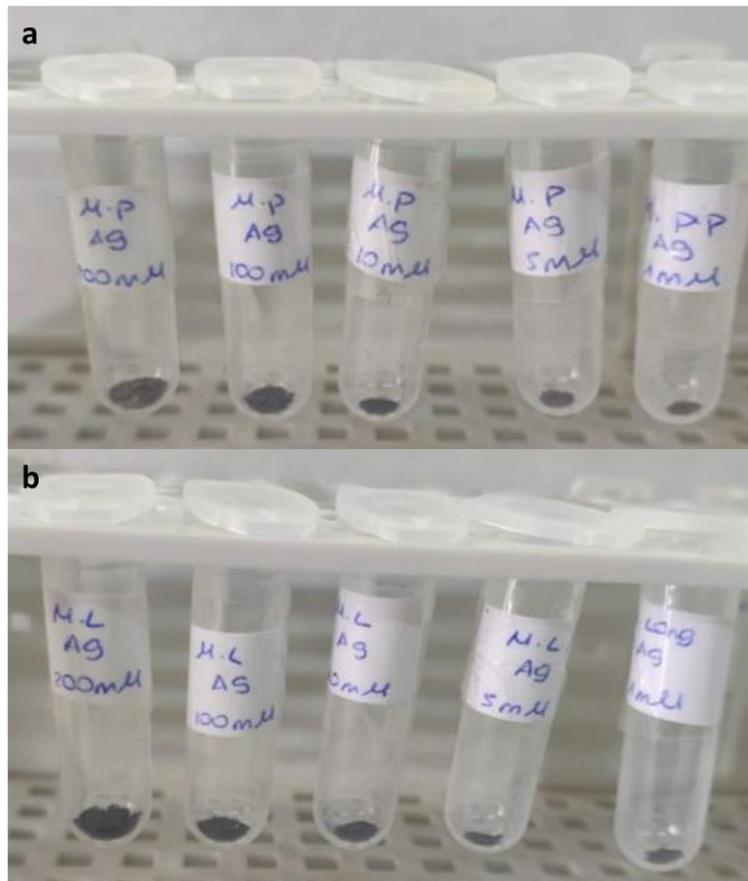


Figura 50. Nanopartículas de plata obtenidas por síntesis verde a partir de extracto acuoso de hoja de a) *Mentha piperita* L. y b) *Mentha longifolia* L. con nitrato de plata a diferentes concentraciones tras ser retiradas de los tubos de ensayo (de izquierda a derecha: 200, 100, 10, 5, 1 y 0 mM).

Este cambio de color ha sido descrito en otros trabajos (Akintelu *et al.*, 2020) como indicativo inicial de la síntesis de AgNPs. El cambio en el color de la mezcla de reacción se considera una respuesta de la interacción de las AgNPs con una longitud de onda lumínica (Ajitha *et al.*, 2019). Además de este aparente cambio, aparecían precipitados de un color oscuro que podían quedarse flotando o precipitar al fondo del tubo de ensayo. La diferencia a diferentes concentraciones es clara: cuanto mayor es la concentración de nitrato de plata, más rápido se volvía de color negro la disolución y más grande era el precipitado. A concentraciones más bajas, el cambio de color era más gradual y la cantidad de precipitado era menor.

Se ha descrito que, en función del tamaño y composición química de las AgNPs, el color que obtiene varía, lo que explica las diferencias de color en las disoluciones a diferentes concentraciones (Hussen y Siddiqi, 2014).

#### **4.2 Caracterización de las nanopartículas de plata sintetizadas con los extractos acuosos de *M. piperita* L. y *M. longifolia* L.**

Las nanopartículas de plata sintetizadas con los extractos acuosos de ambas especies, *M. piperita* L. y *M. longifolia* L. se han caracterizado mediante diferentes técnicas: espectroscopía UV-Vis, microscopio electrónico de transmisión (TEM), espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) y Difracción de rayos X (DRX). Además, a partir de los espectros UV-Vis, las imágenes de TEM y los difractogramas de DRX se han realizado estimaciones del tamaño medio de las nanopartículas de plata sintetizadas.

##### *4.2.1 Análisis espectroscópico UV-Vis.*

Con el objetivo de analizar el espectro UV-Vis obtenido con las nanopartículas de plata es preciso eliminar el posible ruido de fondo causado por la posible presencia de nitrato de plata que no haya reaccionado en su totalidad. Para ello se realizó, una caracterización de la disolución del nitrato de plata que será utilizado para generar las NPs mediante espectrometría UV-Vis. Como resultado se observaron máximos de absorbancia por debajo de la longitud de onda de 350 nm, con picos entre los 260 y los 310 nm (Figura 51a).

A continuación, se realizó un barrido en el espectrofotómetro en el rango de 300 a 500 nm de las soluciones de extracto vegetal a las que se les añadió una concentración 100 mM de nitrato de plata.

Los resultados obtenidos muestran unos máximos de absorbancia en torno a los 380 nm (Pico 5, Figura 51b) en el caso de la dilución con el extracto de *Mentha longifolia* L. y cerca de los 370 nm (Pico 6, Figura 51C) en el caso de la dilución con el extracto de *Mentha piperita* L. Estos máximos no aparecen cuando se hace la caracterización de los extractos vegetales acuosos y tampoco cuando se mide la absorbancia de las diluciones de nitrato de plata. Según la Teoría de Mie, las nanopartículas pequeñas absorben la luz a las menores longitudes de onda mientras que las de mayor tamaño lo hacen a longitudes de onda mayores (Sharma *et al.*, 2006). Al aumentar el tamaño de las nanopartículas se produce un notable desplazamiento hacia el rojo en la posición de la longitud de onda correspondiente a la máxima eficiencia de extinción. La meseta (pico 7) que aparece en la Figura 51b se puede atribuir a la agregación de las nanopartículas.

Los máximos de absorción obtenidos en este trabajo concuerdan con lo descrito en la bibliografía por Tehri *et al.*, (2020) y Akintelu *et al.*, (2020), donde se indica que la variación del máximo de absorbancia tiene que ver con la concentración y el tamaño de las NPs y donde se describen como máximos de absorbancia característicos de la excitación del plasmón superficial de las AgNPs valores de entre 400 y 460 nm. Por todo ello se puede concluir que se han sintetizado AgNPs mediante un proceso de síntesis verde a partir de los extractos de los dos tipos de mentas, y que hay diferencias entre las nanopartículas obtenidas de cada extracto en cuanto a tamaño y concentración, ya que presentan diferentes máximos de absorbancia.

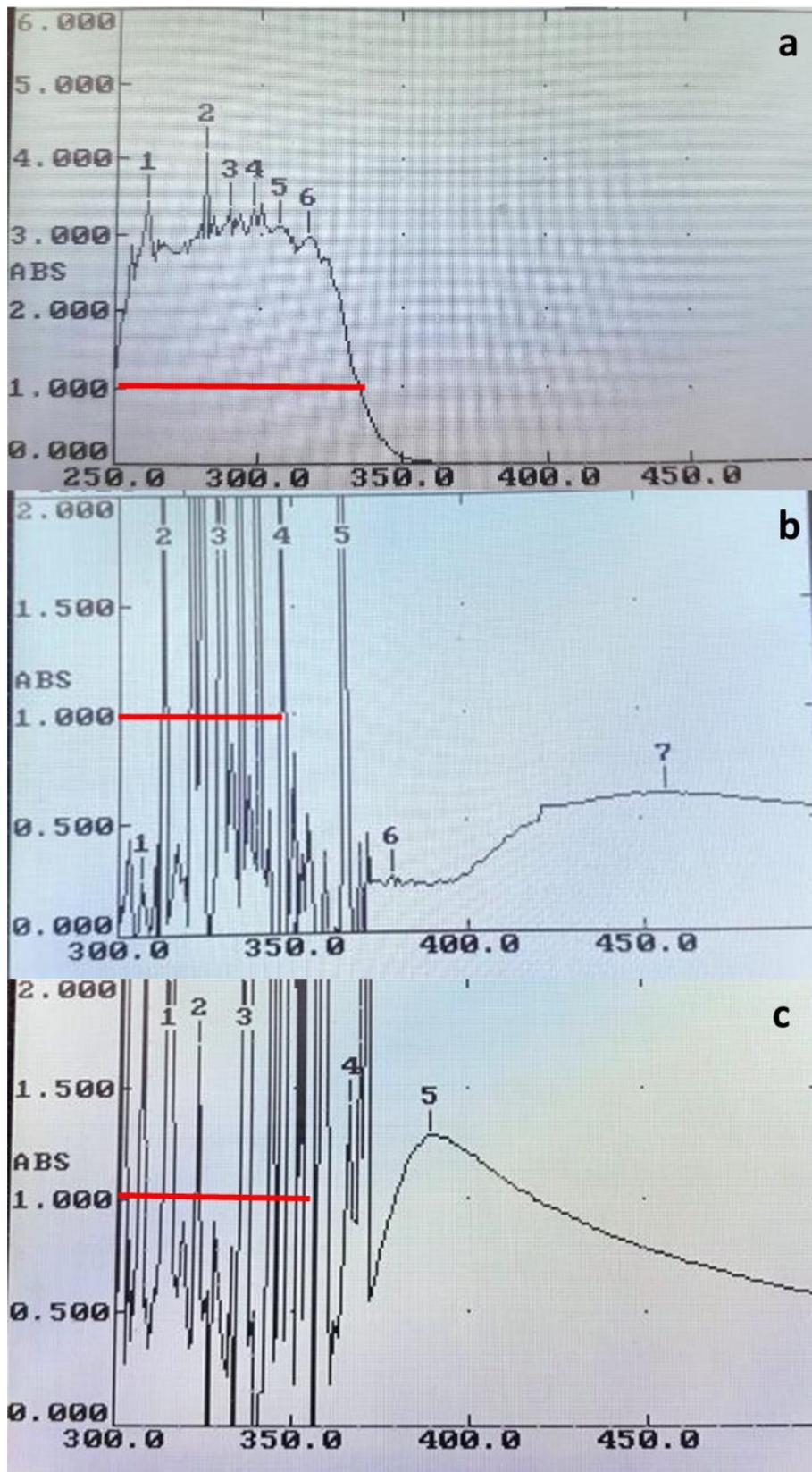


Figura 51. Espectro UV-Visible del nitrato de plata (a) y las nanopartículas de plata en suspensión formadas por la reacción del extracto acuoso de (b)

*Mentha piperita* L. y (c) *Mentha longifolia* L. con nitrato de plata a concentración 100 mM. La línea roja marca el rango de las señales atribuibles a la presencia de nitrato de plata en las muestras.

#### 4.2.3 Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Con el microscopio electrónico de transmisión (TEM) se ha analizado la morfología y el tamaño de las AgNPs obtenidas a partir de los extractos acuosos de las dos mentas. Los resultados obtenidos con esta técnica muestran que ha habido formación de AgNPs de de entre 4 y 18 nm en el caso de las obtenidas a partir de extracto de *Mentha piperita* L. (Figura 52A) y de entre 9 y 18 nm en el caso de las obtenidas a partir del extracto de *Mentha longifolia* L. (Figura 53A). Resultados similares fueron obtenidos por Javed *et al.* (2020a y 2020b) a partir de extracto de hoja de *Mentha longifolia* L., en su caso con NPs, visualizadas mediante SEM, observando nanopartículas de entre 10 y 100 nm de diámetro y 13-50 nm, respectivamente. Rauf *et al.* (2021), sintetizaron nanopartículas de plata de unos 13,5 nm de diámetro utilizando el extracto metanólico de *M. longifolia* L.

Tras la reacción con CN de las nanopartículas de plata (y 53C), sintetizadas con el extracto acuoso de *M. piperita* L. se visualizan estructuras espinosas tridimensionales como se puede apreciar en la figura 52C. En el caso de las AgNPs sintetizadas con el extracto de *M. longifolia* L. se puede observar en la figura 53C la presencia de estructuras con forma de hoja de helecho bien definidas y formadas por las nanopartículas agregadas. Este tipo de estructuras también han sido descritas por Liang *et al.*, (2017).

#### 4.2.4 Análisis FTIR (Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier).

Mediante el análisis FTIR se han observado dos gráficas muy similares (Figuras 52E y 53E) para las nanopartículas sintetizadas con *M. piperita* L. y *M. longifolia* L. En el espectro infrarrojo, la señal de estiramiento H-O-H aparece entre 3600 y 3100  $\text{cm}^{-1}$ , en cuyo caso también se observa la flexión entre 1640 y 1615  $\text{cm}^{-1}$ . En las nanopartículas de *M. piperita* L. estas señales se corresponden con las bandas 3393  $\text{cm}^{-1}$ , 3290  $\text{cm}^{-1}$  y 1642  $\text{cm}^{-1}$ , como se puede apreciar en la figura 52E. En el caso de *M. longifolia* L. estas señales se corresponden con las bandas 3412-3247  $\text{cm}^{-1}$  y 1640  $\text{cm}^{-1}$  como se puede apreciar en la figura 53E.

La señal a 2388  $\text{cm}^{-1}$  que se ha detectado en ambos tipos de nanopartículas puede estar asociada con la presencia de fuertes puentes de hidrógeno (Röska *et al.*, 2018). El pico a 2354  $\text{cm}^{-1}$ , en ambas muestras, se correspondería con la adsorción de  $\text{CO}_2$  sobre las nanopartículas (Bekhti *et al.*, 2021).

Los dos picos a 1773 y 1753  $\text{cm}^{-1}$  que aparecen en ambas muestras se corresponderían con la doble banda del carbonilo, estiramiento del carbonilo, característico de los anhídridos. Un pico intenso a 1286  $\text{cm}^{-1}$  que se visualiza en ambos tipos de nanopartículas se corresponde con el estiramiento C-O. A 1074  $\text{cm}^{-1}$  se muestra en ambas muestras el estiramiento asimétrico C-O. El estiramiento del enlace C-OH se detecta por la presencia del pico a 1043  $\text{cm}^{-1}$ . El pico a 801  $\text{cm}^{-1}$  se asoció a una flexión C-H (675-1000  $\text{cm}^{-1}$ ). La señal a 732  $\text{cm}^{-1}$  en ambas muestras se corresponde con el estiramiento C=C.

El pico a 2943  $\text{cm}^{-1}$ , que sólo se observa en las nanopartículas sintetizadas con *M. longifolia* L. se correspondería con el estiramiento de  $\text{CH}_2$  adsorbido (Öztürk y Bahçeli, 2006).

#### 4.2.5 Análisis DRX (Difracción de rayos X).

La mayoría de los nitratos metálicos se descomponen térmicamente en los respectivos óxidos, pero el óxido de plata se descompone a una temperatura más baja que el nitrato de plata, por lo que la descomposición del nitrato de plata produce plata elemental en su lugar. Sin embargo, según el análisis realizado mediante DRX, en ambas muestras de nanopartículas, no se han obtenido exclusivamente nanopartículas de plata elemental.

En el caso de las nanopartículas de plata sintetizadas con el extracto de *M. longifolia* L. mediante el análisis DRX (Figura 53F) además de la plata elemental, se ha detectado un exceso de nitrato de plata que no ha reaccionado y se ha observado también la presencia de óxido de nitrato de plata, nitrato amónico, nitrito de plata, nitrato hidrato hidracina de plata y amino nitrito de plata.

El difractograma, con picos de difracción en valores de  $2\theta$  de 38.16 y 64.53 podrían indexarse a los planos (111) y (220) de la estructura cúbica centrada en las caras (fcc), que es compatible con la fase Ag. Según la ecuación de Scherrer se calculó el tamaño medio de las partículas cristalinas de plata como de 42 nm.

En el caso de *M. piperita* L. (Figura 52F), se ha observado la presencia de nitrato de plata, amonio nitrato de plata y nitrito de plata. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría en el caso de *M. longifolia* L., se han detectado dos tipos de plata elemental y de óxido de plata.

El difractograma, con picos de difracción en valores de  $2\theta$  de 38.12 y 44.69 podrían indexarse a los planos (111) y (200) de la estructura cúbica centrada en las caras (fcc), que es compatible con la fase Ag. Según la ecuación de Scherrer se calculó el tamaño medio de las partículas cristalinas de plata de 27 nm.

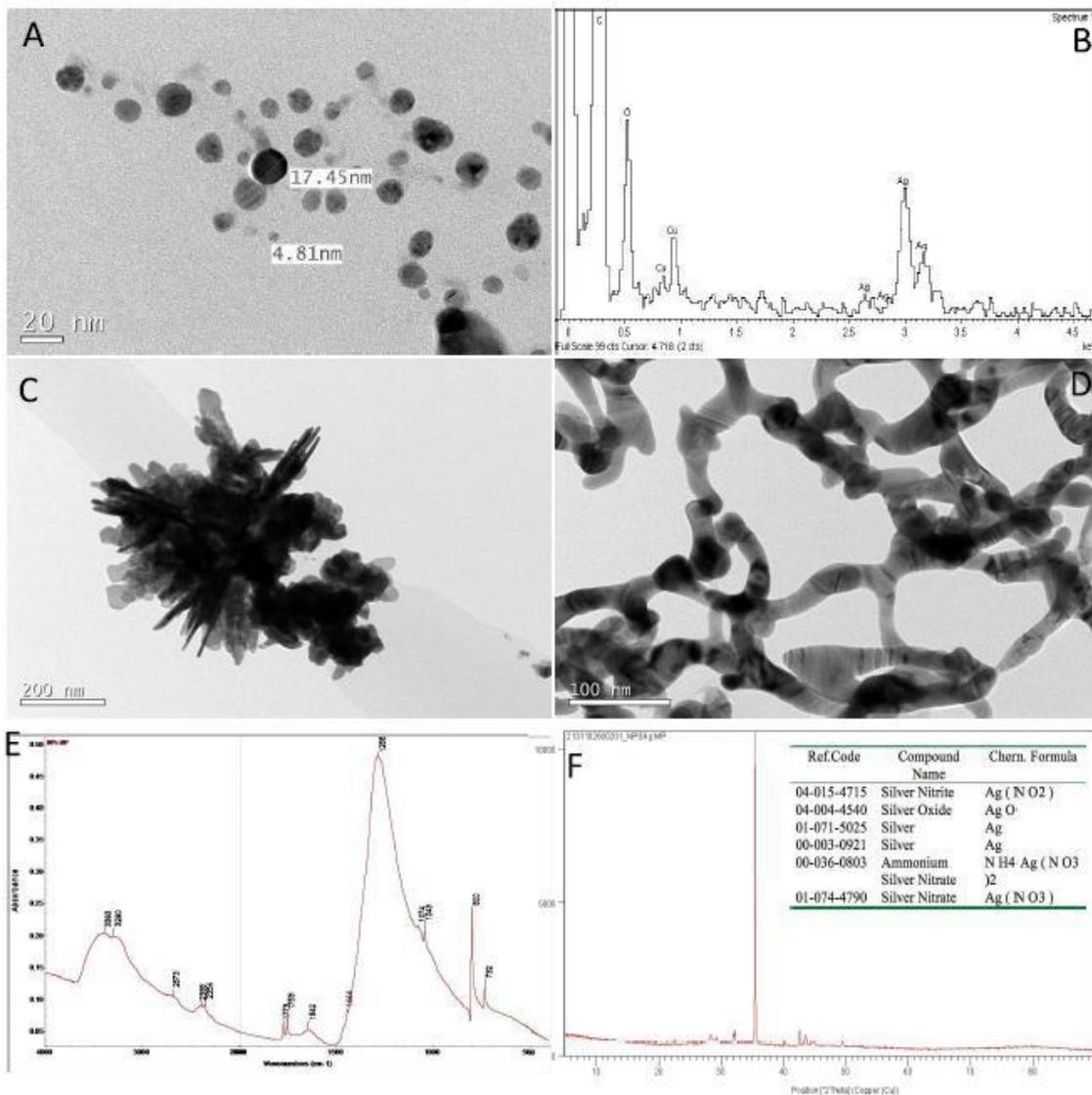


Figura 52. Análisis de nanopartículas de plata sintetizadas a partir del extracto acuoso de *Mentha piperita* L. A) Micrografía de TEM de nanopartículas de plata antes del tratamiento con cianuro. B) EDS (espectroscopia de rayos X de dispersión de energía) de las AgNPs. C) y D) micrografías de TEM de nanopartículas de plata después del tratamiento con cianuro. E) Perfil DRX de las AgNPs obtenidas por la reacción del extracto acuoso de *Mentha piperita* L. con  $\text{AgNO}_3$ .

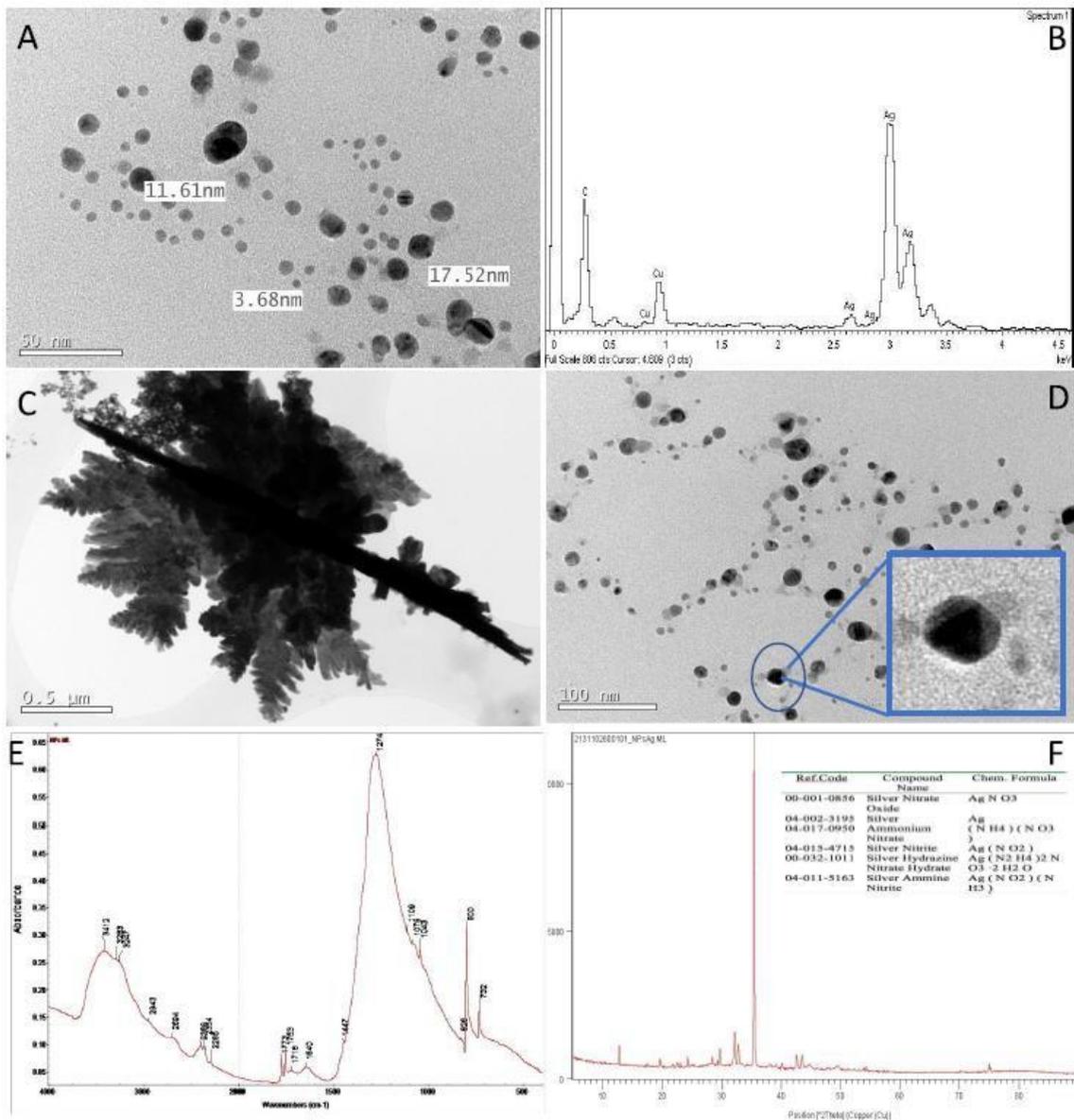


Figura 53. Análisis de nanopartículas de plata sintetizadas a partir del extracto acuoso de *Mentha longifolia* L. A) Micrografía de TEM de nanopartículas de plata antes del tratamiento con cianuro. B) EDS (espectroscopia de rayos X de dispersión de energía) de las AgNPs. C) y D) micrografías de TEM de nanopartículas de plata después del tratamiento con cianuro. E) Perfil DRX de las AgNPs obtenidas por la reacción del extracto acuoso de *Mentha longifolia* L. con  $\text{AgNO}_3$ .

#### 4.3 Estimación de la concentración de nanopartículas de plata sintetizadas con los extractos acuosos de *M. piperita* L. y *M. longifolia* L.

Las concentraciones de nanopartículas de plata se calcularon a partir de la ley de Beer-Lambert (Paramelle *et al.*, 2013). Para *M. piperita* L. se ha calculado una concentración 3.85 nM de partículas de un diámetro de 27 nm (calculado según el difractograma de DRX). Para *M. longifolia* L. se ha calculado una concentración 3.61 nM de partículas de un diámetro de 42 nm (calculado según el difractograma de DRX).

La concentración molar teórica, asumiendo la conversión total de iones de plata en nanopartículas de plata (Kalishwaralal *et al.*, 2010) se ha determinado en 1734 nM para las nanopartículas de diámetro de 27 nm sintetizadas con *M. piperita* L. y 451 nM para las nanopartículas de diámetro de 42 nm sintetizadas con *M. longifolia* L.

#### 4.4 Síntesis verde de nanopartículas de plata a partir de agentes reductores presentes en plantas.

Las diferencias en los agentes responsables de la biorreducción que desencadena la síntesis de nanopartículas dan como resultado la producción de nanopartículas con diferentes formas, tamaños y bioactividad. A la luz de estas consideraciones, se ha estudiado en detalle la síntesis de nanopartículas de plata por los principales antioxidantes no enzimáticos presentes en las plantas (Figura 45) con el fin de determinar su papel en el proceso de síntesis verde de nanopartículas de plata.

La adición de los diferentes antioxidantes vegetales a la solución acuosa de nitrato de plata resultó en un cambio en la coloración de la solución después de 5 h de reacción, lo que indica la formación de nanopartículas de plata (Figura 54).

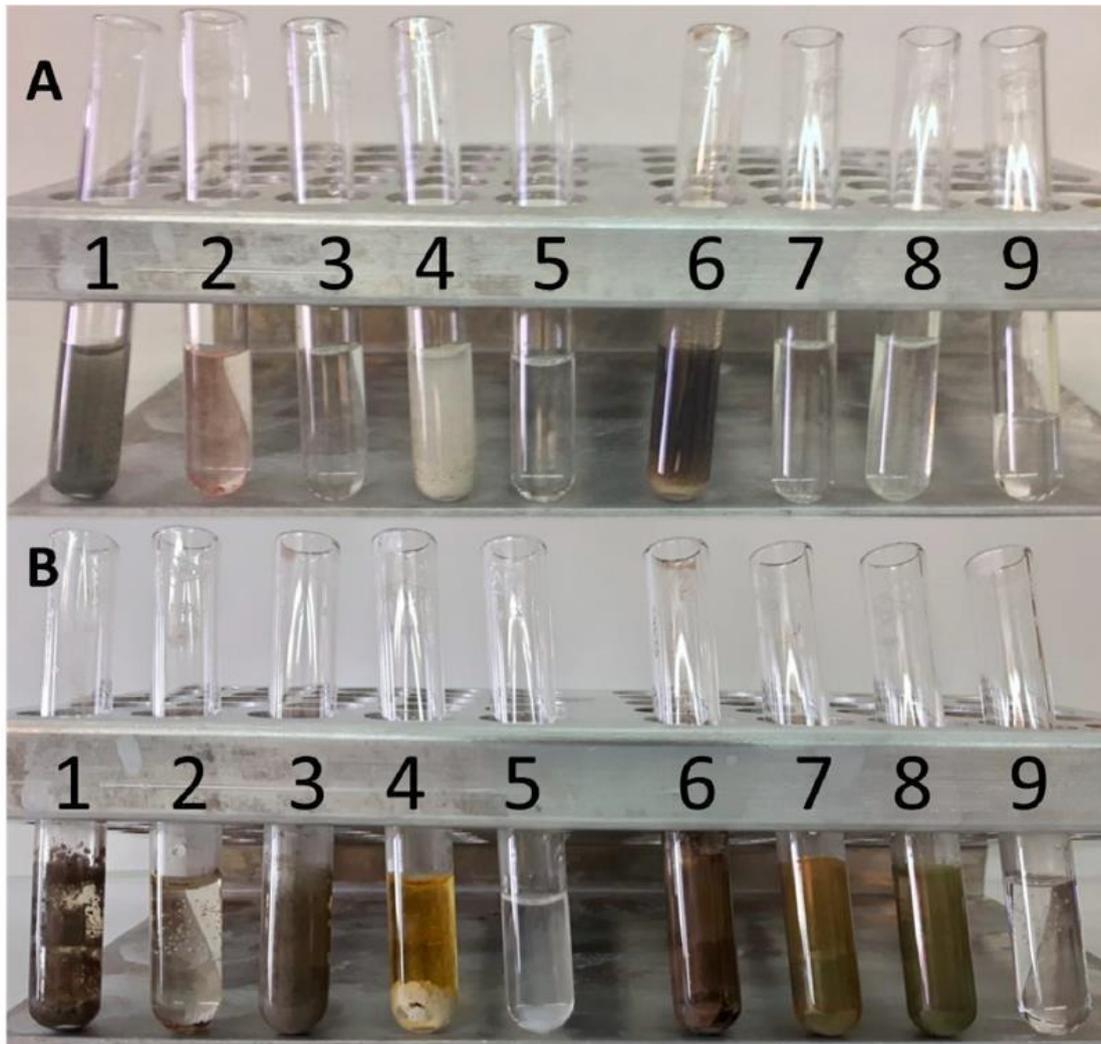


Figura 54. Cambio de color tras la adición de diferentes antioxidantes de origen vegetal a una solución de nitrato de plata 2 M. (A) Inicio (tiempo 0); (B) después de 5 h de incubación a 40 °C en la oscuridad. Los números identifican los diferentes antioxidantes utilizados: 1 = quercetina; 2 =  $\beta$ -caroteno; 3 = ácido gálico; 4 = ácido ascórbico; 5 = ácido hidroxibenzoico; 6 = ácido cafeico; 7 = catequina; 8 = escopoletina; y 9 = control (sin antioxidante añadido).

## 4.5 Caracterización de las nanopartículas de plata sintetizadas con los agentes reductores presentes en plantas.

Las nanopartículas se caracterizaron por absorción espectroscópica UV-Vis, análisis TEM, análisis FTIR, análisis DRX y reactividad de las nanopartículas de plata. Aunque se han detectado tanto nanopartículas de plata  $\text{Ag}^0$  como nanopartículas de óxido de plata, todas ellas serán mencionadas como AgNPs a partir de este punto.

### 4.5.1 Síntesis de nanopartículas de plata por quercetina.

La Quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi flavona) es un flavonoide muy abundante en plantas que contienen cinco grupos hidroxilo en las posiciones 3, 5, 7, 3', 4' y un grupo carbonilo en la posición cuatro (Figura 45). La quercetina tiene baja solubilidad en agua. Aunque se considera un compuesto hidrófobo, entre los flavonoides tiene uno de los coeficientes de partición octanol-agua más bajos ( $\log P = 1,82 \pm 0,32$ ; (Rothwell *et al.*, 2005) lo que implica que su partición en disolventes hidrófobos también es limitada. Este flavonoide tiene un papel importante en la eliminación de radicales libres y también tiene la capacidad de formar complejos fácilmente con muchos metales (Bukhari *et al.*, 2009). Debido a esta última característica, la quercetina presenta una fuerte interacción con las nanopartículas metálicas. Además, la quercetina reduce los iones de plata en soluciones acuosas de sales de plata (como en este caso el nitrato de plata), probablemente mediante la formación de un complejo intermedio donde la densidad de electrones se desplaza hacia el ión de plata (Egorova y Revina, 2000).

El cambio de coloración de la solución de nitrato de plata causado por la quercetina a un color grisáceo (Figura 55(A-1, B-1)) es característico de las nanopartículas de plata sintetizadas. La quercetina reaccionó inmediatamente

con la solución de nitrato de plata (Figura 55(A-1)) para producir un precipitado grisáceo característico de las nanopartículas de plata que se adhirieron a las paredes del recipiente.

El estudio del espectro UV-visible (Figura 55I) no mostró una banda de plasmón superficial (SPB) característica de la excitación del plasmón superficial de las nanopartículas metálicas. Sin embargo, esta diferencia puede deberse al método de síntesis, la quercetina sintetiza nanopartículas de plata (Tasca y Antiochia, 2020) y nanopartículas de plata en micelas inversas (Bukhari *et al.*, 2009) en presencia de NaOH y mediante la inyección de una solución salina acuosa en octano o heptano. El espectro obtenido fue claramente diferente de los espectros conocidos de nanopartículas de plata y se debió a la formación de grandes agregados de quercetina (Petit *et al.*, 1993). La molécula de quercetina sufre modificaciones químicas a pH neutro, implicando la dimerización u oligomerización del flavonoide en la superficie de los AgNPs con un papel importante de los anillos A y C mientras que, a pH alcalino, el anillo B es responsable de un cambio en este protocolo de dimerización (Jurasekova *et al.*, 2014).

Sin embargo, el análisis por microscopía electrónica (TEM) permitió la observación de estructuras micelares compuestas por nanopartículas de varios tamaños (Figura 55 A-C). Estas estructuras son características de elementos de carácter anfipático en los que el extremo polar está en contacto con la solución acuosa mientras que el extremo hidrófobo se sitúa hacia el interior de la micela. La quercetina hidrófoba se limitaría a las vesículas formadas entre las nanopartículas, mientras que las nanopartículas más pequeñas se encuentran en la capa más externa de estas estructuras. Como las nanopartículas se formaron por la reducción provocada por la quercetina, esta a su vez se transformó en los productos de su oxidación (principalmente ácidos 3,4-dihidroxibenzoico y 2,4,6-trihidroxibenzoico (Zenkevich *et al.*, 2007).

Estos dos ácidos tienen una mayor naturaleza hidrófila que la quercetina, determinando así la ubicación de las estructuras de estas nanopartículas más pequeñas y reactivas en la superficie.

La asociación de quercetina con nanopartículas de plata fue confirmada por FTIR. La Figura 55G muestra el espectro FTIR de las nanopartículas de plata, mientras que la Figura 55H muestra el espectro de quercetina. En el espectro FTIR de nanopartículas de plata sintetizadas con quercetina, destacan cuatro bandas en 3281, 1753, 1274 y 800  $\text{cm}^{-1}$ . La banda a 3281  $\text{cm}^{-1}$  indicó la presencia del estiramiento O–H. En el espectro de la quercetina, también se observó una amplia banda de absorción entre 3288 y 3374  $\text{cm}^{-1}$ , que también correspondió al estiramiento O–H. La banda débil a 1753  $\text{cm}^{-1}$  correspondió al grupo C=O anhídrido. La banda en el espectro de quercetina a 1158  $\text{cm}^{-1}$  correspondió al estiramiento C–OH. Este grupo funcional se modificó en las nanopartículas de plata sintetizadas y correspondía a una banda muy intensa en el espectro FTIR de las nanopartículas de plata a 1274  $\text{cm}^{-1}$  (Estiramiento C–O; 1210-1320  $\text{cm}^{-1}$ ). La banda a 800  $\text{cm}^{-1}$  correspondía a una flexión C–H (675-1000  $\text{cm}^{-1}$ ) que correspondía al estiramiento C–H a 3075  $\text{cm}^{-1}$ . Estas bandas representan las vibraciones de la flexión C–H en el anillo aromático. Además, una banda ancha en el rango de 500 a 600  $\text{cm}^{-1}$  podría atribuirse a la vibración Ag – O (Shume *et al.*, 2020).

El análisis DRX confirmó la síntesis de varios compuestos de nanopartículas de plata en diferentes estados de oxidación: óxido de plata (I, III) ( $\text{AgO}$ ), óxido de plata ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ) y plata metalizada (Figura 55J). El patrón con líneas de difracción a valores  $2\theta$  de 38,15°, 44,33°, 64,52° y 77,52° podría indexarse a los planos (111), (200), (220) y (311). El análisis DRX confirmó la estructura cúbica centrada en las caras (fcc). Según la ecuación de Scherrer, el tamaño medio de cristalito de las partículas cristalinas de plata metálica era igual a 106 nm.

La reactividad de las nanopartículas analizadas por su oxidación en presencia de cianuro mostró una disminución en la intensidad de la banda de absorción de resonancia de plasmón superficial de las AgNP sintetizadas con quercetina (Figura 55I). Las nanopartículas resultantes observadas a través de TEM (Figura 55D–F) mostró cómo se alteró la morfología de las estructuras. La aparición de estructuras en forma de varillas fue visible. La transformación de nanopartículas de plata en función de las condiciones ambientales es un fenómeno común (Kedziora *et al.*, 2018). Por lo tanto, la transformación química de las nanopartículas de plata en AgCN causaría estos cambios en el tamaño y la forma de las nanopartículas y, por lo tanto, cambiaría de una formación esférica similar a una micela a una varilla (Lee *et al.*, 2017).

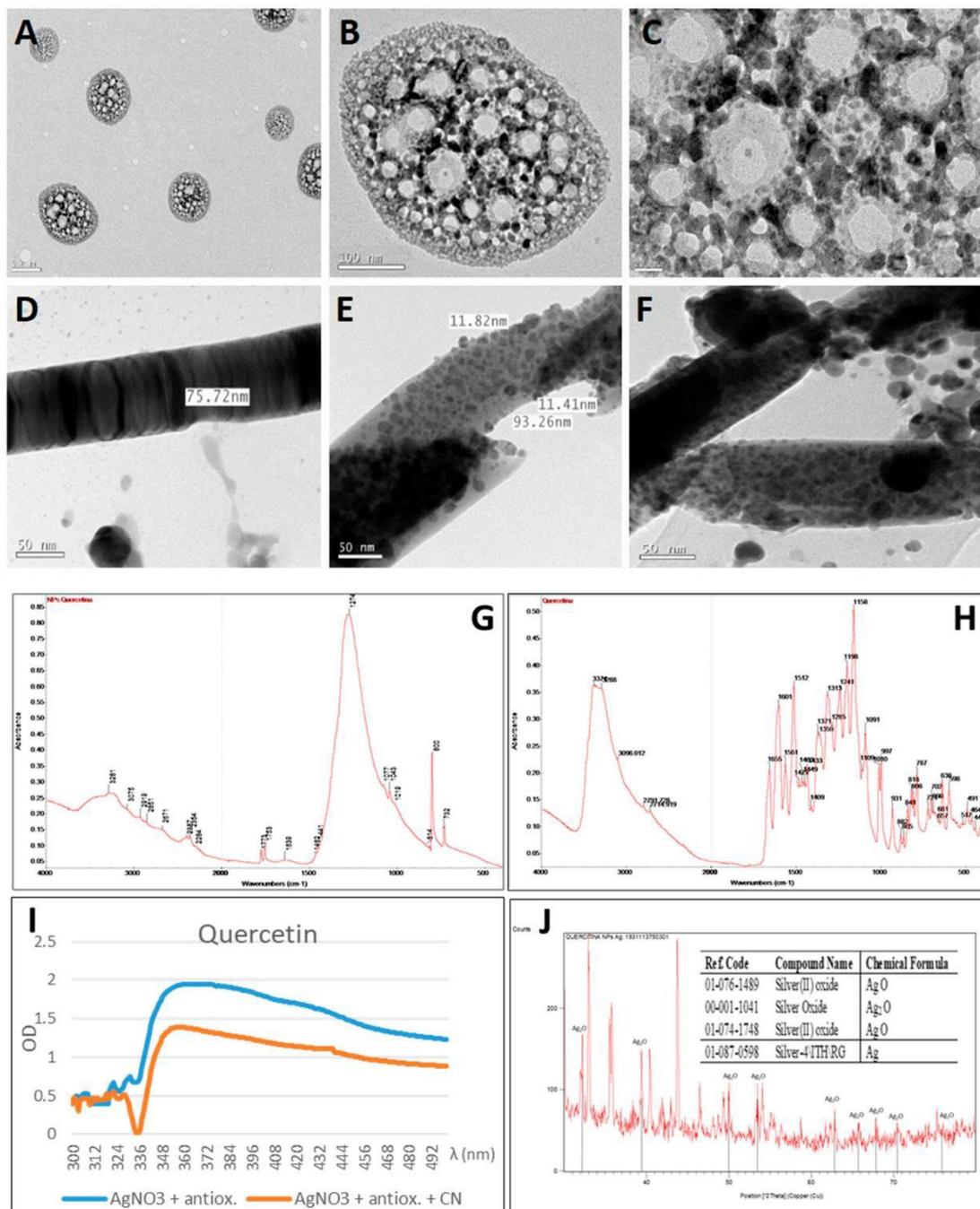


Figura 55. Análisis de nanopartículas de plata sintetizadas por quercetina (AgNP). (A-C) imágenes de AgNP obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM). (A) Estructuras parecidas a micelas. (B) Detalle de estructura micelar. (C) Detalle de vesículas ubicadas entre las nanopartículas de plata. (D-F) Imágenes TEM de AgNP después de la adición de cianuro. (D) estructura en forma de varilla. (E) Detalle de filamento que muestra la agregación de las nanopartículas. (F) Detalle de estructuras en forma de

varillas con su tamaño diámetro y comparación con el tamaño de las nanopartículas. (G) Espectro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) de nanopartículas derivadas de quercetina. (H) Espectro FTIR de quercetina. (I) Espectros de AgNP visibles en ultravioleta (UV) preparados con quercetina y AgNO<sub>3</sub> antes (línea azul) y después (línea naranja) de la adición de cianuro. (J) Perfil de difracción de rayos X (DRX) de AgNPs obtenido por reacción de quercetina con AgNO<sub>3</sub> (se ha insertado una tabla de identificación). Los picos que identifican la presencia de óxidos de plata se han indicado en el difractograma DRX.

#### 4.5.2 Síntesis de nanopartículas de plata por $\beta$ -caroteno.

El  $\beta$ -caroteno es el carotenoide más común, precursor de la vitamina A, este pigmento naranja se encuentra principalmente en frutas y verduras. Perteneció al grupo de los terpenos, en realidad es un tetraterpeno de fórmula C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>. Entre los carotenos, el  $\beta$ -caroteno se distingue por tener anillos beta en ambos extremos de la molécula. Se considera una molécula lipofílica, casi sin solubilidad en agua (0,0006 g L<sup>-1</sup> a los 25 °C). El  $\beta$ -caroteno puede actuar como un antioxidante eficaz (Burton *et al.*, 1984). La molécula de  $\beta$ -caroteno tiene la capacidad de ensamblar y alinear 10 átomos de metal en complejos de manera reversible (Horiuchi *et al.*, 2015). Estas características parecen apoyar el papel de esta molécula en la síntesis de nanopartículas metálicas a través de la síntesis verde. Sin embargo, hasta donde se conoce, no existen datos sobre la utilidad del  $\beta$ -caroteno en la síntesis de nanopartículas, aunque debería participar en la síntesis verde con extractos vegetales muy ricos en este compuesto (Umadevi *et al.*, 2012).

El color de la solución de nitrato de plata después de agregar el  $\beta$ -caroteno fue inicialmente naranja (Figura 56(A-2)), sin embargo, esta coloración desapareció y la solución permaneció transparente después de cinco horas de

reacción a 40 °C (Figura 56(B-2)). Al mismo tiempo, apareció un ligero precipitado en el fondo del recipiente. Cuando se analizó el espectro UV-visible (Figura 56G), aparecieron varios SPB (346 nm, 361 nm; 368 nm y 382 nm) que podrían atribuirse a bandas de resonancia de plasmones superficiales transversales y longitudinales de las nanopartículas de plata anisotrópicas, triangulares y poliédricas que se están formando (Rycenga *et al.*, 2011; Loiseau *et al.*, 2019). Se observaron nanopartículas triangulares y poliédricas (ambas con las esquinas truncadas) (Figura 56A–C), además, nanopartículas esféricas de menos de 10 nm de diámetro y se puede observar una pequeña partícula triangular con las esquinas truncadas de ese tamaño (Figura 56C, marcado con una flecha negra). Esta pequeña partícula triangular podría generarse a partir de la oxidación selectiva en diferentes zonas de la superficie de las nanopartículas esféricas (grabado oxidativo de forma oxidativa) (Tsuji *et al.*, 2012). Para las partículas monocristalinas, donde todo el volumen está compuesto por un solo dominio cristalino, la forma de equilibrio termodinámico es un octaedro truncado (Figura 56C; flecha blanca) determinada por los planos / facetas 100 y 111. Las formas no poliédricas (triangular en este caso, flecha hueca) podrían estar compuestas principalmente por estructuras anisotrópicas (Tao *et al.*, 2008). El tamaño medio de las partículas triangulares de esquinas truncadas fue de  $60 \pm 5$  nm (Figura 56A, B). La formación de nanoplacas es común en la síntesis de nanopartículas de plata y oro (Zhang *et al.*, 2011). Se proponen dos hipótesis para explicar la formación de estas estructuras altamente anisotrópicas. La primera es la "teoría del bloqueo de caras", en la que un elemento se adhiere selectivamente a una faceta cristalina particular del nanocrystal en crecimiento y, por lo tanto, ralentiza la tasa de crecimiento de esa faceta en relación con las demás (Pastoriza-Santos y Liz-Marzán, 2008; Millstone *et al.*, 2009). La segunda teoría explica que el crecimiento anisotrópico preferencial depende de la simetría cristalina de los núcleos iniciales (Zhang *et al.*, 2011; Zhang *et*

*al.*, 2010).

La asociación de  $\beta$ -caroteno con nanopartículas de plata fue confirmada por FTIR. La Figura 56E muestra el espectro FTIR de las nanopartículas de plata sintetizadas con  $\beta$ -caroteno, mientras que la Figura 56F muestra el espectro de  $\beta$ -caroteno. En el espectro FTIR de las nanopartículas de plata sintetizadas con  $\beta$ -caroteno, se destacan cinco grupos de bandas en 3457, 2972-2940-2870, 1773-1753-1715, 1294 y 801-732  $\text{cm}^{-1}$ . La banda a 3457  $\text{cm}^{-1}$  indicó la presencia de estiramiento O–H (alcohol). Una banda de absorción a 3430  $\text{cm}^{-1}$  se observó en el  $\beta$ -caroteno, que también correspondió a este estiramiento O–H. El grupo de bandas 2972-2940-2870  $\text{cm}^{-1}$  identificaron el estiramiento de C–H en el espectro del  $\beta$ -caroteno. El grupo de bandas 1773-1753-1715  $\text{cm}^{-1}$  representa el estiramiento C=O y corresponde a una banda fuerte a 1710  $\text{cm}^{-1}$  en el espectro del  $\beta$ -caroteno. La banda más intensa en el espectro de las nanopartículas de plata sintetizadas con  $\beta$ -caroteno fue de 1294  $\text{cm}^{-1}$  y reveló el estiramiento C–O. La banda a 800  $\text{cm}^{-1}$  referido a una flexión C–H (675-1000  $\text{cm}^{-1}$ ) que correspondía al estiramiento C–H a 2972-2940-2870  $\text{cm}^{-1}$ . Estas bandas representan las vibraciones del enlace C–H en el anillo aromático. También una banda ancha entre 500 y 600  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al enlace metal-oxígeno.

El patrón DRX (Figura 56H) indica que coexisten nanopartículas cristalinas y amorfas (Bhatt *et al.*, 2015). En el análisis DRX, se identificaron nanopartículas de diferentes estados de oxidación,  $\text{Ag}_2\text{O}_3$  y  $\text{Ag}_3\text{O}_4$ . Ambos  $\text{Ag}_3\text{O}_4$  y  $\text{Ag}_2\text{O}_3$  también se pueden preparar mediante oxidación anódica de soluciones de sal de plata a un potencial más bajo (Standke y Jansen, 1986). El presente resultado es muy relevante, porque la producción industrial de  $\text{Ag}_2\text{O}_3$  para dispositivos médicos y para pilas alcalinas con mezcla de zinc es difícil (Korkmaz y Karadag, 2021). El  $\text{Ag}_3\text{O}_4$  es más estable que el  $\text{Ag}_2\text{O}_3$

(Hammad *et al.*, 2016). El  $\text{Ag}_2\text{O}_3$  presentó una estructura cúbica (Materials Project ID: mp-11872) que correspondía a una coordinación octaédrica de plata en línea con la observada por TEM (Figura 56 C.A). La forma de  $\text{Ag}_3\text{O}_4$  era piramidal (Materials Project ID: mp-1605; Wexler *et al.*, 2019), como se observa en la Figura 4D (Michaelides *et al.*, 2005).

Estas nanopartículas reaccionaron con cianuro (Figura 56G) y se observó un cambio hacia longitudes de onda más cortas. Las partículas resultantes de estas condiciones oxidantes no tenían formas definidas y eran más pequeñas (Figura 56D). La forma de las nanopartículas es determinante en su reactividad (Zhang *et al.*, 2016). Sin embargo, además, los óxidos identificados ( $\text{Ag}_2\text{O}_3$  y  $\text{Ag}_3\text{O}_4$ ) eran más activos catalíticamente, posiblemente más que el metal puro como es conocido tradicionalmente (Michaelides *et al.*, 2005). Esta alta reactividad estaría relacionada con la utilidad de las nanopartículas de plata triangulares (especialmente aquellas con esquinas truncadas) como biosensores (Tsuji *et al.*, 2012).

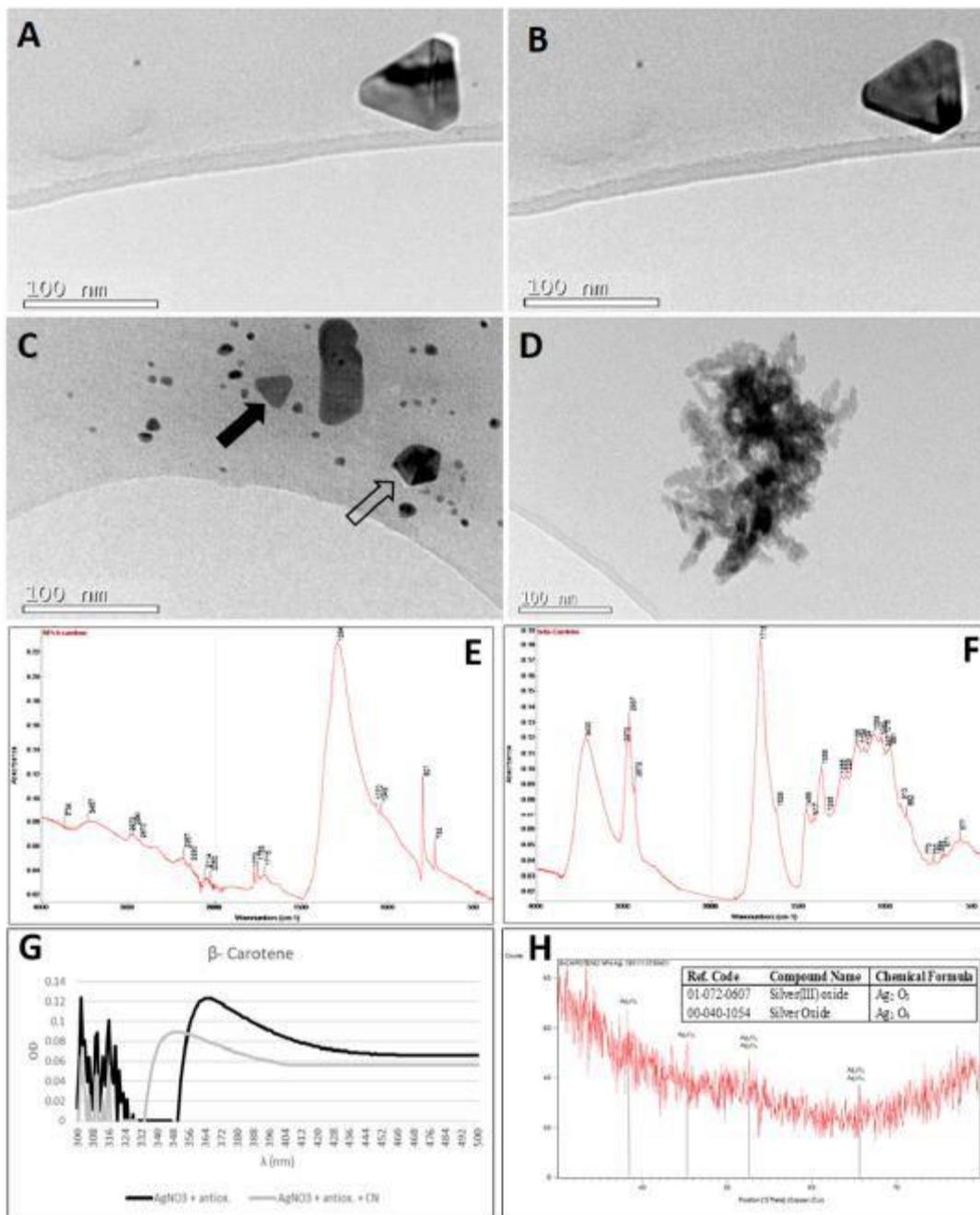


Figura 56. Análisis de las nanopartículas de plata sintetizadas con  $\beta$ - caroteno. (A-D) imágenes de AgNP obtenidas por TEM. (A, B) Nanopartícula triangular bajo dos ángulos de iluminación, que permite observar su volumen. (C) Formas poliédricas (indicadas por la flecha hueca) y formas triangulares con vértices truncados (indicadas por la flecha negra). (D) AgNP poliédricos amorfos después del tratamiento con cianuro. (E) Espectro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) de nanopartículas derivadas de  $\beta$ -caroteno.

(F) Espectro FTIR de  $\beta$ -caroteno. (G) Espectros de AgNP visibles en ultravioleta (UV) preparados con  $\beta$ -caroteno y  $\text{AgNO}_3$  antes (línea negra) y después (línea gris) de la adición de cianuro. (H) Perfiles de difracción de rayos X (DRX) de las AgNP obtenidas por la reacción de  $\beta$ - caroteno con  $\text{AgNO}_3$ ; en el recuadro, la tabla con las identificaciones. Los picos que identifican la presencia de óxidos de plata se han indicado en el difractograma DRX.

#### 4.5.3 Síntesis de nanopartículas de plata por ácido gálico.

El ácido gálico (galato; ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico; 3,4,5-trihidroxibenzoato; ácido pirogalol-5-carboxílico) es un polifenol vegetal, un tanino hidrolizable, que es un potente antioxidante que contiene tres grupos hidroxilo y un grupo ácido. El ácido gálico es especialmente reactivo entre los compuestos fenólicos probablemente debido a los tres grupos carboxilo (Della Pelle *et al.*, 2018). Este ácido orgánico es un quelante natural con una alta afinidad por los compuestos metálicos (Nascimento *et al.*, 2006). Debido a su afinidad por los metales y su alta reactividad, el ácido gálico se ha utilizado en la síntesis de nanopartículas de plata (ver, por ejemplo, la revisión de Amini (2019). El ácido gálico-AgNP podría ser un candidato potencial para su uso en aplicaciones biológicas y farmacéuticas, por ejemplo, para combatir infecciones por microorganismos (Li *et al.*, 2015; Riaz *et al.*, 2021).

La reacción del ácido gálico con el nitrato de plata produjo un color gris característico (Figura 57(A-3)). La reacción no fue inmediata, pero tardó menos de una hora (Figura 57(B-3)). Fue una reacción intensa que brindó valores de densidad óptica altos (superiores a 2) incluso con concentraciones bajas de nitrato de plata (Figura 57D). El SPB produjo un pico en la longitud de onda de 440 nm que correspondía a un tamaño de partícula de 70 nm. La

concentración de nanopartículas de plata de este tamaño fue de 30 nM (según la ley de Beer-Lambert) en comparación con una concentración molar teórica de 100 nM que se habría obtenido si se hubiera producido la conversión total de iones de plata en nanopartículas de plata (Tabla 13).

Tabla 13. Concentración (nM) de nanopartículas de diferentes tamaños (20, 50, 70 y 80 nm), sintetizadas por diversos antioxidantes (ácido gálico, ácido ascórbico, ácido hidroxibenzoico, ácido cafeico, catequina y escopoletina). Las concentraciones se calcularon a partir de la Ley de Beer-Lambert (según Paramelle *et al.* 2014). Teórico: concentración molar teórica, asumiendo la conversión total de iones de plata en nanopartículas de plata (según Kalishwaralal *et al.* 2010).

Antioxidante	Concentración (nM)			
	20 nm	50 nm	70 nm	80 nm
Ácido gálico	-	-	30	-
Ácido ascórbico	73,6	11,4	-	4,6
Ácido hidroxibenzoico	-	1,9	-	0,6
Ácido cafeico	-	13,5	-	3,2
Catequina	27,3	2,9	-	1,1
Escopoletina	-	-	11,1	-
Teórico	4000	260	100	53

El ácido gálico redujo el nitrato de plata a nanopartículas de plata rápidamente a temperatura ambiente, pero se formaron agregados ya que no actuó como un buen agente estabilizador (Martínez-Castañón *et al.*, 2008). La formación de estos agregados produjo la coloración gris observada en la síntesis de nanopartículas de plata con ácido gálico.

La presencia de agregados constituidos por nanopartículas de forma irregular con un tamaño cercano a los 20 nm y nanopartículas esféricas más pequeñas se observó con la microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (Figura 57A). El tamaño de las nanopartículas de plata esféricas sintetizadas

con ácido gálico en síntesis química suele ser pequeño (10-15 nm (Kim *et al.*, 2015; Popescu *et al.*, 2019)).

Las nanopartículas de plata sintetizadas se recubrieron con ácido gálico según los espectros FTIR (Figura 57E, F). Se observó un pico ancho a 3412–3271  $\text{cm}^{-1}$  identificar el estiramiento C – H correspondiente con el pico a 3272  $\text{cm}^{-1}$  para el ácido gálico. El estiramiento C = O correspondió a los 1773-1753-1634  $\text{cm}^{-1}$  banda. Un pico intenso a 1293  $\text{cm}^{-1}$  indicó un estiramiento C – O que se corresponde con el pico a 1309  $\text{cm}^{-1}$  para el ácido gálico. Los 800  $\text{cm}^{-1}$  banda identificó una flexión C – H (675-1000  $\text{cm}^{-1}$ ) que corresponde al estiramiento C – H del ácido carboxílico en los picos de 2917–2850–2676  $\text{cm}^{-1}$ . Entre 500 y 600  $\text{cm}^{-1}$  una banda ancha indica la presencia de óxidos de plata. La reducción de los iones de plata fue el resultado de la reacción de oxidación de los grupos fenólicos del ácido gálico, y el compuesto quinoide producido fue adsorbido a la superficie de las nanopartículas de plata, ayudando a estabilizarlas (Park *et al.*, 2016). Los espectros FTIR mostraron que los grupos funcionales de ácido carboxílico del ácido gálico contribuyeron al enlace electrostático en la superficie de las nanopartículas (Lok *et al.*, 2007).

En el análisis DRX (Figura 57G), se muestra la presencia de plata en diferentes estados de oxidación: óxido de plata (I, III) (AgO), óxido de plata (Ag<sub>2</sub>O) y plata. El patrón con puntos de difracción en valores  $2\theta$  de 38.15°, 44,33°, 64,52° y 77,52°, que puede indexarse a los planos (111), (200), (220) y (311) de la estructura cúbica centrada en las caras (fcc), es compatible con la fase cúbica de Ag. Los tamaños medios de las partículas cristalinas de plata fueron 19 nm para el código de referencia 00-003-0921 y 31 nm para el código de referencia 01-087-0598, calculado mediante la ecuación de Scherrer.

Los valores de densidad óptica del espectro de absorción UV-visible aumentaron después de la adición de cianuro (Figura 57H). Estos cambios en el espectro de absorción podrían atribuirse a la oxidación parcial de las nanopartículas de plata, con adsorción química de  $\text{Ag}^+$  en la superficie de la partícula (Nair y Laurencin, 2007). La  $\text{Ag}^+$  presenta propiedades bactericidas, estas nanopartículas son buenas candidatas para una alta actividad antimicrobiana (Lok *et al.*, 2007). Esta característica de  $\text{Ag}^+$  iones se debe a su alta reactividad a los componentes celulares provocada por interacciones con grupos funcionales como tiol, carboxilato, fosfato, hidroxilo, imidazol, indol o amina (Prabhu y Poulouse, 2012). La presencia de óxido en la superficie de estas AgNP asegura una alta actividad antibacteriana, probablemente debido a la mayor concentración de ROS que generan (Cholula-Díaz *et al.*, 2018).

La morfología de las nanopartículas resultantes cambió a estructuras en forma de varillas de gran longitud (más de 800 nm), según lo observado por TEM (Figura 57 A-C). La transformación de nanopartículas de plata en función de las condiciones ambientales es un fenómeno común (Kedziora *et al.*, 2018). Nuevamente, se pueden observar cambios en el tamaño y la forma de las nanopartículas de forma esférica a en forma de varilla como resultado de la transformación química de las nanopartículas de plata en AgCN (Lee *et al.*, 2017).

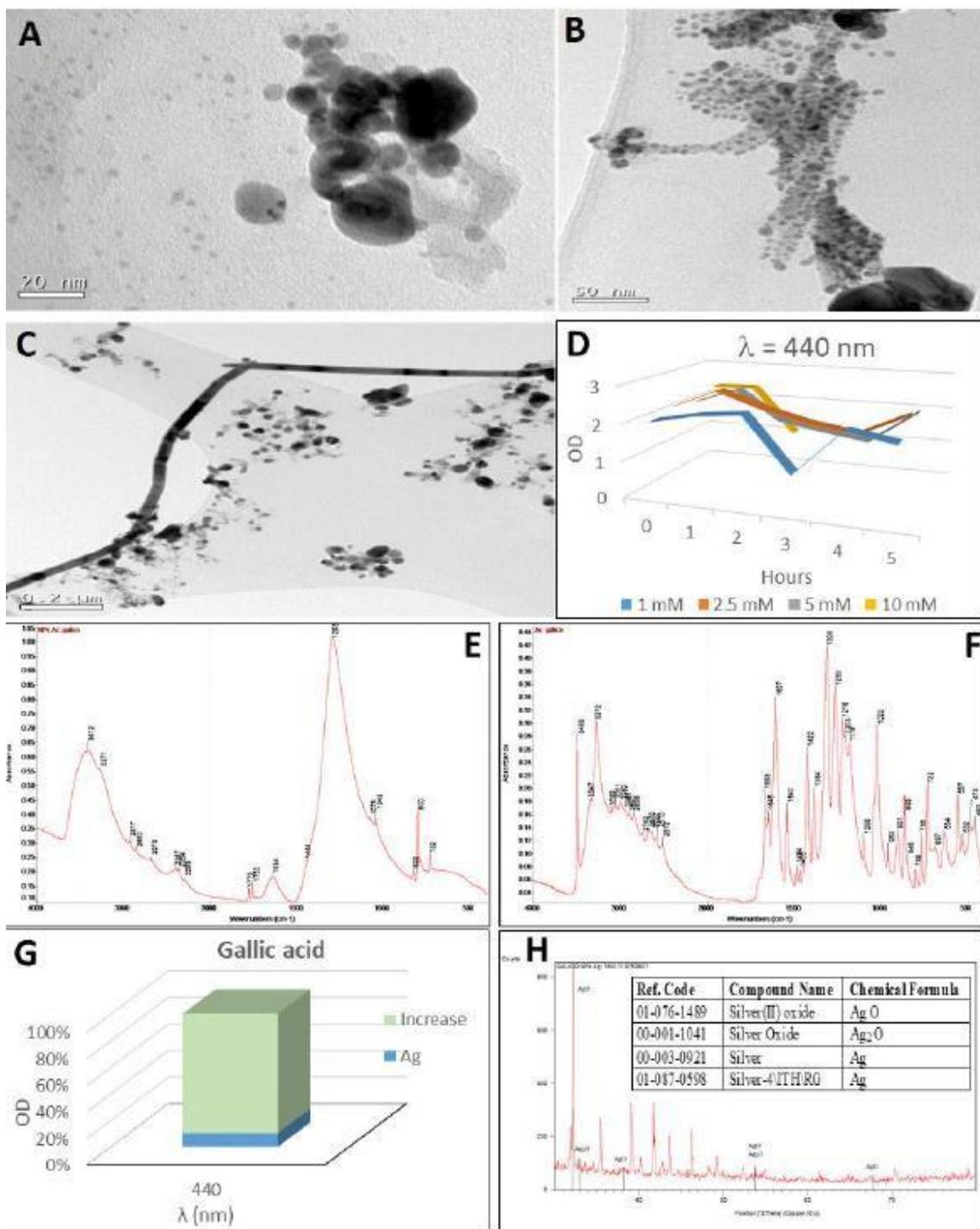
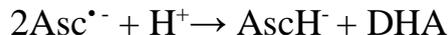


Figura 57. Análisis de nanopartículas de plata sintetizadas con ácido gálico. (A) Imagen TEM de AgNP. (B, C) Imágenes TEM de AgNP después del tratamiento con cianuro. (B) Agregación de nanopartículas antes de la Figura C. (D) Síntesis de nanopartículas de plata por reacción de diferentes  $\text{AgNO}_3$  concentraciones con ácido gálico durante 5 h (en intervalos de una hora). (E, F) Espectros FTIR de nanopartículas derivadas del ácido gálico (E) y

ácido gálico (F). (G) Aumento relativo de DO después de la adición de cianuro a nanopartículas de plata. (H) Difractograma DRX de los AgNPs obtenidos por reacción del ácido gálico con AgNO<sub>3</sub>; en el recuadro, la tabla con las identificaciones. Los picos que identifican la presencia de óxidos de plata se han indicado en el difractograma DRX.

#### 4.5.4 Síntesis de nanopartículas de plata por ácido ascórbico

La Vitamina C (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>) en sus diferentes formas (ascorbato, ácido ascórbico, L-ascorbato, L-ácido ascórbico) es una cetolactona con dos grupos hidroxilo ionizables. El monoanión de ascorbato (AscH<sup>-</sup>) es la forma predominante a pH fisiológico. AscH<sup>-</sup> puede sufrir dos oxidaciones consecutivas de un electrón dando como resultado la formación de ascorbato (Asc<sup>•-</sup>) y radicales de ácido deshidroascórbico (DHA). El radical ascorbato es muy reactivo y pasa rápidamente a ascorbato y ácido deshidroascórbico:



El ascorbato sufre una autooxidación dependiente del pH produciendo peróxido de hidrógeno. La presencia de metales catalíticos acelera esta oxidación.

La síntesis de nanopartículas de plata con ácido ascórbico es un sistema tan eficaz que, en condiciones óptimas, puede utilizarse como biosensor de ácido ascórbico (Chen *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2018a). El ácido ascórbico reaccionó inmediatamente cuando se añadió a la solución acuosa de nitrato de plata, con un cambio instantáneo en el color de la solución de transparente a dorado a una precipitación (Figura 58(A-4, B-4)). El color amarillo dorado de la reacción es causado por diminutas nanoesferas que absorben luz con picos de resonancia de plasmón cerca de 400 nm. El espectro de absorción UV- visible registrado durante la reacción durante cinco horas con cantidades variables de nitrato de plata mostró tres bandas de resonancia de plasmón de superficie

características de las nanopartículas de plata en las longitudes de onda: 402 nm, 421 nm y 467 nm (Figura 57C – E). Estas nanopartículas tenían un diámetro promedio de aproximadamente 20 nm, como se observa en la imagen de microscopía electrónica (Figura 58A).

El ácido ascórbico sintetizó una gran cantidad de nanopartículas de 20 nm de tamaño con resonancia de plasmón a  $\lambda = 402$  nm. Se obtuvo una concentración relativamente alta de nanopartículas de plata de este tamaño, 73,6 nM. La concentración de nanopartículas de plata con un diámetro de 50 nm fue de 11,4 nM y la de las nanopartículas más grandes con un diámetro de 80 nm solo fue de 4,6 nM, medida de acuerdo con la ley de Beer-Lambert. Las concentraciones molares teóricas serían 3286 nM, 33 nM y 2,7 nM, respectivamente, según se estima asumiendo que se ha producido la conversión total de los iones de plata en nanopartículas de plata de estos tamaños (Tabla 13).

Las señales FTIR del ácido ascórbico y de las nanopartículas de plata derivadas de la reducción del ácido ascórbico fueron muy similares (Figura 58G, H). Por ejemplo, se identificó una vibración de estiramiento del enlace C = C y el pico del enol-hidroxilo a 1568-1698  $\text{cm}^{-1}$  y 1293  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Lo mismo ocurrió con los picos a 3359  $\text{cm}^{-1}$  y 3250  $\text{cm}^{-1}$ , que identifican el enlace de estiramiento O – H (hidroxilo). Además, hubo dos picos a 1715 y 1722  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden al estiramiento del enlace C=O. Picos entre 500 y 600  $\text{cm}^{-1}$  son bandas características atribuidas a la vibración reticular del óxido de plata (Shume *et al.*, 2020).

En el análisis DRX (Figura 58J), se encontraron diferentes estados de oxidación de la plata: plata, óxido de plata ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ), óxido de plata (I, III) ( $\text{AgO}$ ) y  $\text{Ag}_3\text{O}_4$ . El patrón con puntos de difracción de valores  $2\theta$  de 38,14°, 44,34°, 64,44° y 77,48°, indexado a los planos (111), (200), (220) y (311) de la estructura cúbica centrada en las caras (fcc), era compatible con la fase

cúbica de Ag. El tamaño medio de las partículas cristalinas de plata como 40 nm se calculó con la ecuación de Scherrer.

El espectro de extinción de las nanopartículas de plata después de la adición de cianuro mostró una reducción en el plasmón de resonancia que se observó como una disminución de la densidad óptica en un 50%. Específicamente, esta opacidad fue prominente a longitudes de onda de 402 nm, 421 nm y 467 nm (Figura 58F). Por tanto, se pudo concluir que las nanopartículas de plata formaron complejos con el ácido ascórbico, basándose en el análisis de espectro FTIR. La formación de estos complejos produce fluorescencia que es la base de los sistemas biosensores de ácido ascórbico que utilizan nanopartículas de plata (Park *et al.*, 2009). Sin embargo, la molécula asociada con las nanopartículas fue el ácido deshidroascórbico (DHA; Figura 58I), que tiene tres grupos carbonilo en su estructura. El posible mecanismo de síntesis de las nanopartículas de plata podría explicarse por la oxidación del ácido ascórbico a DHA. Por tanto, las nanopartículas de plata se cubrirían con DHA (Siddiqui *et al.*, 2013). Esta molécula de 1,2,3-tricarbonilo es altamente electrofílica y la estructura de polihidroxilo se produce por hidrólisis irreversible del enlace éster (Xiong *et al.*, 2011). La alta reactividad de estas nanopartículas de plata-DHA ha permitido el desarrollo de sistemas simples de detección de cianuro (Khatha *et al.*, 2019).

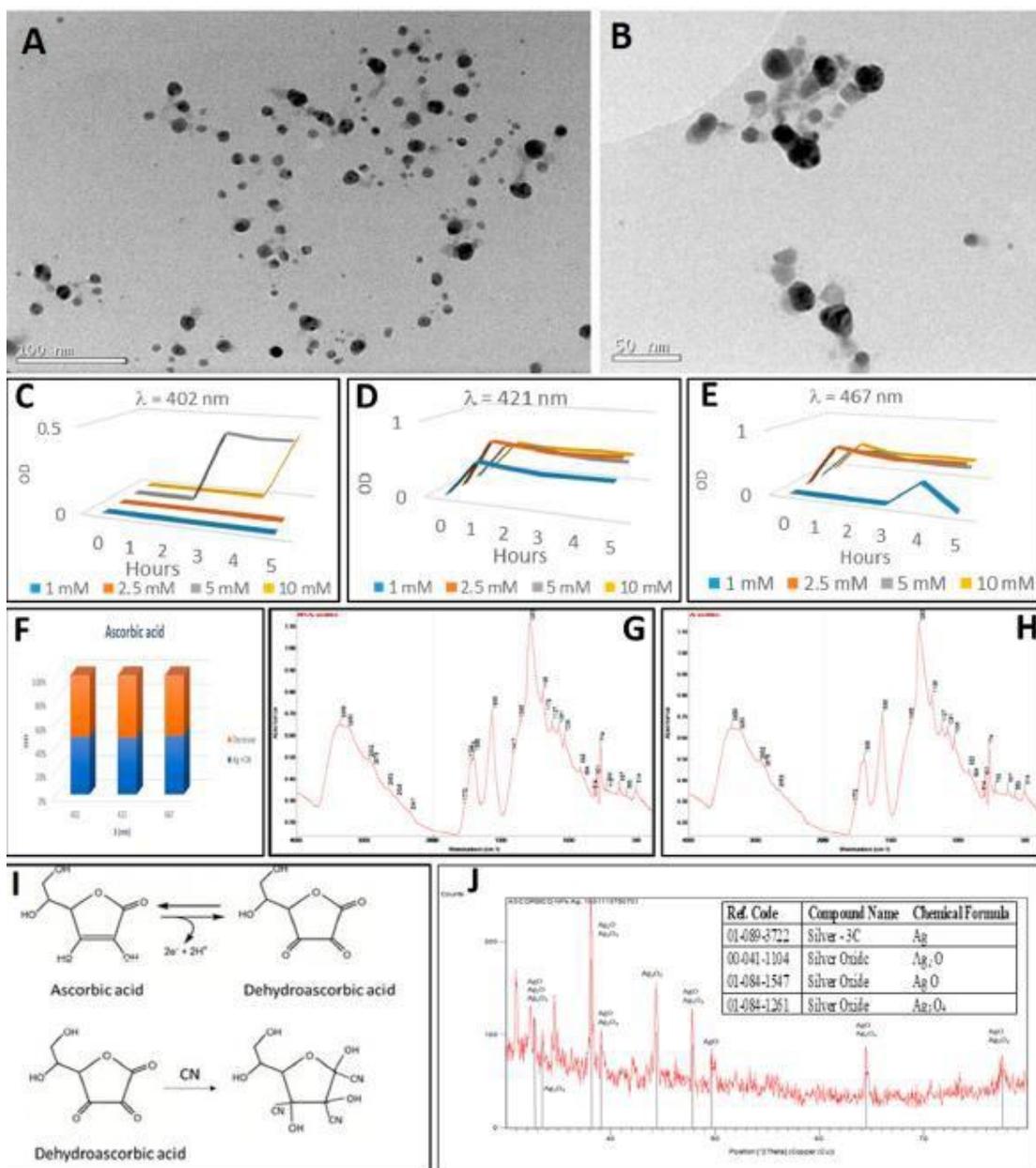


Figura 58. Análisis de nanopartículas de plata sintetizadas con ácido ascórbico. (A) Imagen TEM de AgNP. (B) imagen de AgNP después del tratamiento con cianuro. (C-E) Síntesis de nanopartículas de plata por reacción de diferentes concentraciones de AgNO<sub>3</sub> con ácido ascórbico durante 5 h (en intervalos de una hora). (C) Máximo a una longitud de onda de 402 nm (nanopartículas de 20 nm de diámetro). (D) Máximo a una longitud de onda de 421 nm (nanopartículas de 50 nm de diámetro). (E) Máximo a una longitud de onda de 467 nm (nanopartículas de 80 nm de

diámetro). (F) disminución de la DO después de la adición de cianuro a nanopartículas de plata. (G) Espectro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) de nanopartículas derivadas del ácido ascórbico. (H) Espectro FTIR del ácido ascórbico. (I) Reacción redox del ácido ascórbico al ácido deshidroascórbico y efecto de la adición de cianuro. (J) Difractograma DRX de los AgNPs obtenidos por reacción del ácido ascórbico con  $\text{AgNO}_3$ ; en el recuadro, la tabla con las identificaciones. Los picos que identifican la presencia de óxidos de plata se han indicado en el difractograma DRX.

#### 4.5.5 Síntesis de nanopartículas de plata por ácido 2-hidroxibenzoico.

El ácido salicílico o ácido 2-hidroxibenzoico ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$ ) tiene un grupo hidroxilo y un grupo ácido. La capacidad antioxidante de esta molécula es muy limitada. Aunque el ácido hidroxibenzoico puede formar quelatos con metales, los formados con plata tienen muy poca estabilidad (Pecci *et al.*, 1960). La adición de ácido 2-hidroxibenzoico a una solución de nitrato de plata conduce a una reacción lenta y discreta (Figura 59(A-5)) en el que apenas se aprecia turbidez después de cinco horas a  $40^\circ\text{C}$  (figura 59(B-5)). Esta ligera reacción produce dos pequeños picos en el espectro UV-visible (Figura 59C, D) a las longitudes de onda de 421 nm (50 nm de diámetro) y 467 nm (80 nm de diámetro). Las concentraciones molares son 1,9 nM y 0,6 nM (Tabla 13) para las nanopartículas de 50 nm y 80 nm, respectivamente. La síntesis de nanopartículas de plata utilizando ácido salicílico requiere un medio alcalino según la literatura (Gusrizal *et al.*, 2017; Susanthi *et al.*, 2017). Además, el ácido m-hidroxibenzoico podría promover la formación de AgNP estables sin un agente de protección adicional (Gusrizal *et al.*, 2017). Sin embargo, la reacción no debería depender de la presencia de reactivos fuera de la propia reacción redox. Es decir, solo se debe considerar la reacción independiente del pH, o en otras palabras, el potencial redox de configuración real (Krishtalik, 2003).

La síntesis de nanopartículas de plata semiesféricas sin formar agregados, que fueron sintetizadas por reducción de plata mediada por ácido 2-hidroxibenzoico, fue revelada por imágenes de TEM (Figura 59A).

Los espectros FTIR del ácido hidroxibenzoico y de las nanopartículas de plata sintetizadas por reducción mediada por ácido hidroxibenzoico fueron muy cercanos (Figura 59 E, F). Por ejemplo, picos a 1240, 1287 y 1315  $\text{cm}^{-1}$  se asociaron con la flexión C – O, el pico a 1670  $\text{cm}^{-1}$  correspondía al carbonilo y a los 1240  $\text{cm}^{-1}$  a fenol. Lo mismo se aplica al pico a 3385  $\text{cm}^{-1}$  del enlace estirado O – H (hidroxilo). Un pico aproximadamente a 550  $\text{cm}^{-1}$  es una banda característica atribuida a la vibración reticular del óxido de plata (Siddiqui *et al.*, 2013).

En el análisis DRX (Figura 59H), también se observaron diferentes estados de oxidación: plata, óxido de plata ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ) y óxido de plata (I, III) ( $\text{AgO}$ ). El patrón de difracción a valores  $2\theta$  de 38.15°, 44,33°, 64,48° y 77,52° podría indexarse a los planos (111), (200), (220) y (311) de la estructura cúbica centrada en las caras (fcc), que es compatible con la fase Ag. Se estimó un tamaño promedio de 48 nm de las partículas cristalinas de plata con la ecuación de Scherrer.

Excepto por un ligero aumento en la densidad óptica de los espectros UV-visible después de la adición de cianuro, las variaciones para las longitudes de onda de 421 nm y 467 nm (Figura 59G) no se detectaron. Estos resultados podrían estar relacionados con el bajo poder reductor / antioxidante del ácido hidroxibenzoico que se adhirió a las nanopartículas de plata.

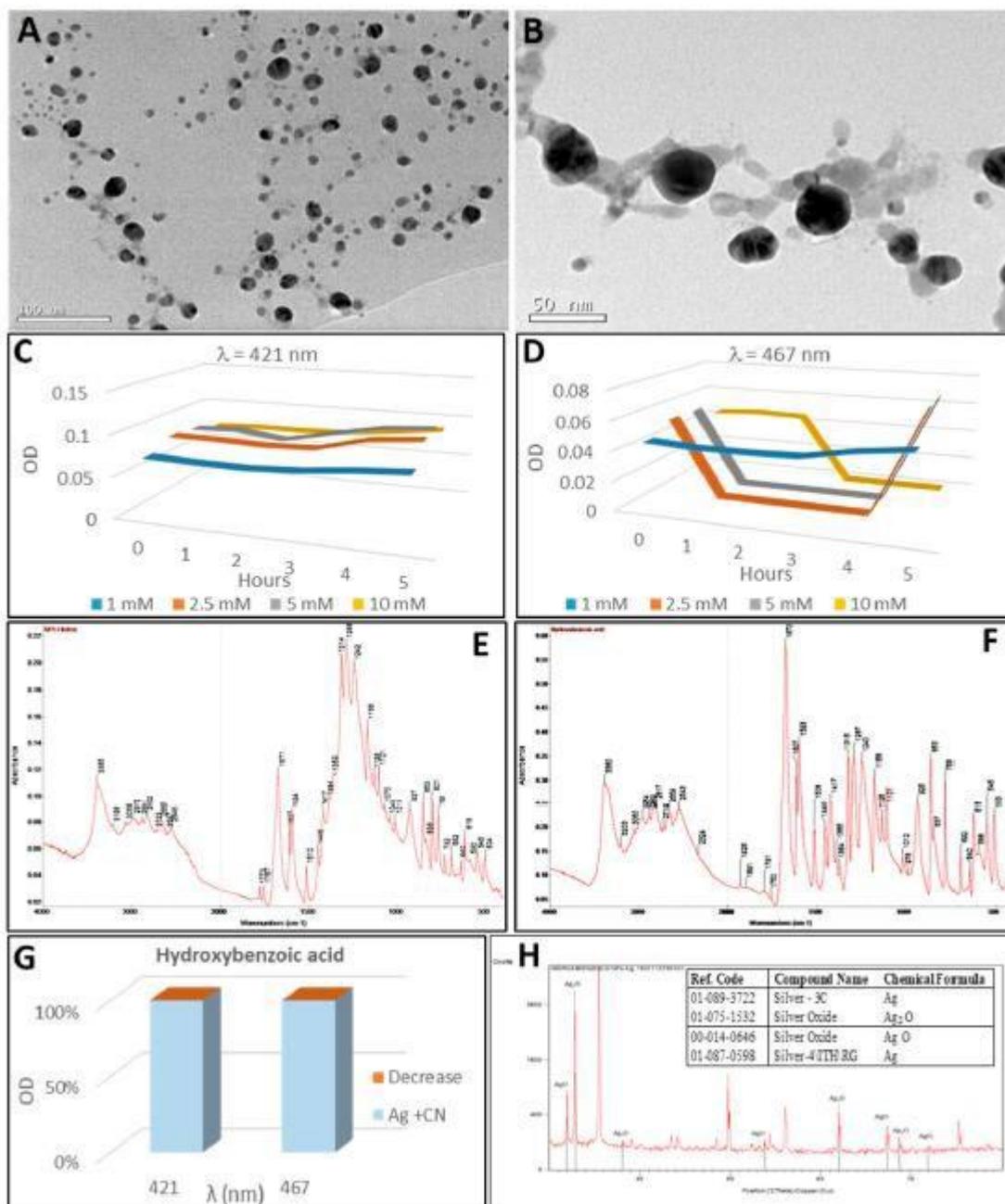


Figura 59. Análisis de nanopartículas de plata sintetizadas con ácido hidroxibenzoico. (A) Imagen TEM de las AgNP antes del tratamiento con cianuro. (B) imagen de AgNP después del tratamiento con cianuro. (C, D) Síntesis de nanopartículas de plata por reacción de diferentes  $\text{AgNO}_3$  concentraciones con ácido hidroxibenzoico durante 5 h (en intervalos de una hora). (C) Máximo a una longitud de onda de 421 nm (nanopartículas de 50 nm de diámetro). (D) Máximo a una longitud de onda de 467 nm (nanopartículas de 80 nm de diámetro). (E) Espectro FTIR de nanopartículas

derivadas del ácido hidroxibenzoico. (F) Espectro FTIR del ácido hidroxibenzoico. (G) Reducción relativa de la DO después de la adición de cianuro a nanopartículas de plata. (H): Perfil DRX de los AgNP obtenidos por la reacción del ácido hidroxibenzoico con  $\text{AgNO}_3$ ; en el recuadro, la tabla con las identificaciones. Los picos que identifican la presencia de óxidos de plata se han indicado en el difractograma DRX.

#### 4.5.6 Síntesis de nanopartículas de plata por ácido cafeico.

El ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinámico) es un ácido hidroxicinámico fenólico. Es un poderoso antioxidante. Además, el ácido cafeico tiene un alto poder reductor y es un quelante de metales (Gülçin, 2006). El ácido cafeico reaccionó inmediatamente cuando se añadió a la solución de nitrato de plata. La reacción se hizo visible con la aparición de una coloración gris oscura que contrastaba con la transparencia de la solución de nitrato de plata y el color amarillo pálido del ácido cafeico (Figura 60 (A-6, B-6)). Las nanopartículas de plata se podrían sintetizar de forma rápida y sencilla utilizando ácido cafeico como agente reductor y estabilizador de forma similar a la síntesis de nanopartículas de oro (Guo *et al.*, 2015). En el espectro UV-visible, se detectaron dos picos de SPB en las longitudes de onda de 421 nm y 467 nm que corresponderían a nanopartículas de 50 nm y 80 nm de diámetro (Figura 60 C, D). La síntesis más importante fue la de las nanopartículas de 50 nm de diámetro, que se inició de inmediato para todas las concentraciones probadas, alcanzando altos valores de densidad óptica. Por otro lado, a medida que aumenta la concentración de nitrato de plata, la cantidad de nanopartículas de 50 nm de tamaño disminuye a favor de la aparición de nanopartículas de 80 nm de diámetro. La concentración de ambos varía entre 13,5 nM (nanopartículas de 50 nm de diámetro) y 3,2 nM (nanopartículas de 80 nm de diámetro (Tabla 13). Se pueden visualizar nanopartículas esféricas de plata de diferentes tamaños y color grisáceo, sintetizadas mediante ácido cafeico, y materia gris que rodea a las nanopartículas (Figura 60A).

Cuando el espectro FTIR de las nanopartículas sintetizadas con ácido cafeico (Figura 60E) se analizó una banda ancha e intensa en la que se pueden observar los picos a  $2650\text{ cm}^{-1}$  (Estiramiento O – H de ácido carboxílico) y  $3212\text{--}3283\text{ cm}^{-1}$  identificando el estiramiento O – H. El enlace C = O apareció en los picos a  $1773\text{--}1751\text{ cm}^{-1}$  y el enlace C – O a  $1275$  y  $1278\text{ cm}^{-1}$  para nanopartículas y ácido cafeico, respectivamente. La presencia de óxido de plata podría deducirse por la presencia de una banda ancha entre  $500$  y  $600\text{ cm}^{-1}$  (Irudayaraj, 2013). El ácido cafeico oxidado permaneció así en la superficie de las nanopartículas de plata. El ácido cafeico es bien conocido por su fuerte adsorción en superficies metálicas o de óxido metálico debido principalmente al grupo funcional catecol (Kim y Han, 2016).

Mediante el análisis DRX (Figura 60H), se detectaron los siguientes estados de oxidación: politipo 3C de plata y óxido de plata II (AgO). El patrón con puntos de difracción en valores  $2\theta$  de  $38,17^\circ$ ,  $44,28^\circ$ ,  $64,62^\circ$  y  $77,41^\circ$  podría indexarse a los planos (111), (200), (220) y (311) de la estructura cúbica centrada en las caras (fcc), que es compatible con la fase Ag. El tamaño medio de las partículas cristalinas de plata fue de  $43\text{ nm}$ , calculado mediante la ecuación de Scherrer.

Cuando se utilizó ácido cafeico para sintetizar nanopartículas de plata a partir de nitrato de plata, el espectro UV visible permaneció prácticamente sin cambios después de la adición de cianuro. Solo una pequeña disminución en la densidad óptica a  $421\text{ nm}$  y  $467\text{ nm}$  (Figura 60G) se puede observar. Se sabe que en el ácido cafeico, la oxidación conduce a la formación de la correspondiente o-quinona estable mediante la desprotonación del radical semiquinona inicial. La o-quinona puede formar un impedimento o un efecto estérico alrededor de las nanopartículas de plata que previene la reacción (Liu *et al.*, 2018b). Esta o-quinona se puede observar en la proximidad de las nanopartículas en la imagen TEM (Figura 60A, B).

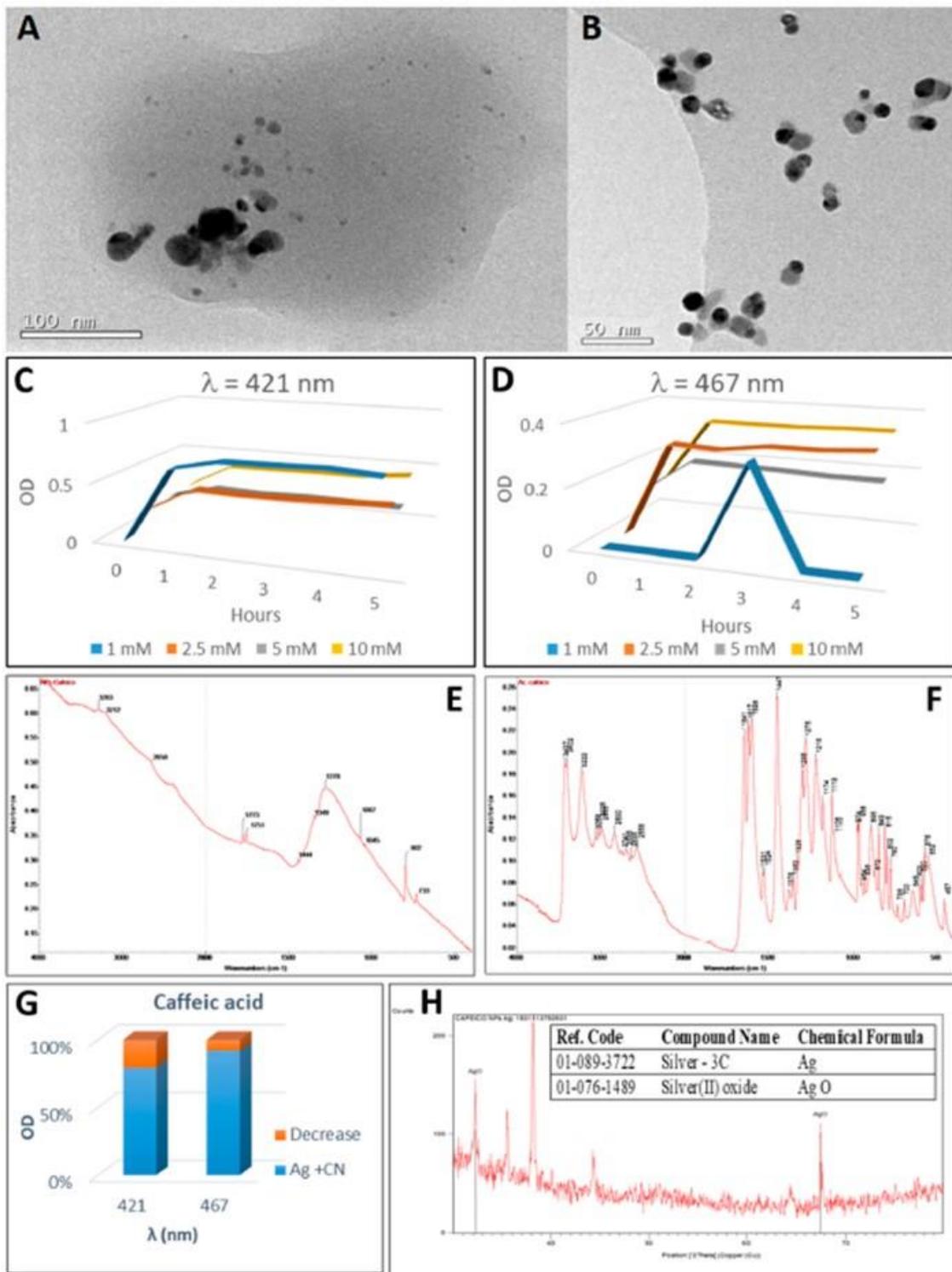


Figura 60. Análisis de nanopartículas de plata sintetizadas con ácido cafeico. (A) Imagen TEM de los AgNP antes del tratamiento con cianuro. (B) Imagen

TEM de los AgNP después del tratamiento con cianuro. (C, D) Esquema 3. Concentraciones con ácido cafeico durante 5 h (en intervalos de una hora). C: máximo a una longitud de onda de 421 nm (nanopartículas de 50 nm de diámetro). (D) máximo a una longitud de onda de 467 nm (nanopartículas de 80 nm de diámetro). (E, F) Espectros FTIR de nanopartículas derivadas del ácido cafeico (E) y ácido cafeico (F). (G) Disminución de la DO después de la adición de cianuro a nanopartículas de plata. (H) Perfil DRX de los AgNP obtenidos por la reacción del ácido cafeico con AgNO<sub>3</sub>; en el recuadro, la tabla con las identificaciones. Los picos que identifican la presencia de óxidos de plata se han indicado en el difractograma DRX.

#### 4.5.7 Síntesis de nanopartículas de plata por catequina.

La catequina, DL-catequina, 2-(3,4-dihidroxifenil) croman-3,5,7-triol o L-epicatequina, (C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>) es un hidroxiflavano que tiene un esqueleto flavan-3-ol. La catequina es soluble en agua, aunque esta solubilidad puede aumentar con la adición de etanol y el aumento de temperatura del proceso (Cuevas-Valenzuela *et al.*, 2014). La catequina tiene un poder antioxidante que permitiría su uso como estándar fenólico en la cuantificación del poder reductor en alimentos y líquidos biológicos (Katalinic *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2005). Además de su capacidad antioxidante, tiene la capacidad de quelar metales (Torreggiani *et al.*, 2008). Además, se ha demostrado que la catequina es un antioxidante mucho más eficaz en un complejo con metales que en su forma libre (Souza y De Giovani, 2004). Todas estas propiedades han determinado la capacidad de utilizar la síntesis de nanopartículas de plata por catequina para desarrollar sensores (Li *et al.*, 2019). La catequina ha sido ampliamente estudiada por su potencial terapéutico y los AgNP sintetizadas por la catequina mostraron importantes propiedades antibacterianas, anticancerígenas y de unión a proteínas (Das *et al.*, 2020).

La reacción de la catequina con el nitrato de plata se observó luego de un período de más de una hora (Figura 61 (A-7, B-7)). La reacción fue evidente por la aparición de un color dorado oscuro y la formación de un precipitado. El cambio de color de blanco turbio al marrón oscuro es causado por la oxidación de la catequina (Das *et al.*, 2020) para crear otro compuesto de semiquinona y quinona (Oliver *et al.*, 2018). Tres SPB correspondientes a las longitudes de onda de 402 nm (20 nm de diámetro), 421 nm (50 nm de diámetro) y 467 nm (80 nm de diámetro) después de cinco horas de reacción (Figura 60C – E) se han observado. La mayor concentración de nitrato de plata en la reacción favoreció la síntesis de estas nanopartículas, siendo las de 50 nm de diámetro las primeras en sintetizarse. Después de cinco horas de reacción, se alcanzó la concentración molar más alta de nanopartículas (27,3 nM) para partículas de tamaño de 20 nm (Tabla 13).

La microscopía electrónica de transmisión de alta resolución reveló la síntesis de nanopartículas de plata gracias a la catequina (Figura 61A). Además, la capacidad de protección de la catequina también se pudo observar en la misma imagen. Un halo gris oscuro apareció en las proximidades de las nanopartículas (rodeado por un círculo en la imagen). Se puede inferir que la naturaleza mixta cristalina y amorfa de los AgNP mediados por catequinas del perfil DRX. Las AgNP tenían forma pentagonal (Figura 61A, flecha sólida) y poliédrica (Figura 61B, forma una flecha hueca). Las nanopartículas esféricas más pequeñas (20 nm) fueron supuestos "núcleos" para la síntesis posterior de las partículas poliédricas de base pentagonal de 50 nm de diámetro (Keunen *et al.*, 2014). La disposición pentagonal en nanopartículas metálicas es bastante conocida. La síntesis de estas nanopartículas se favorece termodinámicamente, principalmente en tamaños muy pequeños (menos de 20 nm). A medida que aumenta el tamaño de partícula, la estructura evoluciona hacia una partícula de tipo fcc, como un cuboctaedro. Sin embargo, para partículas más grandes como en este caso, la cinética de

crecimiento, comenzando con el tamaño, la forma y la estructura de los núcleos, debe jugar un papel crítico en la determinación de la forma del producto final (Elechiguerra, 2006).

Los picos a  $3395\text{ cm}^{-1}$  y  $3223\text{ cm}^{-1}$  en el espectro de catequina FTIR (Figura 60H) revelaron el estiramiento O – H del grupo alcohol. Además, los picos a  $1147$  y  $1031\text{ cm}^{-1}$  correspondía a la flexión C – O. Por otro lado, un pico intenso y estrecho a  $1723\text{ cm}^{-1}$  Se observó, lo que indica el enlace de estiramiento C = O en el espectro FTIR de nanopartículas (Figura 61G), y también una banda ancha con picos a  $1298$ - $1143\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la flexión C – O, y un pico a  $2951\text{ cm}^{-1}$  del enlace de estiramiento C – H. El pico a  $801\text{ cm}^{-1}$  representó la flexión C – H en el anillo aromático. Así, una asociación de la quinona resultante de la oxidación de la catequina podría tener lugar en el proceso de formación de nanopartículas de plata a partir de nitrato de plata. Esta quinona se identificaría en la imagen de microscopía electrónica (Figura 61I, rodeado de un círculo). Un pico cerca de  $500\text{ cm}^{-1}$  indica la presencia de un enlace de óxido de plata (Pawar *et al.*, 2016).

Solo la presencia de  $\text{Ag}_2\text{O}$  (óxido de plata) mediante análisis DRX (Figura 61J), probablemente porque la firma de la quinona amorfa enmascaraba otros compuestos (Kumaran *et al.*, 2016). El  $\text{Ag}_2\text{O}$  la forma oxidativa de la plata se obtiene fácilmente (Korkmaz y Karadag, 2021). Cuando se agregó cianuro a la suspensión de nanopartículas de plata sintetizadas con catequina, la densidad óptica del SPB aumentó (Figura 61F). Este aumento varió del 40% para la longitud de onda de  $467\text{ nm}$  al 60% para las longitudes de onda de  $402\text{ nm}$  y  $421\text{ nm}$ . Es posible que esto se pueda atribuir a la interacción entre el tanino y el cianuro (Goldstein y Spencer, 1985), aunque serán necesarios más estudios al respecto.

Las nanopartículas de plata se sumergieron en una matriz gris (imagen TEM, Figura 61B), produciendo la aparición de aglomeraciones heterogéneas de nanopartículas rodeadas por la matriz. La formación de esta matriz podría atribuirse a la disminución de la capacidad estabilizadora de la catequina durante la reacción, lo que permite la formación de un polímero de alto peso molecular, probablemente un tanino condensado formado por unidades de catequina. Se han descrito previamente matrices similares a través de imágenes TEM cuando se sintetizaron nanopartículas con taninos (Raja *et al.*, 2014). Además, otros autores han descrito el mismo patrón de dispersión de nanopartículas de plata en la red de polímeros (Braghiroli *et al.*, 2017).

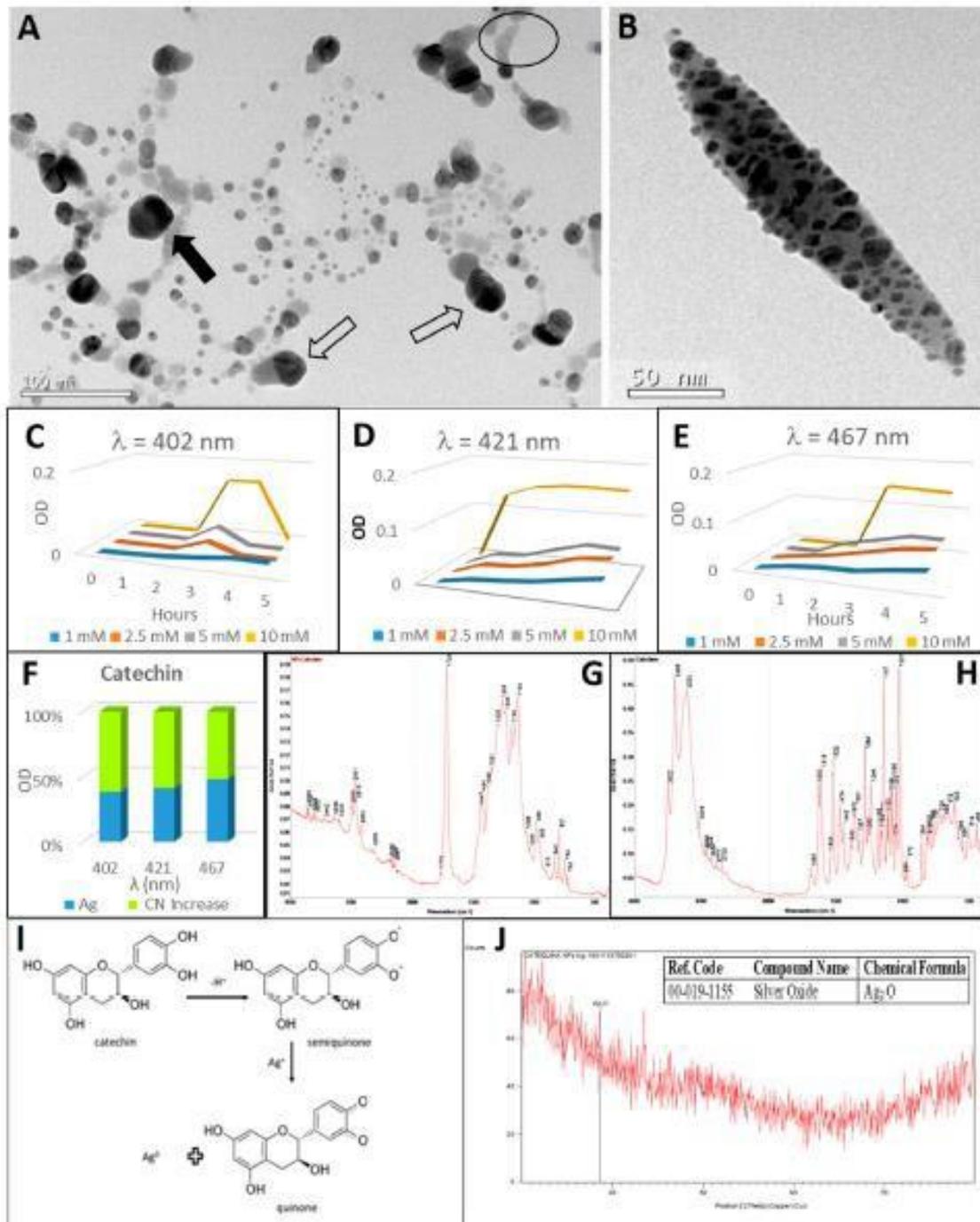


Figura 61. Análisis de nanopartículas de plata sintetizadas por catequinas. (A) Imagen TEM de las AgNP pentagonales (flecha sólida) y poliédricos (flecha hueca) antes del tratamiento con cianuro. (B) Imagen TEM de los AgNP después del tratamiento con cianuro. (C-E) Síntesis de nanopartículas de plata por reacción de  $\text{AgNO}_3$  con diferentes concentraciones con catequina durante 5 h (en intervalos de una hora). (C) Máximo a una longitud de onda de 402

nm (nanopartículas de 20 nm de diámetro); (D) 421 nm (nanopartículas de 50 nm de diámetro) y (E) máximo a una longitud de onda de 467 nm (nanopartículas de 80 nm de diámetro). (F) Aumento relativo de DO después de la adición de cianuro a nanopartículas de plata. (G, H) Espectros FTIR de nanopartículas derivadas de catequinas (G) y catequina (H). (I) Reacción de síntesis de nanopartículas de plata con catequina mediada por formación de semiquinonas y quinonas. (J) Perfil DRX de las AgNP obtenidas por la reacción de la catequina con  $\text{AgNO}_3$ ; en el recuadro, la tabla con las identificaciones. Los picos que identifican la presencia de óxidos de plata se han indicado en el difractograma DRX.

#### 4.5.8 Síntesis de nanopartículas de plata por escopoletina.

La escopoletina (sinónimos: ácido gelsemínico, 6-metilesculetina, 7-hidroxi-6-metoxi-2Hcromen-2-ona) es una hidroxicumarina, una umbeliferona que tiene un sustituto metoxi en la posición 6 ( $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4$ ). Es ligeramente soluble en agua ( $2,35 \text{ g L}^{-1}$ ). La actividad antioxidante mostrada por la escopoletina es muy débil (Thuong *et al.*, 2010). Además, su capacidad como quelante también es baja (Catapano *et al.*, 2018). La escopoletina no reaccionó inmediatamente con el nitrato de plata (Figura 62(A-9)) pero después de una hora de reacción a  $40^\circ\text{C}$  (figura 62(B-9)) la solución cambió de transparente a verde grisáceo.

El espectro UV-visible mostró solo un pico de SPB a 440 nm que disminuyó cuando se aplicó la concentración de nitrato más alta de nuestro experimento (10 mM), posiblemente debido a la precipitación de nanopartículas. Se estimó un diámetro de nanopartículas de plata de 70 nm a partir de la longitud de onda del plasmón de resonancia (440 nm). La concentración de estas nanopartículas fue de 11,1 nM (Tabla 13), aproximadamente una décima parte de lo que se podría haber logrado si el 100% de los iones de plata en la

solución se hubieran convertido en nanopartículas (100 nM). La síntesis de nanopartículas de plata mediada por la reducción de escopoletina formó un precipitado (Figura 54 (8B)).

Los espectros FTIR de nanopartículas derivadas de escopoletina y de escopoletina (Figura 62 E, F) mostró un pico a 3327-3328  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente al estiramiento C – H. sin embargo, el el pico en el estándar de escopoletina estaba bien definido, mientras que la banda era más amplia en el caso de las nanopartículas. Además, las bandas correspondientes a C = C aromático se extienden (entre 1500 y 1600  $\text{cm}^{-1}$ ) y C = O estiramiento (cerca de 1700  $\text{cm}^{-1}$ ) fueron identificados.

Un pico intenso a 1286  $\text{cm}^{-1}$  reveló el estiramiento C – O. El pico a 801  $\text{cm}^{-1}$  se asoció a una flexión C – H (675-1000  $\text{cm}^{-1}$ ) que corresponde al estiramiento C – H a 2851-2928  $\text{cm}^{-1}$ . Estas bandas representan las vibraciones del enlace CH en el anillo aromático.

Además, diferentes estados de oxidación de la plata en el análisis DRX (Figura 62H) se observaron: plata, óxidos de plata ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ,  $\text{Ag}_2\text{O}_3$ ) y óxido de plata (I, III) ( $\text{AgO}$ ). El patrón con puntos de difracción en valores  $2\theta$  de 38.15°, 44,33°, 64,52° y 77,52° podría indexarse a los planos (111), (200), (220) y (311) de la estructura cúbica centrada en las caras (fcc), que es compatible con la fase cúbica de Ag. El tamaño medio de las partículas cristalinas de plata fue de 63 nm, calculado mediante la ecuación de Scherrer.

La adición de cianuro apenas disminuyó la densidad óptica de los espectros de absorción (Figura 62 G). En la imagen TEM se pueden observar nanopartículas dispersas con formas heterogéneas (Figura 62B). Las NP más grandes, parecidos a galletas, eran grupos de nanopartículas (Figura 62D), de acuerdo con la descripción de NP similares a cookies de otros autores (Huang y Xu, 2010).

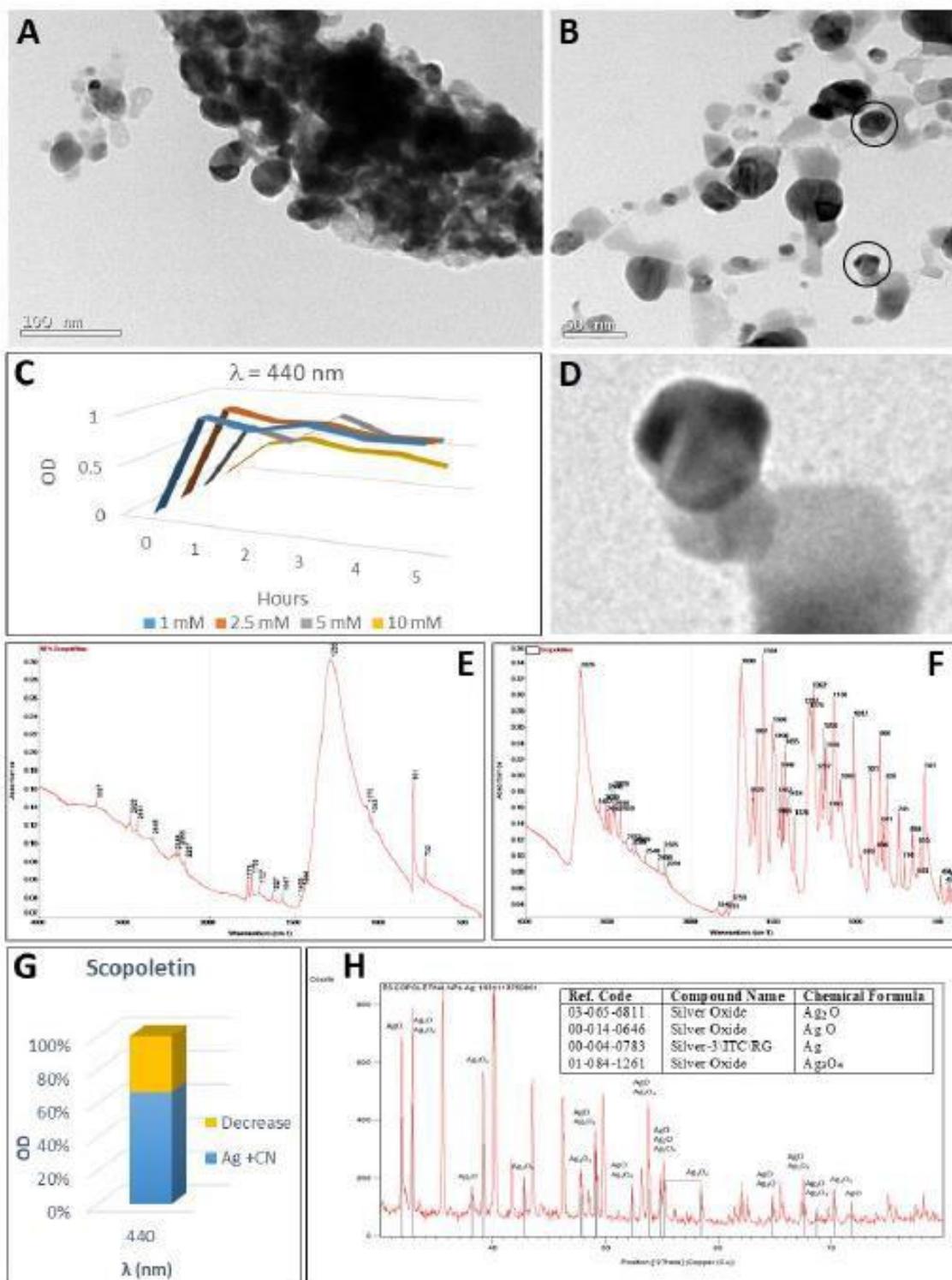


Figura 62. Análisis de las nanopartículas de plata sintetizadas con escopoletina. (A) Imagen TEM de las AgNP antes del tratamiento con cianuro. (B) Imagen TEM de las AgNP después del tratamiento con cianuro. (C) Síntesis de nanopartículas de plata por reacción de diferentes  $\text{AgNO}_3$  concentraciones con escopoletina durante 5 h (en intervalos de una hora).

Máximo a 440 nm de longitud de onda (nanopartículas de 70 nm de diámetro). (D) Detalle de agregación de nanopartículas, con forma *cookie-like*. (E, F) Espectros FTIR de nanopartículas derivadas de escopoletina (E) y escopoletina (F). (G) Disminución de la DO después de la adición de cianuro a nanopartículas de plata. (H) Perfil RXD de AgNPs obtenido por reacción de escopoletina con  $\text{AgNO}_3$ ; en el recudro, la tabla con las identificaciones. Los picos que identifican la presencia de óxidos de plata se han indicado en el difractograma DRX.

## 5. CONCLUSIONES

1. Se ha conseguido sintetizar AgNPs mediante síntesis verde a partir de extractos vegetales acuosos de dos especies de menta (*Mentha longifolia* L. y *Mentha piperita* L.). La presencia de componentes biológicamente activos permite la reducción del nitrato de plata a nanopartículas metálicas.
2. Las AgNPS obtenidas con el extracto acuoso de *M. longifolia* L. tienen un tamaño medio de 42 nm en una concentración calculada para ese tamaño de 3.61 nM. Son partículas semiesféricas-ovaladas con metabolitos adsorbidos en la superficie. Estas NPs reaccionan con cianuro observándose estructuras con forma de hoja de helecho y filamentos.
3. Las AgNPS obtenidas con el extracto acuoso de *M. piperita* L. tienen un tamaño medio de 27 nm en una concentración calculada para ese tamaño de 3.85 nM. Son partículas semiesféricas-ovaladas con metabolitos adsorbidos en la superficie. Estas NPs reaccionan con cianuro observándose estructuras espinosas tridimensionales.
4. Se han sintetizado nanopartículas de plata utilizando extractos de plantas sintéticos: quercetina,  $\beta$ -caroteno, ácido gálico, ácido ascórbico, ácido hidroxibenzoico, ácido cafeico, catequina y escopoletina, que mostraron diferentes capacidades de síntesis, diferentes formas y tamaños, y diferentes agregaciones y presencia en la superficie de las nanopartículas.
5. Entre los resultados, destacan las estructuras micelares obtenidas con quercetina, las nanopartículas triangulares y las formas poliédricas,

ambas con esquinas truncadas sintetizadas con  $\beta$ -caroteno y las nanopartículas pentagonales sintetizadas con catequina.

6. La reactividad de las nanopartículas, medida frente a cianuro, fue diferente y se asociada a las características físico-químicas de las distintas nanopartículas sintetizadas. Se observaron diferencias de reactividad entre las nanopartículas sintetizadas, desde el nivel mínimo detectado para las nanopartículas sintetizadas con ácido hidroxibenzoico hasta las nanopartículas más reactivas sintetizadas con ácido ascórbico. Se observaron dos excepciones para este método de estudiar la reactividad de nanopartículas con cianuro. El primero se refería a nanopartículas sintetizadas con ácido gálico, que podrían estar asociadas a la presencia de  $\text{Ag}^+$  (plata parcialmente oxidada) en la superficie de las nanopartículas. El segundo se refería a nanopartículas sintetizadas con catequina. En este último, la presencia de taninos derivados de la polimerización de la catequina durante la reacción de síntesis de nanopartículas de plata podría ser la causa, ya que estos taninos podrían actuar como agentes inhibidores de la reacción de las nanopartículas con cianuro.
7. Este estudio sobre el papel de cada uno de estos metabolitos en la síntesis de nanopartículas de plata es un primer paso para optimizar la metodología de síntesis verde.



# ***DISCUSIÓN GENERAL***



## DISCUSIÓN GENERAL

Entre las actividades humanas la producción agraria ocupa casi el 40 % del área terrestre del planeta y utiliza el 70 % del agua dulce que se consume en el mundo. La agricultura ha afectado a los recursos del suelo, los bosques y la biodiversidad. El uso de pesticidas, fertilizantes y energía puede provocar impactos ambientales como la contaminación del agua por pesticidas y exceso de nutrientes; el calentamiento global por las emisiones de gases de efecto invernadero (las actividades agrícolas contribuyen al calentamiento global mediante la emisión de óxido nitroso y metano, dos poderosos gases de efecto invernadero); contaminación del aire por emisión de gases debido al uso de fertilizantes y la aplicación de pesticidas (OCDE, 2019).

Recientemente, se han publicado estrategias clave del Pacto Verde (*Green Deal*) de la Comisión Europea, que describen una transición hacia un sistema alimentario justo, saludable y respetuoso con el medio ambiente. La estrategia “de la granja a la mesa” (Figura 63) está en centro del *Green Deal*. Aborda de manera integral los desafíos de los sistemas alimentarios sostenibles y reconoce los vínculos entre personas saludables, sociedades saludables y un planeta saludable.



Figura 63. Objetivos generales de la estrategia “de la granja a la mesa” (Fuente: FOOD 2030 Platform).

La UE quiere reducir la huella ambiental y climática del sistema alimentario de la UE y fortalecer su resiliencia, garantizar la seguridad alimentaria frente al cambio climático y la pérdida de biodiversidad, y liderar una transición global hacia la sostenibilidad competitiva desde la granja hasta la mesa y aprovechar las nuevas oportunidades.

Actualmente, para abordar de manera eficaz los numerosos desafíos a los que nos enfrentamos, es necesario acelerar el avance de la ciencia y las tecnologías para proporcionar soluciones transformadoras.

En lo referente a la producción agraria la estrategia se dirige, entre otros, a reducir la dependencia de plaguicidas y detener la pérdida de biodiversidad, reduciendo el uso general y el riesgo de plaguicidas químicos en un 50 % y reduciendo el uso de plaguicidas más peligrosos en un 50 % para 2030. Las acciones incluyen la promoción de la Gestión Integrada de Plagas (GIP), que incluye el uso de técnicas de control alternativas.

La nanotecnología tiene el potencial de contribuir a una nueva revolución agrícola hacia la sostenibilidad, principalmente cuando los nanomateriales o nanopartículas utilizadas se obtienen mediante síntesis verde. La síntesis verde de nanopartículas (de oro, plata, cobre, paladio, platino, óxido de zinc, dióxido de titanio, etc...) ha demostrado ser una metodología sostenible, benevolente con el medioambiente, rápida, fácil y eficiente, lo cual es muy importante debido a la creciente demanda de las nanopartículas hoy en día (Jadoun *et al.*, 2021). En este sentido, se pueden utilizar extractos vegetales, algas, hongos y bacterias para llevar a cabo la síntesis de diferentes tipos de nanopartículas. La utilización de las plantas permite la síntesis de nanopartículas en un solo paso gracias a la presencia de fitoquímicos que actúan como agentes reductores en la síntesis de nanopartículas metálicas. Los principales antioxidantes presentes en los extractos de plantas (quercetina, caroteno, ácido gálico, ácido ascórbico, ácido hidroxibenzoico,

ácido cafeico, catequina y escopoletina), son capaces de sintetizar nanopartículas de plata al reaccionar con una solución de  $\text{AgNO}_3$  (Al-Zahrani *et al.*, 2021).

Las plantas poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa. Estos compuestos derivados del metabolismo secundario se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas, muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros. Reciben también la denominación de productos naturales (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Las evidencias de genómica y bioquímica indican que es probable que los genomas de las plantas individuales tengan, el hasta ahora no apreciado, potencial para producir diversos repertorios de metabolitos. Esto es evidente a partir del análisis del genoma de *Arabidopsis*, que fue el primero en ser secuenciado (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) Aproximadamente el 25% de los genes de *Arabidopsis thaliana* están implicados en la síntesis de productos naturales. La lista de los genes de *Arabidopsis* que están involucrados en rutas específicas de productos naturales está creciendo rápidamente, pero de ninguna manera está completo. Además, más de 170 productos naturales de siete clases principales de compuestos han sido detectados en *Arabidopsis* (D'Auria y Gershenzon, 2005). Muchos más genomas, especialmente de plantas aromáticas y medicinales, todavía no están caracterizados. Desde una perspectiva de producción, es importante dar sentido a la gran cantidad de datos que estamos obteniendo actualmente de los experimentos realizados para utilizar enfoques a gran escala y de alto rendimiento y encontrar formas de aplicar este conocimiento para mejorar la producción de compuestos específicos (Ferrari, 2010).

*Mentha longifolia* L. es una rica fuente de compuestos fitoquímicos como piperitona, óxido de piperitona, piperitenona, pulegona, d-limoneno, mentona, carvona, mentol,  $\beta$ -cariofileno, 1,8-cineol, 5,7,4-trihidroxi-6,2,3-trimetoxiflavona, carvona, limoneno, tripal y oxatiano. *Mentha longifolia* posee un efecto antioxidante que podría atribuirse a la presencia de fitosteroles, ácidos grasos insaturados, compuestos fenólicos y constituyentes volátiles específicos y antimicrobianos que interfieren en el tratamiento de muchas enfermedades (Al-Taie y Al-Kenane, 2020). Según los resultados presentados en el Capítulo 1 de este documento, los compuestos fenólicos y, sobre todo los flavonoides, son responsables de parte de esta capacidad antioxidante de la muestra de *M. longifolia* L. tal y como se ha observado mediante el análisis del espectro UV-Vis, los tests fitoquímicos y la valoración de compuestos fenólicos totales (mediante el método de Folin-Ciocalteu) y de flavonoides (mediante el método espectrofotométrico). Además, el análisis mediante GC-TOF ha podido determinar la presencia de tres compuestos mayoritarios en el extracto acuoso de *M. longifolia* L.: el fenilacetaldehído, la mentofuranona y el DDMP (3,5-dihidroxi-6-metil-2,3-dihidro-4H-piranona (3,5-dihydroxy-6-methyl-2,3-dihydro-4H-pyran-4-one)). Los dos primeros podrían proporcionar al extracto de la muestra de *M. longifolia* L. actividad antifúngica, mientras que el DDMP participaría también en la actividad antioxidante. En el caso del quimiotipo analizado no se ha detectado la presencia de pulegona, de haberse detectado debería evitarse su uso debido a la toxicidad de este componente (Patonay y Nemeth-Zamborine, 2021).

La creciente importancia comercial de los metabolitos secundarios ha dado lugar en los últimos años a un gran interés particularmente en la posibilidad de alterar la producción de metabolitos vegetales bioactivos.

Las estrategias más activamente perseguidas para aumentar la producción de productos naturales son la aplicación de elicitores químicos y el estudio de la transducción de señales, vías y factores de transcripción necesarios para la expresión de genes implicados en la biosíntesis de compuestos específicos, con el fin de diseñar genéticamente el cultivo celular. En términos generales, la activación de la biosíntesis de productos naturales vegetales requiere que una señal extracelular o intracelular sea percibida por un receptor en la superficie de la membrana plasmática. La percepción del elicitador inicia una cascada de transducción de señales que conduce a la activación o a la biosíntesis *de novo* de factores de transcripción, que a su vez regulan directamente la expresión de genes biosintéticos implicados en el metabolismo secundario (Ferrari, 2010).

Los elicitores son sustancias químicas que desencadenan la activación de las respuestas de defensa de las plantas. Estos productos químicos pueden ser agentes abióticos, como iones metálicos y compuestos inorgánicos, o pueden derivarse de otros organismos, como moléculas derivadas de hongos, bacterias, virus o herbívoros, así como productos químicos derivados de plantas que se liberan en el sitio del ataque o se acumulan sistémicamente tras el ataque de patógenos o herbívoros. En este trabajo se ha pretendido incrementar la cantidad de metabolitos secundarios en plantas de especies del género *Mentha* mediante tratamiento biótico como por ejemplo los producidos por organismos beneficiosos como *Trichoderma harzianum* y abiótico mediante estrés osmótico con tratamiento de NaCl.

En el tratamiento de elicitación con *T. harzianum*, Junto con la promoción del crecimiento vegetal (Capítulo 2), se indujo una amplia reprogramación molecular. Es conocida esta respuesta en las plantas y así se sabe que provoca modificaciones en la vía biosintética de los fenilpropanoides (incluidos los compuestos fenólicos de defensa como las cumarinas y antocianinas glicosiladas) que resulta en un importante incremento de los mismos (Iula *et*

*al.*, 2021) y también un aumento evidente en el contenido de fenoles y flavonoides (Mona *et al.*, 2017). Sin embargo, en el estudio realizado no se ha apreciado este incremento en la cantidad total de compuestos fenólicos ni de flavonoides, aunque sí en la capacidad antioxidante total.

Mediante el análisis GC-MS se observó que, como resultado de la elicitación, con ambos elicitores, se produjo un incremento, sobre todo, de óxido de piperitona (1.2 epoxy-p-menthan-3-one). Los quimotipos ricos en óxido de piperitona, pueden tener un gran valor como agentes antimicrobianos contra numerosos patógenos (Patonay y Nemeth-Zamborine, 2021). Pero también se elicitaron en las plantas de *M. longifolia* L. cultivadas con *T. harzianum*: Borneol, 1,2Cyclopentanedione, P-Menthan-1,8-dien-3-one, 2-pinen-4-one, Mento furanona, 2-ally-4-methylphenol, Phenol, p-cymen-2-ol y Dietil phtalate. Es decir, en la elicitación con *T. harzianum* no sólo se produjo, en las plantas de *M. longifolia* L., un incremento en la cantidad de mento furanona sino también de otros tres compuestos antifúngicos: borneol, óxido de piperitona y el p-cymen-2-ol. El borneol es uno de los componentes de los aceites esenciales que tiene actividad antifúngica (Wang y Liu, 2021). El óxido de piperitona es uno de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales con actividad antifúngica (Oumzil *et al.*, 2002) al igual que el p-cymen-2-ol (Lang y Buchbauer, 2012).

La diferencia en la cantidad de estas sustancias estaría implicada en las respuestas que se han obtenido en los ensayos de infección con *Colletotrichum gloeosporioides*, responsable de la antracnosis en olivo y que causa la aceituna jabonosa. Aunque se ha determinado un efecto fungistático atribuido al extracto acuoso de *M. longifolia* L. (superior al obtenido para el extracto acuoso de *M. piperita* L.) el efecto es mucho más evidente cuando se realiza el tratamiento de las aceitunas con los compuestos orgánicos volátiles del té de *M. longifolia* L. de plantas que se han sometido al tratamiento de elicitación con *T. harzianum*. En consecuencia, este efecto

podría atribuirse a la mayor cantidad de los compuestos volátiles cuantificada en estas plantas. El tratamiento de aceitunas con infusión de *M. longifolia* L. prolonga la vida del fruto desde su cosechado hasta su transformación en almazara permitiendo la obtención de un aceite no tan alterado como correspondería al ataque de *C. gloeosporioides*, es frecuente que la incidencia de aceitunas con infecciones latentes sea entre dos y tres veces superior al de aceitunas con lesiones visibles (Moral y Trapero, 2012). El atrojado es la principal causa del deterioro de la calidad de los aceites al producir grave alteración de los caracteres organolépticos, y elevada acidez (Jiménez *et al.*, 2002). El almacenamiento reduce el sabor afrutado del aceite como resultado de la reducción de compuestos fenólicos y aldehídos y este efecto se ve agravado con la presencia de patógenos. El aceite que se obtiene con el tratamiento presenta características organolépticas diferentes que determinarían su uso. Este uso podría tener una mayor aceptación en el mercado en los países como Arabia Saudita donde, a diferencia de lo que ocurre en Europa, existe una amplia variedad de usos tradicionales de *M. longifolia* L. (Patonay y Nemeth-Zamborine, 2021). Arabia Saudita es uno de los mayores consumidores de aceitunas y aceite de oliva y donde el área cultivada de olivar y la producción se están incrementando, convirtiéndose en uno de los nuevos productores de aceite de oliva del mundo.

La capacidad antioxidante del té de *M. longifolia* L. tiene otra aplicación, la síntesis verde de nanopartículas (Capítulo 3). La presencia de componentes biológicamente activos permite la reducción del nitrato de plata a nanopartículas metálicas. Las AgNPS obtenidas con el extracto acuoso de *M. longifolia* L. tienen un tamaño medio de 42 nm en una concentración calculada para ese tamaño de 3.61 nM. Son partículas semiesféricas-ovaladas con metabolitos adsorbidos en la superficie. Para profundizar en el papel que los diferentes metabolitos presentes en el té de *M. longifolia* L. se han estudiado las nanopartículas de plata sintetizadas con los principales

antioxidantes vegetales: quercetina,  $\beta$ -caroteno, ácido gálico, ácido ascórbico, ácido hidroxibenzoico, ácido cafeico, catequina y escopoletina. Entre los resultados, destacan las estructuras micelares obtenidas con quercetina, las nanopartículas triangulares y las formas poliédricas, ambas con esquinas truncadas sintetizadas con  $\beta$ -caroteno y las nanopartículas pentagonales sintetizadas con catequina.

Como consecuencia de la reactividad de las nanopartículas de plata con el cianuro se obtuvieron estructuras en forma de varilla con quercetina y ácido gálico y estructuras *cookie-like* (Huang y Xu, 2010) en las nanopartículas obtenidas con escopoletina. Estas nanopartículas *cookie-like* también se han apreciado en el caso de las sintetizadas con el té de *M. longifolia* L., apareciendo además estructuras en forma de hoja de helecho (Liang *et al.*, 2017) bien definidas y formadas por las nanopartículas agregadas.

Esta tesis doctoral versa sobre la especie *M. longifolia* L. que está menos estudiada que otras especies del género *Mentha* y que tiene la ventaja de su gran adaptabilidad, teniendo una gran tolerancia a diversos hábitats. Esta especie, hasta ahora, no se ha utilizado a gran escala (Patonay y Nemeth-Zaborine, 2021). Sin embargo, parece ser un aditivo económico y de utilidad en numerosos productos. Una aplicación prometedora puede ser el uso del té de *M. longifolia* L. en la industria alimentaria, la utilización de los volátiles de quimiotipos seleccionados de *M. longifolia* L., como el utilizado en este estudio, en el biocontrol de fitopatógenos. Otra alternativa puede ser la utilización del té de *M. longifolia* L. en la síntesis verde de nanopartículas.

# ***CONCLUSIONES***



## CONCLUSIONES

1. La muestra analizada de *Mentha longifolia* L. presenta menor actividad antioxidante que la muestra de *Mentha piperita* L.
2. Los compuestos fenólicos y, sobre todo los flavonoides, son responsables de parte de esta capacidad antioxidante de la muestra de *M. longifolia* L. tal y como se ha observado mediante el análisis del espectro UV-Vis, los tests fitoquímicos y la valoración de compuestos fenólicos totales (mediante el método de Folin-Ciocalteu) y de flavonoides (mediante el método espectrofotométrico).
3. Mediante el análisis GC-TOF se han identificado como componentes mayoritarios de la muestra de *M. longifolia* L. el fenilacetaldehído, la mentofuranona y el DDMP. Los dos primeros podrían proporcionar al extracto de la muestra de *M. longifolia* L. actividad antifúngica, mientras que el DDMP participaría también en la actividad antioxidante.
4. La infusión de *M. longifolia* L. actúa como conservante de aceituna mediante inmersión con efecto fungistático del hongo *C. gloeosporioides* (patógeno responsable de la antracnosis del olivo, aceituna jabonosa) obteniéndose un aceite aromático.
5. Es posible la elicitación abiótica con NaCl y biótica con *T. harzianum* de las plantas de *M. longifolia* L., obteniéndose, sobre todo, óxido de piperitona (1.2 epoxy-p-menthan-3-one) con propiedades antifúngicas.

6. También se elicitaron en las plantas de *M. longifolia* L. cultivadas con *T. harzianum*: Borneol, 1,2Cyclopentanedione, P-Menthan-1,8-dien-3-one, 2-pinen-4-one, Mento furanona, 2-ally-4-methylphenol, Phenol, p-cymen-2-ol y Dietil phtalate. Entre ellos, el borneol, la mento furanona, y el p-cymen-2-ol con actividad antifúngica.
7. Los compuestos orgánicos volátiles del extracto acuoso de las plantas de *M. longifolia* L. que han sido elicitados mediante el tratamiento biótico con *T. harzianum* muestran un potente efecto fungistático del hongo *C. gloeosporioides*.
8. *M. longifolia* L. ha mostrado que es una especie de interés en la industria agroalimentaria, apta para su cultivo en zonas áridas o salinas y útil en la conservación de alimentos.
9. Se ha conseguido sintetizar AgNPs mediante síntesis verde a partir de extractos vegetales acuosos de dos especies de menta (*Mentha longifolia* L. y *Mentha piperita* L.). La presencia de componentes biológicamente activos permite la reducción del nitrato de plata a nanopartículas metálicas.
10. Las AgNPS obtenidas con el extracto acuoso de *M. longifolia* L. tienen un tamaño medio de 42 nm en una concentración calculada para ese tamaño de 3.61 nM. Son partículas semiesféricas-ovaladas con metabolitos adsorbidos en la superficie. Estas NPs reaccionan con cianuro observándose estructuras con forma de hoja de helecho y filamentos.

11. Las AgNPS obtenidas con el extracto acuoso de *M. piperita* L. tienen un tamaño medio de 27 nm en una concentración calculada para ese tamaño de 3.85 nM. Son partículas semiesféricas-ovaladas con metabolitos adsorbidos en la superficie. Estas NPs reaccionan con cianuro observándose estructuras espinosas tridimensionales.
12. Se han sintetizado nanopartículas de plata utilizando extractos de plantas sintéticos: quercetina,  $\beta$ -caroteno, ácido gálico, ácido ascórbico, ácido hidroxibenzoico, ácido cafeico, catequina y escopoletina, que mostraron diferentes capacidades de síntesis, diferentes formas y tamaños, y diferentes agregaciones y presencia en la superficie de las nanopartículas.
13. Entre los resultados, destacan las estructuras micelares obtenidas con quercetina, las nanopartículas triangulares y las formas poliédricas, ambas con esquinas truncadas sintetizadas con  $\beta$ -caroteno y las nanopartículas pentagonales sintetizadas con catequina.
14. La reactividad de las nanopartículas, medida frente a cianuro, fue diferente y se asociada a las características físico-químicas de las distintas nanopartículas sintetizadas. Se observaron diferencias de reactividad entre las nanopartículas sintetizadas, desde el nivel mínimo detectado para las nanopartículas sintetizadas con ácido hidroxibenzoico hasta las nanopartículas más reactivas sintetizadas con ácido ascórbico.

15. Este estudio sobre el papel de cada uno de estos metabolitos en la síntesis de nanopartículas de plata es un primer paso para optimizar la metodología de síntesis verde.
  
16. Se han demostrado dos posibles usos alternativos a los tradicionales para *M. longifolia* L.: en la industria alimentaria, concretamente en el biocontrol de fitopatógenos y en la síntesis verde de nanopartículas metálicas.

# ***BIBLIOGRAFÍA***



## REFERENCIAS

- Ab Razak, N. H., Nik Malek, N. A. N., Matmin, J., Wan Dagang, W. R. Z., Zawawi, N. A., & Chundawat, T. S. (2021). Brief Review on Bioresources Green Synthesis of Silver Nanoparticles. *Journal of Advanced Research in Materials Science*, 79(1). <https://doi.org/10.37934/arms.79.1.110>
- Abdelghany, T.M.; Al-Rajhi, A.M.H.; Al Abboud, M.A.; AlAwlaqi, M.M.; Magdah, A.G.; Helmy, E.A.M.; Mabrouk, A.S. (2018). Recent Advances in Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Applications: About Future Directions. A Review. *BioNanoScience*, 8: 5–16.
- Abukakar, M. G., Ukwuani, A. N., & Shehu, R. A. (2008). Phytochemical screening and antibacterial activity of *Tamarindus indica* pulp extract. *Asian Journal of Biochemistry*, 3, 134-138. [Http://dx.doi.org/ 10.3923](http://dx.doi.org/10.3923)
- Adham, A. N. (2015). Comparative extraction methods, phytochemical constituents, fluorescence analysis and HPLC validation of rosmarinic acid content in *Mentha piperita*, *Mentha longifolia* and *Osimum basilicum*. *J. Pharmacogn. Phytochem*, 3(6): 130-139.
- Ahmad N., Fazal H., Ahmad I., Abbasi B.H. (2012): Free radical scavenging (DPPH) potential in nine *Mentha* species. *Toxicology and Industrial Health*, 28: 83–89.
- Ahmad, P.; Jaleel, C.A.; Salem, M.A.; Nabi, G.; Sharma, S. (2010). Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 30: 161–175.
- Ahmed M, Peiwen Q, Gu Z, Liu Y, Sikandar A, Hussain D, Javeed A, Shafi J, Iqbal M, An R, Guo H, Du Y, Wang W, Zhang Y, Ji M (2020) Insecticidal activity and biochemical composition of *Citrullus colocynthis*, *Cannabis indica* and *Artemisia argyi* extracts against cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae* L.). *Sci Rep* 10.
- Ajila, C. M., Naidu, K. A., Bhat, S. G., & Rao, U. P. (2007). Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. *Food chemistry*, 105(3): 982-988.
- Ajitha, B., Reddy, Y. A. K., Lee, Y., Kim, M. J., & Ahn, C. W. (2019). Biomimetic synthesis of silver nanoparticles using *Syzygium aromaticum* (clove) extract: Catalytic and antimicrobial effects. *Applied Organometallic Chemistry*, 33(5), e4867.

- Akintelu, S. A., Bo, Y., & Folorunso, A. S. (2020). A Review on Synthesis, Optimization, Mechanism, Characterization, and Antibacterial Application of Silver Nanoparticles Synthesized from Plants. *Journal of Chemistry*, 2020, 1–12.
- Alabouvette, C., Olivain, C., & Steinberg, C. (2006). Biological control of plant diseases: the European situation. *European journal of plant pathology*, 114(3), 329-341.
- Albayrak S., Aksoy A., Albayrak S., Sağdıç O. (2013): *In vitro* antioxidant and antimicrobial activity of some Lamiaceae species. *Iranian Journal of Science and Technology Transaction A-Science*, 1: 1–9
- Ali, M. S., Saleem, M., Ahmad, W., Parvez, M., & Yarudani, R. (2002). A chlorinated monoterpene ketone, acylated glycosides of beta-sitosterol and a flavonoid glycoside of *Mentha longifolia*. *Phytochemistry*, 59: 889-895.
- Almeida Jvd. (1899). *La gaffa des olives en Portugal*. *Bulletin de la Societe' Mycologique de France; Tome XV, fasc 2: 90.*
- Al-Ali, K. H., El-Beshbishy, H. A., Alghaithy, A. A., Abdallah, H., El-Badry, A. A., & Abdel-Sattar, E. (2013). *In vitro* antioxidant potential and antiprotozoal activity of methanolic extract of *Mentha longifolia* and *Origanum syriacum*. *Journal of biological sciences*, 13(4), 207.
- Al-Khalifah, N. S., Askari, E., & El-Kholy, M. (2012). Following olive footprints in Saudi Arabia. *Following olive footprints (Olea europea L.) cultivation and culture, Folklore and History, Traditions and Uses. Aarinena, IOC, and ISHS (Scripta Horticulturae N. 13).*
- Al-Ruqaie, I., Al-Khalifah, N. S., & Shanavaskhan, A. E. (2016). Morphological cladistic analysis of eight popular Olive (*Olea europaea L.*) cultivars grown in Saudi Arabia using Numerical Taxonomic System for personal computer to detect phyletic relationship and their proximate fruit composition. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(1): 115-121.
- Al-Sarar, A. S., Hussein, H. I., Abobakr, Y., Bayoumi, A. E., & Al-Otaibi, M. T. (2014). Fumigant toxicity and antiacetylcholinesterase activity of Saudi *Mentha longifolia* and *Lavandula dentata* species against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Turkish journal of entomology*, 38(1): 11-18.

- Al-Taie, S. S. K., & Al-Kenane, N. F. M. (2020). *Study Biochemistry of Mentha longifolia (L.) Huds.: A Review. Herbs and Spices, 27.*
- Al-Zahrani, S., Astudillo-Calderón, S., Pintos, B., Pérez-Urria, E., Manzanera, J. A., Martín, L., & Gomez-Garay, A. (2021). *Role of Synthetic Plant Extracts on the Production of Silver-Derived Nanoparticles. Plants, 10(8): 1671.*
- Alsherif, E.A. (2019). *Ecological Studies of Commiphora Genus (Myrrha) in Makkah Region, Saudi Arabia. Heliyon, 5, e01615.*
- Amato, A., Liotta, R., & Mulè, F. (2014). *Effects of menthol on circular smooth muscle of human colon: analysis of the mechanism of action. European journal of pharmacology, 740, 295-301.*
- Amini, S.M. (2019). *Preparation of antimicrobial metallic nanoparticles with bioactive compounds. Mater. Sci. Eng. C, 103, 109809*
- Amiri, A., Dugas, R., Pichot, A.L., Bompeix, G., (2008). *In vitro and in vitro activity of eugenol oil (Eugenia caryophyllata) against four important postharvest apple pathogens. International Journal of Food Microbiology 126: 13–19.*
- Andrés, F. (1991). *Enfermedades y plagas del olivo. 2ª Ed. Riquelme y Vargas Ediciones, S.L., Jaén.*
- Anukiruthika, T., Priyanka, S., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2020). *En: S. Ahmed, W. Ali, Editors. Characterisation of Green Nanomaterials. Green Nanomaterials. 43-79. Springer. Singapore.*
- Anwar, F., Abbas, A., Mehmood, T., Gilani, A. H., & Rehman, N. U. (2019). *Mentha: A genus rich in vital nutra-pharmaceuticals—A review. Phytotherapy Research, 33(10), 2548-2570.*
- Anwar, F., Alkharfy, K. M., Najeeb-ur-Rehman, Adam, E. H. K., & Gilani, A. U. H. (2017). *Chemo-geographical variations in the composition of volatiles and the biological attributes of Mentha longifolia (L.) essential oils from Saudi Arabia. International Journal of Pharmacology, 13(5): 408-424.*
- Ardianrama, A., Wijaya, Y., Hur, S., Woo, H., Kim, M. (2019). *Reshaping of triangular silver nanoplates by a non-halide etchant and its applications in melamine sensing. Journal of Colloid and Interface Science 552: 485-493.*

- Asekun, O. T., Grierson, D. S., & Afolayan, A. J. (2007). *Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of Mentha longifolia L. subsp. Capensis. Food chemistry, 101(3): 995-998.*
- Ashraf, M., & Orooj, A. (2006). *Salt stress effects on growth, ion accumulation and seed oil concentration in an arid zone traditional medicinal plant ajwain (Trachyspermum ammi [L.] Sprague). Journal of Arid Environments, 64(2): 209-220.*
- Ataide, J. O., Holtz, F. G., Huver, A. H., Zago, H. B., Menini, L., Santos, H. J. G. S. J., & Deolindo, F. D. (2020). *Toxicidade de Rosmarinus officinalis, Myrocarpus frondosus, Citrus limonum e Mentha piperita sobre pragas de grãos armazenados. Brazilian Journal of Development, 6(3): 12827-12840.*
- Ávalos, A., & Pérez-Urrial, E. (2011). *Metabolismo secundario de plantas. Reduca (biología), 2(3).*
- Bahadori, M. B., Zengin, G., Bahadori, S., Dinparast, L., & Movahhedini, N. (2018). *Phenolic composition and functional properties of wild mint (Mentha longifolia var. calliantha (Stapf) Briq.). International journal of food properties, 21(1): 183-193.*
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006): *Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry, 99: 191–203.*
- Baliga, M. S., & Rao, S. (2010). *Radioprotective potential of mint: a brief review. Journal of cancer research and therapeutics, 6(3): 255.*
- Bandar H, Hijazi A, Rammal H, Hachem A, Saad Z, Badran B (2013) *Techniques for the extraction of bioactive compounds from Lebanese Urtica Dioica. Am J Phytomed Clin Ther 6:507–513.*
- Baraton, M. I., & Merhari, L. (2007). *Dual contribution of FTIR spectroscopy to nanoparticles characterization: surface chemistry and electrical properties. In Nanomaterials Synthesis, Interfacing, and Integrating in Devices, Circuits, and Systems II (Vol. 6768, p. 676806). International Society for Optics and Photonics.*
- Barbalho, S. M., Machado, F. M. V. F., Oshiiwa, M., Abreu, M., Guiger, E. L., Tomazela, P., & Goulart, R. A. (2011). *Investigation of the effects of peppermint (Mentha piperita) on the biochemical and anthropometric profile of university students. Food Science and Technology, 31, 584-588.*

- Baris O, Karaday M, Yanmis M, Gu'venalp Z, Bal T, Gu'llu'ce M (2011) Isolation of 3 flavonoids from *Mentha longifolia* (L) Hudson subsp. *longifolia* and determination of their genotoxic potentials by using the *E coli* WP2 test system. *J Food Sci* 79: T212–T217. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02405.x>
- Barton, K.E.; Boege, K. (2017). *Future directions in the ontogeny of plant defence: Understanding the evolutionary causes and consequences. Ecol. Lett.*, 20: 403–411.
- Bas,er KHC, Ku'rkcu'og'lu M, Demirci B, O'zek T, Tarimcilar G (2012) Essential oils of *Mentha* species from Marmara region of Turkey. *J Essent Oil Res* 24:265–272.
- Bas,er KHC, Ku'rkcu'og'lu M, Tarimcilar G, Kaynak G (1999) Essential oils of *Mentha* species from Northern Turkey. *J Essent Oil Res* 11:579–588.
- Bautista-Baños, S., Garcia-Dominguez, E., Barrera-Necha, L. L., Reyes-Chilpa, R., & Wilson, C. L. (2003). Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and extracts of huamuchil (*Pithecellobium dulce*): action against *Botrytris cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit. *Postharvest biology and technology*, 29(1): 81-92.
- Bedini S, Guarino S, Echeverria MC, Flamini G, Ascrizzi R, Loni A, Conti B (2020). *Allium sativum*, *Rosmarinus officinalis*, and *Salvia officinalis* essential oils: a spiced shield against blowflies. *Insects* 11(3): 143; [https://doi.org/https://doi.org/10.3390/insects11030143](https://doi.org/10.3390/insects11030143)
- Bekhti, H., Boucheffa, Y., Blal, A. A., & Travert, A. (2021). *In situ FTIR investigation of CO<sub>2</sub> adsorption over MgO–Impregnated NaY zeolites. Vibrational Spectroscopy*, 103313.
- Bellia G, Pieroni A. (2015). *Isolated, but transnational: the glocal nature of Waldensian ethnobotany, Western Alps, NW Italy. J Ethnobiol Ethnomed.*; 11(1):37.
- Benabdallah, A.; Rahmoune, C.; Boumendjel, M.; Aissi, O.; Messaoud, C. (2016). Total phenolic content and antioxidant activity of six wild *Mentha* species (Lamiaceae) from northeast of Algeria. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 6, 760–766.
- Bennett, R. N., & Wallsgrove, R. M. (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New phytologist*, 127(4): 617-633.

- Bertoli A, Leonardi M, Krzyzanowska J, Oleszek W, Pistelli L (2011) *Mentha longifolia* in vitro cultures as safe source of 123 Phytochem Rev (2021) 20:631–652 649 flavouring ingredients. *Acta Biochim Pol* 58:581–587. [https://doi.org/10.18388/abp.2011\\_2228](https://doi.org/10.18388/abp.2011_2228)
- Bhatt, R.R.; Shah, B.A. (2015). Sorption studies of heavy metal ions by salicylic acid–formaldehyde–catechol terpolymeric resin: Isotherm, kinetic and thermodynamics. *Arab. J. Chem.*, 8: 414–426.
- Bhattacharya, D. and Gupta, R. (2005). Nanotechnology and potential of microorganisms. *Critical Reviews Biotechnology* 25, 199-204. <https://doi:10.1080/07388550500361994>
- Biswas, S., Koul M., Bhatnager, A.K. (2011). Salinity stress has various effects on the biological and Physiological response of plants such as growth flowering, mineral nutrition and secondary metabolism. *Nat. Prod. Commun.* 6: 1559-1564.
- Blaszczyk T, Krzyzanowska J, Lamer-Zarawska E. (2000). Screening for antimycotic properties of 56 traditional Chinese drugs. *Phytother Res* 14: 210-212
- Bohnert, H. J., & Jensen, R. G. (1996). Strategies for engineering water stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnol*, 14: 89-97.
- Boni, G. C., de Feiria, S. N. B., de Laet Santana, P., Anibal, P. C., Boriollo, M. F. G., Buso-Ramos, M. M., ... & Hofling, J. F. (2016). Antifungal and cytotoxic activity of purified biocomponents as carvone, menthone, menthofuran and pulegone from *Mentha* spp. *African Journal of Plant Science*, 10(10), 203-210.
- Borase, H., Salunke, Borase, B., Salunkhe, Salunke, R., Patil, Salunkhe, C., Hallsworth, Patil, J., Kim, Hallsworth, B., Patil, Kim, S. (2014). Plant Extract. A promising Biomatrix for Eco-friendly, Controlled Synthesis of Silver Nanoparticles. *Applied Biochemistry Biotechnology* 173, 1-29. <https://doi: 10.1007/s12010-014-0831-4>
- Borges Bubols, G.; da Rocha Vianna, D.; Medina-Reyon, A.; von Poser, G.; Maria Lamuela-Raventos, R.; Lucia Eifler-Lima, V.; Cristina Garcia, S. (2003). The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. *Mini Rev. Med. Chem.*, 13: 318–334.
- Bourwieg, D., & Pohl, R. (1973). The flavonoids of *Mentha longifolia*. *Planta Medica* 24: 304–314.

- Boutinguiza, M., Comesaña, R., Lusquiños, F., Riveiro, A., del Val, J., Pou, J. (2015). Production of silver nanoparticles by laser ablation in open air. *Applied Surfaces Science* 336: 108-111.
- Braghiroli, F.L.; Fierro, V.; Szczurek, A.; Gadonneix, P.; Ghanbaja, J.; Parmentier, J.; Medjahdi, G.; Celzard, A. (2017). Hydrothermal Treatment of Tannin: A Route to Porous Metal Oxides and Metal/Carbon Hybrid Materials. *Inorganics*, 5, 7.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1): 25-30.
- Branen, A. L. (1975). Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 52(2): 59-63.
- Brilli, F., Loreto, F., & Baccelli, I. (2019). Exploiting plant volatile organic compounds (VOCs) in agriculture to improve sustainable defense strategies and productivity of crops. *Frontiers in plant science*, 10: 264.
- Bukhari, S.B.; Memon, S.; Mahroof-Tahir, M.; Bhangar, M. (2009). Synthesis, characterization and antioxidant activity copper–quercetin complex. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 71, 1901–1906.
- Burbott, A.J. and Loomis, D. (1969) Evidence for metabolic turnover monoterpene in peppermint. *Plant Physiol.* 44: 173-179.
- Burton, G.; Ingold, K.U. (1984). Beta-Carotene: An unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224, 569–573.
- Cacciola SO, Faedda R, Sinatra F, Agosteo GE, Schena S, Frisullo S, Magnano di San Lio G. (2012). Olive Anthracnose. *J. Plant Pathol.* 94: 29–44.
- Callejas, F.R. (2000). *Tablas de Espectroscopía Infrarroja; Departamento de Física y Química, UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México): Mexico City, Mexico.*
- Carvalho MT, Simoe-Lopes P, Monteiro da Silava MJ. (2008). Influence of different olive infection rates of *Colletotrichum acutatum* on some important olive oil chemical parameters. *Acta Hort.* 791: 555–559.
- Catapano, M. C., Karlíčková, J., Tvrđý, V., Sharma, S., Prasad, A. K., Saso, L., ... & Mladěnka, P. (2018). Mono and dihydroxy coumarin

derivatives: Copper chelation and reduction ability. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 46: 88-95.

Ćavar Zeljković, S., Šišková, J., Komzáková, K., De Diego, N., Kaffková, K., & Tarkowski, P. (2021). Phenolic Compounds and Biological Activity of Selected *Mentha* Species. *Plants*, 10(3), 550.

Čechovská, L., Cejpek, K., Konečný, M., & Velíšek, J. (2011). On the role of 2, 3-dihydro-3, 5-dihydroxy-6-methyl-(4 H)-pyran-4-one in antioxidant capacity of prunes. *European Food Research and Technology*, 233(3): 367-376.

Ceylan, R.; Zengin, G.; Uysal, S.; Ilhan, V.; Aktumsek, A.; Kandemir, A.; Anwar, F. (2015). GC-MS analysis and in vitro antioxidant and enzyme inhibitory activities of essential oil from aerial parts of endemic *Thymus spathulifolius* Hausskn. et Velen. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*, 31: 983–990.

Charles, D. J., Joly, R. J., & Simon, J. E. (1990). Effects of osmotic stress on the essential oil content and composition of peppermint. *Phytochemistry*, 29(9), 2837-2840.

Chen, J. (2005). Assessment of repellency of nine phthalates against red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae) workers using ant digging behavior. *40(4): 368-377.*

Chen, M. Z., Trinnaman, L., Bardsley, K., St Hilaire, C. J., & Da Costa, N. C. (2011). Volatile Compounds and Sensory Analysis of Both Harvests of Double-Cut Yakima Peppermint (*Mentha piperita* L.). *Journal of food science*, 76(7), C1032-C1038.

Chen, P., Yan, S., Sawyer, E., Ying, B., Wei, X., Wu, Z., & Geng, J. (2019). Rapid and simple detection of ascorbic acid and alkaline phosphatase via controlled generation of silver nanoparticles and selective recognition. *Analyst*, 144(4): 1147-1152.

Cholula-Díaz, J. L., Lomelí-Marroquín, D., Pramanick, B., Nieto-Argüello, A., Cantú-Castillo, L. A., & Hwang, H. (2018). Synthesis of colloidal silver nanoparticle clusters and their application in ascorbic acid detection by SERS. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 163: 329-335.

Clark, R. J., & Menary, R. C. (1980). Environmental effects on peppermint (*Mentha piperita* L.). I. Effect of daylength, photon flux density, night

temperature and day temperature on the yield and composition of peppermint oil. *Functional Plant Biology*, 7(6), 685-692.

- Codd, L. E. (1983). Southern African species of *Mentha* L. (Lamiaceae). *Bothalia*, 14(2): 169-175.
- Cohen, S. D., & Kennedy, J. A. (2010). Plant metabolism and the environment: implications for managing phenolics. *Critical reviews in food science and nutrition*, 50(7): 620-643.
- Cuevas-Valenzuela, J., González-Rojas, Á., Wisniak, J., Apelblat, A., & Pérez-Correa, J. R. (2014). Solubility of (+)-catechin in water and water-ethanol mixtures within the temperature range 277.6–331.2 K: Fundamental data to design polyphenol extraction processes. *Fluid Phase Equilibria*, 382: 279-285.
- D'Auria, J. C., & Gershenzon, J. (2005). The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed. *Current opinion in plant biology*, 8(3): 308-316.
- Das, K., Khan, A. A., Gowthami, V., Sharma, V., & Ahmed, S. Y. (2020). Mitigation of dermal auto immune disease through combined action of natural constituents: An advantageous over allopathic medicines. *Annals of Phytomedicine*, 9(1): 162-170.
- De la Rosa, L.A.; Moreno-Escamilla, J.O.; Rodrigo-García, J.; Alvarez-Parrilla, E. (2018). Phenolic compounds. In *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands; pp. 253–271. ISBN 9780128132784.
- De Souza, T.A.J.; Souza, L.R.R.; Franchi, L.P. (2019). Silver nanoparticles: An integrated view of green synthesis methods, transformation in the environment, and toxicity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 171: 691–700.
- Dean R, Van Kan JA, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, et al. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol.*; 13(4):414–30. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Della Pelle, F.; Scroccarello, A.; Sergi, M.; Mascini, M.; Del Carlo, M.; Compagnone, D. (2018). Simple and rapid silver nanoparticles based antioxidant capacity assays: Reactivity study for phenolic compounds. *Food Chem.*, 256: 342–349.

- Di Giovacchino, (2003). *Capítulo 2: Aspectos tecnológicos. pp. 33-77. In Aparicio - Harwood. Manual del aceite de oliva. (Ed.). Editorial A. Madrid Vicente y Mundi Prensa. Madrid, España. 614p*
- Dicke, M.; Baldwin, I.T. (2010). *The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: Beyond the 'cry for help'. Trends Plant Sci., 15: 167–175.*
- Dos Santos Grasel, F., Ferrão, M. F., & Wolf, C. R. (2016). *Ultraviolet spectroscopy and chemometrics for the identification of vegetable tannins. Industrial Crops and Products, 91, 279-285.*
- Doyle, M.P.; Erickson, M.C. (2008). *Summer meeting 2007—The problems with fresh produce: An overview. J. Appl. Microbiol., 105: 317–330.*
- Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C. (2005). *Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. J Ethnopharmacol 97: 350-311*
- Dudai N, Segev D, Havkin-Frenkel D, Eshel A (2006) *Genetic variation of phenolic compounds content, essential oil composition and antioxidative activity in Israel-grown Mentha longifolia L. Acta Horti 709:69–78. <https://doi.org/10.17660/ActaHort.2006.709.8>*
- Džamić, A. M., Soković, M. D., Ristić, M. S., Novaković, M., Grujić-Jovanović, S., Tešević, V., & Marin, P. D. (2010). *Antifungal and antioxidant activity of Mentha longifolia (L.) Hudson (Lamiaceae) essential oil. Botanica serbica, 34(1): 57-61.*
- Ed-Dra, A.; Filai, F.R.; Bou-Idra, M.; Zekkori, B.; Bouymajane, A.; Moukrad, N.; Benhallam, F.; Bentayeb, A. (2018). *Application of mentha suaveolens essential oil as an antimicrobial agent in fresh turkey sausages. J. Appl Biol & Biotechnol, 6: 7–12.*
- Edreva, A., Velikova, V., Tsonev, T., Dagnon, S., Gürel, A., Aktaş, L., & Gesheva, E. (2008). *Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. Gen Appl Plant Physiol, 34(1-2): 67-78.*
- Egorova, E.; Revina, A. (2000). *Synthesis of metallic nanoparticles in reverse micelles in the presence of quercetin. Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp., 168, 87–96.*
- Ehsani A, Mahmoudi R (2012). *Effects of Mentha longifolia L. essential oil and Lactobacillus casei on the organoleptic properties and on the*

*growth of Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes during manufacturing, ripening and storage of Iranian white-brined cheese. Int J Dairy Technol* 66:70–76. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2012.00865.x>

Eissa, T.F.; González-Burgos, E.; Carretero, M.E.; Gómez-Serranillos, M.P. (2014). *Compositional analysis and in vitro protective activity against oxidative stress of essential oils from egyptian plants used in traditional medicine. Nat. Prod. Commun.*, 9, 1377–1382.

El Ghaouth, A., Arul, J., Wilson, C., & Benhamou, N. (1997). *Biochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and Botrytis cinerea in bell pepper fruit. Postharvest Biology and Technology*, 12(2): 183-194.

Elansary, H. O.; Mahmoud, E. A. (2015). *Egyptian Herbal Tea Infusions' Antioxidants and Their Antiproliferative and Cytotoxic Activities against Cancer Cells. Natural product research*, 29(5): 474–479

Elechiguerra, J.L.; Reyes-Gasga, J.; Yacaman, M.J. (2006). *The role of twinning in shape evolution of anisotropic noble metal nanostructures. J. Mater. Chem.*, 16: 3906–3919.

European Commision. (2018). Available online: <https://ec.europa.eu/programmes/horizon2020/en/h2020-section/nanotechnologies> (accessed on 8 May 2021).

Fabricant, D. S., & Farnsworth, N. R. (2001). *The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. Environmental health perspectives*, 109(suppl 1), 69-75.

Fakir, H., Us, A. A., Sagdic, M., & Tornuk, F. (2015). *Essential oil composition, antimicrobial and bioactive properties of Origanum hypericifolium, an endemic plant species grown in Turkey. Research Journal of Biotechnology Vol*, 10: 11.

Farr DF, Rossman, AY. (2013). *Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/. Consultado (20/11/2013)*

Farzaei MH, Bahramsoltani R, Ghobadi A, Najafi F. (2017). *Pharmacological activity of Mentha longifolia and its phytoconstituents. J Tradit Chin Med (JTCM)* 37:710–720.

- Ferrari, S. (2010). *Biological elicitors of plant secondary metabolites: Mode of action and use in the production of nutraceuticals*. In *Bio-Farms for Nutraceuticals* (pp. 152-166). Springer, Boston, MA.
- Franz, X. S. (2001). *Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry*. *Encyclopedia of life sciences*.
- Franzios, G., Mirotsou, M., Hatziapostolou, E., Kral, J., Scouras, Z. G., & Mavragani-Tsipidou, P. (1997). *Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7): 2690-2694.
- Freisesleben, S. H., & Jager, A. K. (2014). *Correlation between plant secondary metabolites and their antifungal mechanism—a review*. *Med. Arom. Plants*, 3: 1-6.
- Food 2030 Platform. <https://fit4food2030.eu/food2030platform/>
- García, F. (1995). *Micoflora asociada a la aceituna. Su repercusión en la calidad del aceite*. *Agricultura 760*: 931–933.
- García, F. (1998). *Micosis de las aceitunas y su incidencia en la calidad del aceite*. *Phytoma España 102*: 171–175.
- García F. Duatis JJ, Marco V, Pedret E. (1997). *Influencia de los ataques fúngicos en la pérdida de calidad del aceite de oliva*. *Frut. Profesional 88*: 131–135.
- Geoprincy, G.; Srri, B.V.; Poonguzhali, U.; Gandhi, N.N.; Renganathan, S. (2013). *A review on green synthesis of silver nanoparticles*. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 6: 8–12.
- Gerber, D. W., Byerrum, R. U., Gee, R. W., & Tolbert, N. E. (1988). *Glycerol concentrations in crop plants*. *Plant Science*, 56(1), 31-38.
- Ghasemzadeh, A., & Jaafar, H. Z. (2012). *Effect of salicylic acid application on biochemical changes in ginger (Zingiber officinale Roscoe)*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(5): 790-795.
- Ghotekar S (2019). *Plant extract mediated biosynthesis of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles- a review on plant parts involved, characterization and applications*. *Nanochem Res*; 4(2):163-169.
- Ghoulami S, Il-Idrissi A, Fkih-Tetouani S (2001) *Phytochemical study of Mentha longifolia of Morocco*. *Fitoterapia 72*:596–598. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.061>

- Gobert, V., Moja, S., Colson, M., & Taberlet, P. (2002). Hybridization in the section *Mentha* (Lamiaceae) inferred from AFLP markers. *American Journal of Botany*, 89(12): 2017-2023.
- Godlewska, K., Ronga, D., & Michalak, I. (2021). Plant extracts-importance in sustainable agriculture. *Italian Journal of Agronomy*, 16(2).
- Goldstein, W.S.; Spencer, K.C. (1985). Inhibition of Cyanogenesis by tannins. *J. Chem. Ecol.*, 11: 847–858.
- Gonçalves R.S., Battistin A., Pauletti G., Rota L., Serafini L.A. (2009): Antioxidant properties of essential oils from *Mentha* species evidenced by electrochemical methods. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 11: 372–382.
- González-Lamothe R, Mitchell G, Gattuso M, Diarra MS, Malouin F, Bouarab K (2009) Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. *Int J Mol Sci* 10:3400–3419. <https://doi.org/10.3390/ijms10083400>
- Graniti A, Frisullo S, Penissi A, Magnano, L. (1993). Infections of *Glomerella cingulata* on olive in Italy. *EPPO Bull.* 23: 457–465.
- Grice HC. (1988). Safety evaluation of butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastrointestinal tract. *Food Chem. Toxicol.* 24: 1127-1130.
- Grigoleit, H.-G.; Grigoleit, P. (2005). Pharmacology and preclinical pharmacokinetics of peppermint oil. *Phytomedicine*, 12, 612–616.
- Guerin JC, Reveillere HP. (1985). Antifungal activity of plant extracts used in therapy. II. Study of 40 plant extracts against 9 fungal species. [French]. *Ann Pharm Fr* 43: 77-81
- Gulcin, I. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Arch. Toxicol.*, 94: 651–715.
- Gülçin, I. (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217: 213–220.
- Gulluce M, Sahin F, Sokmen M, Ozer H, Daferera D, Sokmen A, Polissiou M, Adiguzel A, Ozkan H (2007) Antimicrobial and antioxidant properties of essential oils and methanolic extract from *Mentha longifolia* ssp. *longifolia*. *Food Chem* 103:1449–1456. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.061>

- Guo, D.; Dou, D.; Ge, L.; Huang, Z.; Wang, L.; Gu, N. (2015). A caffeic acid mediated facile synthesis of silver nanoparticles with powerful anti-cancer activity. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 134, 229–234
- Guo, J. J., Gao, Z. P., Xia, J. L., Ritenour, M. A., Li, G. Y., & Shan, Y. (2018). Comparative analysis of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of citrus essential oils from the main cultivated varieties in China. *Lwt*, 97: 825-839.
- Gusrizal, G.; Santosa, S.J.; Kunarti, E.S.; Rusdiarso, B. (2017). Synthesis of Silver Nanoparticles by Reduction of Silver Ion with m-Hydroxybenzoic Acid. *Asian J. Chem.*, 29: 1417–1422.
- Hadwiger, L. A., & Beckman, J. M. (1980). Chitosan as a component of pea-*Fusarium solani* interactions. *Plant Physiology*, 66(2), 205-211.
- Hajizadeh, S.; Farhadi, K.; Forough, M.; Sabzi, R.E. (2011). Silver nanoparticles as a cyanide colorimetric sensor in aqueous media. *Anal. Methods*, 3: 2599–2603
- Hajlaoui H, Trabelsi N, Noumi E, Snoussi M, Fallah H, Ksouri R, Bakhrouf A (2009) Biological activities of the essential oils and methanol extract of two cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine. *World J Microbiol Biotechnol* 25:2227–2238. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0130-3>
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (2007) *Free radicals in biology and medicine*. 4th Edition, Oxford University Press, New York.
- Hammad, A.H.; Abdel-Wahab MS, H.; Alshahrie, A. (2016). Structural and morphological properties of sputtered silver oxide thin films: The effect of thin film thickness. *Dig. J. Nanomater. Bios.*, 11: 1245–1252.
- Handa, S. S. (2008). An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*, 1, 21-40.
- Harborne, J. B. (1973). Phenolic compounds. In *Phytochemical methods* (pp. 33-88). Springer, Dordrecht.
- Harley, R. M., & Brighton, C. A. (1977). Chromosome numbers in the genus *Mentha* L. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 74(1), 71-96.
- Hasan, A., M., Khan, M., Ahmad (2007): Authenticity of folk medicinal plants of Pakistan. *Taxonomic and Chemical Methods*, 1: 3-4.

- Hawrył, M. A., Niemiec, M., Słomka, K., Waksmundzka-Hajnos, M., & Szymczak, G. (2016). *Micro-2D-TLC Separation of phenolics in some species of mint and their fingerprints on diol bonded polar stationary phase. Acta Chromatographica, 28(1): 119-127.*
- Hayat, K., Zhang, X., Chen, H., Xia, S., Jia, C., & Zhong, F. (2010). *Liberation and separation of phenolic compounds from citrus mandarin peels by microwave heating and its effect on antioxidant activity. Separation and Purification Technology, 73(3), 371-376.*
- Herrera, C.M. (2009). *Multiplicity in Unity: Plant Subindividual Variation & Interactions with Animals; University of Chicago Press: Chicago, IL, USA; pp. 1-437.*
- Heuer, B., Yaniv, Z., & Ravina, I. (2002). *Effect of late salinization of chia (Salvia hispanica), stock (Matthiola tricuspidata) and evening primrose (Oenothera biennis) on their oil content and quality. Industrial Crops and Products, 15(2): 163-167.*
- Horiuchi, S.; Tachibana, Y.; Yamashita, M.; Yamamoto, K.; Masai, K.; Takase, K.; Matsutani, T.; Kawamata, S.; Kurashige, Y.; Yanai, T.; et al. (2015). *Multinuclear metal-binding ability of a carotene. Nat. Commun., 6, 6742.*
- Huang, T.; Xu, X.-H.N. (2010). *Synthesis and characterization of tunable rainbow colored colloidal silver nanoparticles using singlenanoparticle plasmonic microscopy and spectroscopy. J. Mater. Chem., 20: 9867-9876.*
- Husen, A., & Siddiqi, K. S. (2014). *Phytosynthesis of nanoparticles: concept, controversy and application. Nanoscale Research Letters, 9(1).*
- Iannotta I, Perri E, Siriani R, Tocci C. (1999). *Influence of Colletotrichum gloeosporioides (Penzing) and Camarosporium dalmatica (Thum) attacks on olive oil quality. Acta Hort. 474: 399-401.*
- Ibrahim, M. H., & Jaafar, H. Z. (2011). *Involvement of carbohydrate, protein and phenylalanine ammonia lyase in up-regulation of secondary metabolites in Labisia pumila under various CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> level. Molecules, 16(5): 4172-4190.*
- Idrissi AI, Fkih-Tetouani S. (2001). *Phytochemical study of Mentha longifolia of Morocco. Fitoterapia.; 72(5):596-598.*

- Imali A. Mudunkotuwa, Alaa Al Minshid and Vicki H. (2014). *Grassian, ATR-FTIR Spectroscopy as a Tool to Probe Surface Adsorption on Nanoparticles at the Liquid–Solid Interface in Environmentally and Biologically Relevant Media*, *Analyst*, 139, 870
- International Olive Oil Council (2021). <https://www.internationaloliveoil.org/wpcontent/uploads/2020/12/HO-W901-23-11-2020-P.pdf>. Retrieved December 8, 2021.
- IPBES/6/15. *Plenario de la Plataforma Intergubernamental Científico-normativa sobre Diversidad Biológica y Servicios de los Ecosistemas. Medellín (Colombia), 18 a 24 de marzo de 2018.*
- Iqbal T, Hussain AI., Shahid Chatha SA, Naqvi SAR, Hussain Bokhari T (2013) *Antioxidant activity and volatile and phenolic profiles of essential oil and different extracts of wild mint (Mentha longifolia) from the Pakistani flora. J Anal Meth Chem 2013, Article ID 536490. https://doi.org/10.1155/2013/536490*
- Iravani, S. (2011). *Green synthesis of metal nanoparticles using plants. Green Chem., 13: 2638–2650.*
- Irudayaraj, J.M. (2012). *Biomedical Nanosensors; Pan Stanford: Boca Raton, FL, USA.*
- İşcan, G., Kirimer, N., Kürkcüoğlu, M., Başer, H. C., & Demirci, F. (2002). *Antimicrobial screening of Mentha piperita essential oils. Journal of agricultural and food chemistry, 50(14): 3943-3946.*
- Ito, N., Fukushima, S., Haqlwara, A., Shibata, M., & Ogiso, T. (1983). *Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. Journal of the National Cancer Institute, 70(2): 343-352.*
- Iula, G., Miras-Moreno, B., Lucini, L., & Trevisan, M. (2021). *The Mycorrhiza-and Trichoderma-Mediated Elicitation of Secondary Metabolism and Modulation of Phytohormone Profile in Tomato Plants. Horticulturae, 7(10): 394.*
- Jadoun, S., Arif, R., Jangid, N. K., & Meena, R. K. (2021). *Green synthesis of nanoparticles using plant extracts: A review. Environmental Chemistry Letters, 19(1): 355-374.*

- Jahan, N., Malik, A. & Muhammad, P. (2001). New flavonoid from *Mentha longifolia*. *Heterocycles* 55: 1951–1956. <https://doi.org/10.3987/COM-01-9281>
- Janků, M.; Luhová, L.; Petřivalský, M. (2019). On the Origin and Fate of Reactive Oxygen Species in Plant Cell Compartments. *Antioxidants*, 8: 105.
- Javed, B., & Mashwani, Z. U. R. (2020). Phytosynthesis of colloidal nanosilver from *Mentha longifolia* and *Mentha arvensis*: Comparative morphological and optical characterization. *Microscopy Research and Technique*, 83(11): 1299-1307.
- Javed B, Mashwani Z-R, Sarwer A, Raja NI, Nadhman A (2020a) Synergistic response of physicochemical reaction parameters on biogenesis of silver nanoparticles and their action against colon cancer and leishmanial cells. *Artif Cells, Nanomed, Biotechnol* 48:1340–1353. <https://doi.org/10.1080/21691401.2020.1850467>
- Javed B, Nadhman A, Mashwani Z-R (2020b) Optimization, characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles against plant bacterial pathogens phyto-synthesized by *Mentha longifolia*. *Mater Res Express* 7:085406. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/abaf19>
- Javed, B., Nadhman, A., & Mashwani, Z. U. R. (2020c). Phytosynthesis of Ag nanoparticles from *Mentha longifolia*: their structural evaluation and therapeutic potential against HCT116 colon cancer, Leishmanial and bacterial cells. *Applied Nanoscience*, 10(9), 3503–3515. <https://doi.org/10.1007/s13204-020-01428-5>
- Javed, B., Nadhman, A., & Razzaq, A. (2020d). One-pot phytosynthesis of nano-silver from *Mentha longifolia* L.: their characterization and evaluation of photodynamic potential. *Materials Research Express*, 7(5), 055401.
- JECFA (2002). Safety evaluation of certain food additives and contaminants prepared by the fifty-seventh meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Food Additives Series No. 48.
- JECFA (2011). Safety evaluation of certain food additives and contaminants prepared by the seventy-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Food Additives Series No. 64.

- Jiménez B., Carpio A., Dueñas. (2002). *La cata de aceites: aceite de oliva virgen. Características organolépticas y análisis sensorial. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía.*
- Jørgensen, K.; Rasmussen, A.V.; Morant, M.; Nielsen, A.H.; Bjarnholt, N.; Zagrobelny, M.; Bak, S.; Møller, B.L. (2005). *Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. Curr. Opin. Plant Biol., 8, 280–291.*
- Jurasekova, Z.; Domingo, C.; García-Ramos, J.V.; Sánchez-Cortés, S. (2014). *Effect of pH on the chemical modification of quercetin and structurally related flavonoids characterized by optical (UV-visible and Raman) spectroscopy. Phys. Chem. Chem. Phys., 16: 12802–12811.*
- Kaefer C.M., Milner J.A. (2008): *The role of herbs and spices in cancer prevention. Journal of Nutritional Biochemistry, 19: 347–361*
- Kalaki, Z. A., Safaeijavan, R., & Ortakand, M. M. (2017). *Biosynthesis of silver nanoparticles using Mentha longifolia (L.) hudson leaf extract and study its antibacterial activity. Archives of Advances in Biosciences, 8(2): 24-30.*
- Kalishwaralal, K.; Deepak, V.; Pandian, S.R.K.; Kottaisamy, M.; BarathManiKanth, S.; Kartikeyan, B.; Gurunathan, S. (2010). *Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using Brevibacterium casei. Colloids Surfaces B Biointerfaces, 77, 257–262.*
- Kalita S, Hazarika LK (2018) *Safety of Chromolaena odorata (Asteraceae) leaf extracts against Trichogramma japonicum Ashmead. Ann Pl Protec Sci 26(2):276–280*
- Kalua C, Allen M, Bedgood D Jr, Bishop A, Prezler PD, Robards K. (2007). *Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. Food Chem.; 100(1):273–86. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.059>*
- Karak, P. (2019). *Biological activities of flavonoids: an overview. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 10(4): 1567-1574.*
- Karashima, Y., Damann, N., Prenen, J., Talavera, K., Segal, A., Voets, T., & Nilius, B. (2007). *Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1. Journal of Neuroscience, 27(37), 9874-9884.*

- Karray-Bouraoui, N., Rabhi, M., Neffati, M., Baldan, B., Ranieri, A., Marzouk, B., ... & Smaoui, A. (2009). Salt effect on yield and composition of shoot essential oil and trichome morphology and density on leaves of *Mentha pulegium*. *Industrial Crops and Products*, 30(3): 338-343.
- Kasote, D.; Katyare, S.S.; Hegde, M.V.; Bae, H. (2015). Significance of Antioxidant Potential of Plants and its Relevance to Therapeutic Applications. *Int. J. Biol. Sci.*, 11, 982–991.
- Katalinic, V.; Milos, M.; Modun, D.; Musić, I.; Boban, M. (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chem.* 86: 593–600.
- Kaur N, Kumar A, Kaur K, Gupta AK, Singh I. (2014). DPPH radical scavenging activity and contents of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, malondialdehyde and proline in determining salinity tolerance in chickpea seedlings. *Indian J Biochem Biophys.* Oct; 51(5):407-15.
- Kedziora, A.; Speruda, M.; Krzyżewska, E.; Rybka, J.; Łukowiak, A.; Bugla-Płoskon´ska, G. (2018). Similarities and Differences between Silver Ions and Silver in Nanofoms as Antibacterial Agents. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 444.
- Kessler, A.; Kalske, A. (2018). Plant Secondary Metabolite Diversity and Species Interactions. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 49: 115–138.
- Keunen, R.; Cathcart, N.; Kitaev, V. (2014). Plasmon mediated shape and size selective synthesis of icosahedral silver nanoparticles via oxidative etching and their 1-D transformation to pentagonal pins. *Nanoscale*, 6: 8045–8051.
- Khalik, K. A. (2016). A new species of *Plectranthus* (Lamiaceae) from Saudi Arabia. *Turkish Journal of Botany*, 40(5): 506-513.
- Khalik, K.A.; Al-Gohary, I.; Al-Sodany, Y. (2017). Floristic Composition and Vegetation: Environmental Relationships of Wadi Fatimah, Mecca, Saudi Arabia. *Arid L. Res. Manag.*, 31: 316–334.
- Khan, M.; Shaik, M.R.; Adil, S.F.; Khan, S.T.; Al-Warthan, A.; Siddiqui, M.R.H.; Tahir, M.N.; Tremel, W. (2018). Plant extracts as Green reductants for the synthesis of silver nanoparticles: Lessons from chemical synthesis. *Dalton Trans.*, 47: 11988–12010.

- Khatha, P.; Phutthaphongloet, T.; Timpa, P.; Ninwong, B.; Income, K.; Ratnarathorn, N.; Dungchai, W. (2019). *Distance-Based Paper Device Combined with Headspace Extraction for Determination of Cyanide. Sensors*, 19: 2340.
- Kim, D.-Y.; Sung, J.S.; Kim, M.; Ghodake, G. (2015). *Rapid production of silver nanoparticles at large-scale using gallic acid and their antibacterial assessment. Mater. Lett.*, 155: 62–64.
- Kim, K.; Han, J.W. (2016). *Effect of caffeic acid adsorption in controlling the morphology of gold nanoparticles: Role of surface coverage and functional groups. Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18: 27775–27783.
- King A., Young G. (1999): *Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. Journal of the American Dietetic Association*, 99: 213–218.
- Kobashigawa, J., Robles, M. Kobashigawa, C., Ricci, A. Robles, M., Carmarán, L. M. Ricci, C. C. (2018). *Influence of strong bases on the synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using the ligninolytic fungi Trametes trogii. Saudi Journal of Biological Sciences. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.09.006>*
- Kolainis, S., Koletti, A., Lykogianni, M., Karamanou, D., Gkizi, D., Tjamos, S. E., ... & Aliferis, K. A. (2020). *An integrated approach to improve plant protection against olive anthracnose caused by the Colletotrichum acutatum species complex. PloS one*, 15(5), e0233916.
- Konishi, Y., Ohno, Konishi, K., Ohno, Saitoh, N., Nomura, Saitoh, T., Nagamine, Nomura, S., Hishida, Nagamine, H., Takahashi, Hishida, Y., Takahashi, Uruga, T. (2007). *Bioreductive deposition of platinum nanoparticles on the bacterium Shewanella algae. Journal of Biotechnology* 128, 648-653. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.11.014>
- Korkmaz, N.; Karadağ, A. (2021). *Microwave Assisted Green Synthesis of Ag, Ag<sub>2</sub>O, and Ag<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanoparticles. J. Turk. Chem. Soc. Sect. A Chem.*, 8: 585–592.
- Krishtalik, L.I. (2003). *pH-dependent redox potential: How to use it correctly in the activation energy analysis. Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenerg.*, 1604: 13–21.
- Krzyzanowska J, Janda B, Pecio L, Stochmal A, Oleszek W (2011) *Determination of polyphenols in Mentha longifolia and M. piperita*

*field-grown and in vitro plant samples using UPLC-TQ-MS. J AOAC Int* 94:43–50.

Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., & Abdelly, C. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(3-4): 244-249.

Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M., ... & Grigoriev, I. V. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome biology*, 12(4), 1-15.

Kuhnau J. (1976). The flavonoids. A class of semiessential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet*; 24: 117-191.

Kumar, A., & Kudachikar, V. B. (2019). Development, characterisation and efficacy evaluation of biochemical fungicidal formulations for postharvest control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) disease in mango. *Journal of microencapsulation*, 36(1): 83-95.

Kumar, A., Srivastava, R., Singh, P., Bahadur, V., Nath, G. (2018). Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cestrum nocturnum*. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine* xxx, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2017.11.003>

Kumar, N.; Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol. Rep.* 24, e00370.

Kumaran, K.T.; Kiruthika, G.V.M.; Arulraj, I.; Ragupathy, P. (2016). Quinone-Wrapped Nanostructured MnO<sub>2</sub>: A Synergetic Approach to Enhanced Supercapacitive Behavior and Magnetic Properties. *J. Electrochem. Soc.*, 163, A1743–A1752

Kutchan, T.M. (2005). A role for intra- and intercellular translocation in natural product biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 8: 292–300.

Lagouri V., Alexandri G. (2013): Antioxidant properties of greek *O. dictamnus* and *R. officinalis* methanol and aqueous extracts – HPLC determination of phenolic acids. *International Journal of Food Properties*, 16: 549–562.

Lang, G., & Buchbauer, G. (2012). A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27(1): 13-39.

- Lawrence B.M. (1992): *Chemical components of Labiatae oils and their exploitation*. In: Harley R.M., Reynolds T. (eds): *Advances in Labiate Science*. Richmond, Royal Botanic Gardens Kew: 399–436.
- Lawrence, B.M. (2006). *Mint. The Genus Mentha*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA; pp: 1–56.
- Lee, S.; Jung, H.J.; Choi, H.C.; Hwang, Y.S.; Choi, M.Y. (2017). *Solvent Acting as a Precursor: Synthesis of AgCN From AgNO<sub>3</sub> in N,N-DMF Solvent by Laser Ablation*. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 38, 136–139.
- Leonti M, Casu L, Sanna F, Bonsignore L. (2008). *A comparison of medicinal plant use in Sardinia and Sicily-De Materia Medica revisited?* *J Ethnopharmacol*;121: 255–67.
- Leonti M. (2011). *The future is written: impact of scripts on the cognition, selection, knowledge and transmission of medicinal plant use and its implications for ethnobotany and ethnopharmacology*. *J Ethnopharmacol.*; 134:542–55.
- Li, D.; Liu, Z.; Yuan, Y.; Liu, Y.; Niu, F. (2015). *Green synthesis of gallic acid-coated silver nanoparticles with high antimicrobial activity and low cytotoxicity to normal cells*. *Process. Biochem.*, 50: 357–366.
- Li, Q., M. Qin, T. Li, Z. Gu, Q. Tan, P. Huang, and L. Ren. (2020). *Rutin protects against pirarubicin-induced cardiotoxicity by adjusting microRNA-125b-1-3p-mediated JunD signaling pathway*. *Molecular and Cellular Biochemistry* 466 (1–2):139–48. doi: 10.1007/s11010-020-03696-9.
- Li, S., Al-Misned, F. A., El-Serehy, H. A., & Yang, L. (2021). *Green synthesis of gold nanoparticles using aqueous extract of Mentha Longifolia leaf and investigation of its anti-human breast carcinoma properties in the in vitro condition*. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(2): 102931.
- Li, Y.; Wang, S.; Liu, Q.-Y.; Chen, Z. (2019). *A Chrono-Colorimetric Sensor Array for Differentiation of Catechins Based on Silver Nitrate-Induced Metallization of Gold Nanoparticles at Different Reaction Time Intervals*. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 7: 17306–17312.
- Liang, L., Xu, Y., Li, Y., Dong, H., Zhou, M., Zhao, H., & Lei, Y. (2017). *Facile synthesis of hierarchical fern leaf-like Sb and its application as an additive-free anode for fast reversible Na-ion storage*. *Journal of Materials Chemistry A*, 5(4), 1749-1755.

- Licina B.Z., Stefanovic O.D., Vasic S.M., Radojevic I.D., Dekic M.S., Comic L.R. (2013): *Biological activities of the extracts from wild growing Origanum vulgare L. Food Control*, 33: 498–504.
- Liu, B., Fan, L., Balakrishna, S., Sui, A., Morris, J. B., & Jordt, S. E. (2013). *TRPM8 is the principal mediator of menthol-induced analgesia of acute and inflammatory pain. PAIN®*, 154(10), 2169-2177.
- Liu, Y.; Lu, Y.; Yang, X.; Zheng, X.; Wen, S.; Wang, F.; Vidal, X.; Zhao, J.; Liu, D.; Zhou, Z.; et al. (2017). *Amplified stimulated emission in upconversion nanoparticles for super-resolution nanoscopy. Nat. Cell Biol.*, 543, 229–233.
- Liu, J.; Wang, L.; Bao, H. (2018a). *A novel fluorescent probe for ascorbic acid based on seed-mediated growth of silver nanoparticles quenching of carbon dots fluorescence. Anal. Bioanal. Chem.*, 411: 877–883.
- Liu, Y.-S.; Chang, Y.-C.; Chen, H.-H. (2018b). *Silver nanoparticle biosynthesis by using phenolic acids in rice husk extract as reducing agents and dispersants. J. Food Drug Anal.*, 26: 649–656.
- Loiseau, A.; Asila, V.; Boitel-Aullen, G.; Lam, M.; Salmain, M.; Boujday, S. (2019). *Silver-Based Plasmonic Nanoparticles for and Their Use in Biosensing. Biosensors*, 9: 78.
- Lok, C.-N.; Ho, C.-M.; Chen, R.; He, Q.-Y.; Yu, W.-Y.; Sun, H.; Tam, P.K.-H.; Chiu, J.-F.; Che, C. (2007). *M. Silver nanoparticles: Partial oxidation and antibacterial activities. JBIC J. Biol. Inorg. Chem.*, 12, 527–534.
- Lopes, C., Courrol, R. B Lopes, L. C. (2018). *Green synthesis of silver nanoparticles with extract of Mimosa coriacea and light. Journal of Luminescence* 199, 183-187.
- López Luengo, M.T, (2002). *Flavonoides, Offarm: farmacia y sociedad, ISSN 0212-047X, Vol. 21, N°. 4 (ABR), págs. 108-113.*
- Lopresti, E.F.; Weber, M.G. (2016). *Breaking Barriers in Evolutionary Biology: A Pioneering Woman in Science and Her Early Theory of Plant Chemical Macroevolution. Am. Nat.*, 188, 2–4.
- Mabberley, D. J. (2017). *Mabberley's plant-book: a portable dictionary of plants, their classification and uses (No. Ed. 4). Cambridge University Press.*

- Magro, A., Carolino, M., Bastos, M., & Mexia, A. (2006). Efficacy of plant extracts against stored products fungi. *Revista iberoamericana de micología*, 23(3): 176-178.
- Mahajan, S., & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*, 444(2): 139-158.
- Mahmoud, A. (2015). Polarized optomechanical response of silver nanodisc monolayers on an elastic substrate induced by stretching. *The Journal of Physical Chemistry* 119, 19359-19366. <https://doi:10.1021/acs.jpcc.5b05359>
- Mahmoud, S. S., & Croteau, R. B. (2003). Menthofuran regulates essential oil biosynthesis in peppermint by controlling a downstream monoterpene reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24): 14481-14486.
- Mahmoudi R, Tajik H, Ehsani A, Farshid A, Zare P, Hadian M. (2012) Effects of *Mentha longifolia* L. essential oil on viability and cellular ultrastructure of *Lactobacillus casei* during ripening of probiotic Feta cheese. *Int J Dairy Technol* 66:77–82. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2012.00867.x>
- Mankad, M., Patil, Mankad, G., Patel, Patil, D., Patel, Patel, P., Patel, Patel, A. (2018). Comparative studies of sunlight mediated green synthesis of silver nanoparticles from *Azadirachta indica* leaf extract and its antibacterial effect on *Xanthomonas. oryzae* pv. *oryzae*. *Arabian Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.07.016>
- MAPA (2014). GUÍA DE GESTIÓN INTEGRADA de plagas OLIVAR. Guía GIP OLIVAR. NIPO: 280-14-181-7 (papel) ISBN: 978-84-491-1410-6
- Marely. G. F., Rocha-Guzmán, N. E., Mercado-Silva, E., Loarca-Piña, G., & Reynoso-Camacho, R. (2014). Effect of chemical elicitors on peppermint (*Mentha piperita*) plants and their impact on the metabolite profile and antioxidant capacity of resulting infusions. *Food Chemistry*, 156: 273-278.
- Mari, M., Bautista-Banos, S., & Sivakumar, D. (2016). Decay control in the postharvest system: Role of microbial and plant volatile organic compounds. *Postharvest Biology and Technology*, 122: 70-81.
- Martí, M., Direccion, G., Aragonés, V., Frusciante, S., Ahrazem, O., Gómez-Gómez, L., & Daròs, J. A. (2020). Efficient production of saffron

*crocins and picrocrocin in Nicotiana benthamiana using a virus-driven system. Metabolic Engineering, 61: 238-250.*

Martinez, S.; Valek, L.; Petrović, Ž.; Metikoš-Hukovič, M.; Piljac, J. (2005). *Catechin antioxidant action at various pH studied by cyclic voltammetry and PM3 semi-empirical calculations. J. Electroanal. Chem., 584: 92–99.*

Martínez-Castañón, G.A.; Niño, N.; Martínezgutierrez, F.; Martínez-Mendoza, J.R.; Ruiz, F. (2008). *Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. J. Nanoparticle Res., 10, 1343–1348.*

Materials Project ID: (2021) mp-11872 Ag<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Available online: <https://materialsproject.org/materials/mp-11872/> (accessed on 8 July 2021).

Materials Project ID: (2021) mp-1605 Ag<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Available online: <https://materialsproject.org/materials/mp-1605/> (accessed on 8 July 2021).

Michaelides, A.; Reuter, K.; Scheffler, M. (2005). *When seeing is not believing: Oxygen on Ag (111), a simple adsorption system? J. Vac. Sci. Technol. A, 23: 1487.*

Middleton E. (1984). *The flavonoids. Trends Pharmacol Sci; 5: 335-338.*

Mikaili, P., Mojaverrostami, S., Moloudizargari, M., & Aghajanshakeri, S. (2013). *Pharmacological and therapeutic effects of Mentha Longifolia L. and its main constituent, menthol. Ancient science of life, 33(2): 131.*

Millstone, J.; Hurst, S.J.; Métraux, G.S.; Cutler, J.I.; Mirkin, C.A. (2009). *Colloidal Gold and Silver Triangular Nanoprisms. Small, 5: 646–664.*

Mimica-Dukić, N, Jakovljević V, Popović M, Gasčić O, Szabo A (1996) *Pharmacological study of Mentha longifolia phenolic extracts. Int J Pharmacogn 34:359–364.*

Mimica-Dukić, N., Kite, G., Gasić, O., Stajner, D., Pavkov, R., Jancić, R., & Fellows, L. (1993). *Comparative study of volatile constituents and antimicrobial activity of Mentha species. In International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants 344: 110-115.*

Mimica-Dukić N, Božin B, Soković M, Mihajlović B, Matavulj M (2003). *Antimicrobial and antioxidant activities of three Mentha sp. essential oils. Planta Med. 69:413-419.*

- Mincione A, Valenzise M, Runcio A, Poiana M, Agosteo GE, Taccone PL. (2004). *Ricerche sugli oli di oliva vergini cala-bresi. Influenza delle fitopatie sulle caratteristiche quali-tative degli oli. Nota I- Effetti diretti degli attacchi di Antracnosi. Riv. It. Sost. Grasse* 81: 9–17.
- Mona, S. A., Hashem, A., Abd\_Allah, E. F., Alqarawi, A. A., Soliman, D. W. K., Wirth, S., & Egamberdieva, D. (2017). *Increased resistance of drought by Trichoderma harzianum fungal treatment correlates with increased secondary metabolites and proline content. Journal of integrative agriculture*, 16(8): 1751-1757.
- Montes-Belmont, R., & Carvajal, M. (1998). *Control of Aspergillus flavus in maize with plant essential oils and their components. Journal of Food Protection*, 61(5): 616-619.
- Moral, J., Agustí-Brisach, C., Agalliu, G., de Oliveira, R., Pérez-Rodríguez, M., Roca, L. F., & Trapero, A. (2018). *Preliminary selection and evaluation of fungicides and natural compounds to control olive anthracnose caused by Colletotrichum species. Crop Protection*, 114: 167-176.
- Moral, J., Ávila, A., López-Doncel, L. M., Alsalimiya, M., Oliveira, R., Gutiérrez, F., ... & Trapero, A. (2005). *Resistencia a los Repilos de distintas variedades de olivo. Vida Rural*, 208, 34-40.
- Moral, J., Bouhmidi, K., & Trapero, A. (2008). *Influence of fruit maturity, cultivar susceptibility, and inoculation method on infection of olive fruit by Colletotrichum acutatum. Plant disease*, 92(10): 1421-1426.
- Moral J, Jurado-Bello J, Sánchez MI, Oliveira R, Trapero, A. (2012). *Effect of temperature, wetness duration, and planting density on olive anthracnose caused by Colletotrichum spp. Phytopathology* 102: 974–981.
- Moral J, Oliveira R, Trapero A, (2009). *Elucidation of disease cycle of olive anthracnose caused by Colletotrichum acutatum. Phytopathology* 99: 548–556.
- Moral, J., Trapero, A. (2009). *Resistencia del olivo a la Antracnosis. Boletín de la Sociedad Española de Fitopatología* 66: 22-30.
- Moral, J., & Trapero, A. (2012). *Mummified fruit as a source of inoculum and disease dynamics of olive anthracnose caused by Colletotrichum spp. Phytopathology*, 102(10): 982-989.
- Moral, J., Xaviér, C., Roca, L. F., Romero, J., Moreda, W., & Trapero, A.

- (2014). *La Antracnosis del olivo y su efecto en la calidad del aceite. Grasas y aceites*, 65(2).
- Moral, J., Xaviér, C. J., Viruega, J. R., Roca, L. F., Caballero, J., & Trapero, A. (2017). *Variability in susceptibility to anthracnose in the world collection of olive cultivars of Cordoba (Spain). Frontiers in plant science*, 8, 1892.
- Morales, C., Cusido, R. M., Palazon, J., & Bonfill, M. (1993). *Response of Digitalis purpurea plants to temporary salinity. Journal of plant nutrition*, 16(2): 327-335.
- Morales, A., Quintanar, A., & Cabezas, F. (2010). *Labiatae. Flora Ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*, 12: 25-484.
- Mossa, J.S.; Al-Yahya, M.A.; Al-Meshal, I.A. (1987). *Medicinal Plants of Saudi Arabia; King Saud University Libraries: Riyadh, Saudi Arabia*.
- Mozafari, A. A., Vafae, Y., & Shahyad, M. (2018). *Phytochemical composition and in vitro antioxidant potential of Cynodon dactylon leaf and rhizome extracts as affected by drying methods and temperatures. Journal of food science and technology*, 55(6): 2220-2229.
- Murad HAS, Abdallah HM, Ali SS. (2016). *Mentha longifolia protects against acetic-acid induced colitis in rats. J Ethnopharm* 190:354–361. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.06.016>
- Nagell A, Hefendehl FW, Hoyer J. (1974). *Two Stereoisomeric 1, 2-Epoxymenthylacetates from an Oil of Mentha rotundifolia x Mentha longifolia. Zeitschrift Fur Naturforschung Section C Biosci.* 29(5-6):294–295.
- Naghibi, F., Mosadegh, M., Mohammadi, M. S., & Ghorbani, A. B. (2005). *Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 1: 63-79.
- Nair, L.S.; Laurencin, C.T. (2007). *Silver Nanoparticles: Synthesis and Therapeutic Applications. J. Biomed. Nanotechnol.*, 3: 301–316.
- Narayanan, M. V., & Rakesh, S. G. (2018). *Synthesis of colloidal alumina nanoparticles using green method. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 402, 012150.
- Narayani, M., & Srivastava, S. (2017). *Elicitation: a stimulation of stress in in vitro plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. Phytochemistry reviews*, 16(6): 1227-1252.

- Nascimento, C.; Amarasiriwardena, D.; Xing, B. (2006). *Comparison of natural organic acids and synthetic chelates at enhancing phytoextraction of metals from a multi-metal contaminated soil. Environ. Pollut., 140: 114–123.*
- National Center for Biotechnology Information (2021). *PubChem Compound Summary for CID 998, Phenylacetaldehyde. Retrieved November 25, 2021.*
- National Center for Biotechnology Information (2021). *PubChem Compound Summary for CID 91753282, Mint furanone I. Retrieved November 25, 2021.*
- National Center for Biotechnology Information (2021). *PubChem Compound Summary for CID 119838. Retrieved November 25, 2021.*
- National Center for Biotechnology Information (2021). *PubChem Compound Summary for CID 7865, Methyl formate. Retrieved November 25, 2021.*
- National Center for Biotechnology Information (2021). *PubChem Compound Summary for CID 329983, Menthofuran. Retrieved November 27, 2021.*
- National Center for Biotechnology Information (2021). *PubChem Compound Summary for CID 12025, 2-Pyrrolidinone. Retrieved November 25, 2021.*
- National Center for Biotechnology Information (2021). *PubChem Compound Summary for CID 15068, 2'-Hydroxy-5'- methylacetophenone. Retrieved November 27, 2021.*
- National Center for Biotechnology Information (2021). *PubChem Compound Summary for CID 753, Glycerol. Retrieved November 27, 2021.*
- National Center for Biotechnology Information (2021). *PubChem Compound Summary for CID 6781, Diethyl phthalate. Retrieved November 27, 2021.*
- Navaro JM, Flores P, Garrido C, Martinez V (2006). *Changes in the contents of antioxidants compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. Food Chem 96:66–73.*

- Nickavar, B.; Alinaghi, A.; Kamalinejad, M. (2008). *Evaluation of the Antioxidant Properties of Five Mentha Species*. *Iran. J. Pharm. Sci.*, 7: 203–209.
- Nieto, G. (2017). *Biological activities of three essential oils of the Lamiaceae family*. *Medicines*, 4(3): 63.
- Nieto, G.; Díaz, P.; Bañón, S.; Garrido, M.D. (2010). *Dietary administration of ewes diets with a distillate from rosemary leaves (Rosmarinus officinalis L.): Influence on lamb meat quality*. *Meat Sci.*, 84: 23–29.
- Nijveldt, R. J., Van Nood, E. L. S., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., & Van Leeuwen, P. A. (2001). *Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications*. *The American journal of clinical nutrition*, 74(4), 418-425.
- Nikavar, B., ALI, N. A., & Kamalnezhad, M. (2008). *Evaluation of the antioxidant properties of five Mentha species*.
- Nikšić H, Kovač-Bešović E, Makarević E, Durić K. (2012). *Chemical composition, antimicrobial and antioxidant properties of Mentha longifolia (L.) Huds. essential oil*. *JHSCI*. 2(3):192–200.
- OCDE. *Agriculture and the environment*. 2019. [Consultado el 2 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://www.oecd.org/agriculture/topics/agriculture-and-the-environment/>
- Okuda, T.; Yoshida, T.; Hatano, T.; Ito, H.; Quideau, S. (2009). *Ellagitannins Renewed the Concept of Tannins*. In *Chemistry and Biology of Ellagitannins*; World Scientific Pub Co Pte Lt Singapore: Singapore; pp. 1–54.
- Okwu DE, Awurum AN, Okoronkwo IJ (2007) *Phytochemical composition and in vitro antifungal activity screening of extracts from Citrus plants against Fusarium oxysporum of okra plant (Hibiscus esculentus)*. *Pest Technology* 1, 145-148.
- Oliveira R, Moral J, Bouhmidi K, Trapero, A. (2005). *Caracterización morfológica y cultural de aislados de Colletotrichum spp. causantes de la antracnosis del olivo*. *Bol. San. Veg. Plagas* 31: 531–548.
- Oliver, S.; Wagh, H.; Liang, Y.; Yang, S.; Boyer, C. (2018). *Enhancing the antimicrobial and antibiofilm effectiveness of silver nanoparticles prepared by green synthesis*. *J. Mater. Chem. B*, 6: 4124–4138.

- Orhan F, Baris O; Yanmis D, Bal T, Gu'venalp Z, Gu'llu'ce M (2012) Isolation of some luteolin derivatives from *Mentha longifolia* ssp. *longifolia* and determination of their genotoxic activities. *Food Chem* 135:764–769.
- Osman, I. H. (2013). *In vitro* antioxidant activity of *Mentha pulegium* from Saudi Arabia. *Bioscience Research*, 10(1), 33-37.
- Oueslati, S., Karray-Bouraoui, N., Attia, H., Rabhi, M., Ksouri, R., Lachaal, M., (2010). Physiological and antioxidant response of *Mentha pulegium* (Pennyroyal) to salt estress. *Acta Physiol. Plant*, 32: 289-296.
- Oumzil, H., Ghoulami, S., Rhajaoui, M., Ilidrissi, A., Fkih-Tetouani, S., Faid, M., & Benjouad, A. (2002). Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 16(8): 727-731.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr. Diet.*, 44: 307–315.
- Öztürk, N., & Bahçeli, S. (2006). FT-IR spectroscopic study of 1, 3-diaminopropane adsorbed on type A, X and Y zeolites. *Zeitschrift für Naturforschung A*, 61(7-8): 399-401.
- Padmini E., Prema K., Geetha B.V., Rani M.U. (2008). Comparative study on composition and antioxidant properties of mint and black tea extract. *International Journal of Food Science and Technology*.,43: 1887–1895.
- Panche, A.N.; Diwan, A.D.; Chandra, S.R. (2016). Flavonoids: An overview. *J. Nutr. Sci*, 5, e47.
- Pangallo S, Nicosia MGLD, Agosteo GE, Abdelfattah A, Romeo FV, Cacciola SO, et al. (2017). Evaluation of a pomegranate peel extract as an alternative means to control olive anthracnose. *Phytopathology*; 107(12):1462–7.
- Paramelle, D.; Sadovoy, A.; Gorelik, S.; Free, P.; Hoblely, J.; Fernig, D. (2014). A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. *Analyst*, 139: 4855–4861.

- Park, H.W.; Alam, S.M.; Lee, S.H.; Karim, M.M.; Wabaidur, S.M.; Kang, M.; Choi, J.H. (2009). *Optical ascorbic acid sensor based on the fluorescence quenching of silver nanoparticles. Luminescence*, 24:367–371.
- Park, J.; Cha, S.-H.; Cho, S.; Park, Y. (2016). *Green synthesis of gold and silver nanoparticles using gallic acid: Catalytic activity and conversion yield toward the 4-nitrophenol reduction reaction. J. Nanoparticle Res.*, 18: 1–13.
- Park, Y. J., Baek, S. A., Choi, Y., Kim, J. K., & Park, S. U. (2019). *Metabolic profiling of nine Mentha species and prediction of their antioxidant properties using chemometrics. Molecules*, 24(2): 258.
- Parr A.J., Bolwell G.P. (2000): *Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 985–1012.
- Parvaiz A., Satyawati S. (2008): *Salt stress and phytochemical responses of plants – a review. Plant Soil Environ.*, 54: 89–99.
- Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzán, L.M. (2008). *Colloidal silver nanoplates. State of the art and future challenges. J. Mater. Chem.*, 18: 1724–1737.
- Patonay, K., & Nemeth-Zaborine, E. (2021). *Horsemint as a potential raw material for the food industry: survey on the chemistry of a less studied mint species. Phytochemistry Reviews*, 20(3): 631-652.
- Patonay, K., Korozs, M., Muranyi, Z., & Konya, E. P. (2017). *Polyphenols in northern Hungarian Mentha longifolia (L.) L. treated with ultrasonic extraction for potential oenological uses. Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 41(3): 208-217.
- Patterson, A.L. (1939). *The Scherrer Formula for X-Ray Particle Size Determination. Phys. Rev.* 56: 978–1939.
- Pattnaik S, Subramanyam VR, Rath CC. (1995). *Effect of essential oils on the viability and morphology of Escherichia coli (sp-11). Microbios* 84: 195-199
- Pawar, O.; Deshpande, N.; Dagade, S.; Waghmode, S.; Joshi, P.N. (2016). *Green synthesis of silver nanoparticles from purple acid phosphatase apoenzyme isolated from a new source Limonia acidissima. J. Exp. Nanosci.*, 11: 28–37.

- Pecci, J.; Foye, W.O. (1960). *The Avidity of Salicylic, Gentisic, and Salicyluric Acids for Heavy Metal Cations*\*\*Received August 21 1959, from the Department of Chemistry, Massachusetts College of Pharmacy, Boston. *J. Am. Pharm. Assoc.*, 49: 411–414.
- Pereira, O R., & Cardoso, S M. (2013). Overview on *Mentha* and *Thymus* polyphenols. *Current Analytical Chemistry*, 9(3): 382-396.
- Persoon, C.H. (1794). *Neuer Veersuch einer systematischen Eintheilung der Schwamme (Dispositio methodica fungorum)*. *Romer's News Mag. Bot.* 1:63-128.
- Perveen, A. N. J. U. M., & Qaiser, M. (2004). Pollen morphology of the family Labiatae from Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 35(5; SPI), 671-694.
- Pesce VM, Nally MC, Carrizo GP, Rojo C, Pe´rez BA, Toro ME, et al. (2018). Antifungal activity of native yeasts from different microenvironments against *Colletotrichum gloeosporioides* on ripe olive fruits. *Biol Control*; 120:43–51.
- Petit, C.; Lixon, P.; Pileni, M.P. (1993). *In situ* synthesis of silver nanocluster in AOT reverse micelles. *J. Phys. Chem.*, 97: 12974–12983.
- Phaniendra, A.; Jestadi, D.B.; Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Ind. J. Clin. Biochem.*, 30: 11–26.
- Phillipson, J. D., & O'Neill, M. J. (1987). New leads to the treatment of protozoal infections based on natural product molecules. *Acta Pharmaceutica Nordica*, 1: 131-144
- Pieroni A, Giusti ME, Quave CL. (2011). Cross-cultural ethnobiology in the Western Balkans: medical ethnobotany and ethnozoology among Albanians and Serbs in the Pešter plateau, Sandžak, South-Western Serbia. *Hum Ecol.*; 39(3):333–49 <https://doi.org/10.1007/s10745-011-9401-3>.
- Pieroni, A., & Quave, C. L. (2005). Traditional pharmacopoeias and medicines among Albanians and Italians in southern Italy: a comparison. *Journal of Ethnopharmacology*, 101(1-3): 258-270.
- Pieroni A, Sõukand R. (2017). Are borders more important than geographical distance? The wild food ethnobotany of the Boykos and its overlap with that of the Bukovinian Hutsuls in Western Ukraine. *J Ethnobiol.*; 37(2):326–46.

- Pietta P. (2000). *Flavonoids as antioxidants. Journal of Natural Products*; 63: 1035-1042.
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Cimpeanu, C., & Predoi, G. (2016). *Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review. Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- Popescu, L.; Ababei, G.; Babusca, D.; Creanga, D.; Benchea, C.A.; Lupu, N.; Oprica, L. (2019). *Spectral Investigation of Surface Plasmon Resonance Bands of Silver Nanoparticles Capped with Gallic Acid. In Proceedings of the VI Latin American Congress on Biomedical Engineering CLAIB 2014, Paraná, Argentina, 29–31 October 2014; Springer: Cham, Switzerland,; pp. 305–309.*
- Porta, J.; López-Acevedo, M.; Roquero, C. *Edafología para la agricultura y el medio ambiente. 2ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, 1999.*
- Prabhu, S.; Poulouse, E.K. (2012). *Silver nanoparticles: Mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. Int. Nano Lett., 2: 32.*
- Prasad, R. N., Viswanathan, S., Devi, J. R., V., Swetha, V. C., Archana, B. R., & Rajkumar, J. (2008). *Preliminary phytochemical screening and microbial activity of Samaea saman. Journal of Medicinal plants Research, 2: 268-270. Http://dx.doi.org/ 10.5897/JMPR.*
- Prusky D, Freeman S, Dickman MB. (2000). *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction. The American Phtopathological Society. St. Paul MN, USA.*
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). *Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutrición hospitalaria, 27(1): 76-89.*
- Rafat, A., Philip, K., & Muniandy, S. (2010). *Antioxidant potential and phenolic content of ethanolic extract of selected Malaysian plants. Research Journal of Biotechnology Vol, 5: 1.*
- Rahman, M. A., Mossa, J. S., Al-Said, M. S., & Al-Yahya, M. A. (2004). *Medicinal plant diversity in the flora of Saudi Arabia 1: a report on seven plant families. Fitoterapia, 75(2): 149-161.*

- Raja, P.B.; Rahim, A.A.; Qureshi, A.K.; Awang, K. (2014). *Green synthesis of silver nanoparticles using tannins. Mater. Sci., 32: 408–413.*
- Rauf, A., Ahmad, T., Khan, A., Maryam, Uddin, G., Ahmad, B., ... & Al-Harrasi, A. (2021). *Green synthesis and biomedical applications of silver and gold nanoparticles functionalized with methanolic extract of Mentha longifolia. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 49(1): 194-203.*
- Raveendran, P.; Fu, J.; Wallen, S.L. (2006). *A simple and “green” method for the synthesis of Au, Ag, and Au–Ag alloy nanoparticles. Green Chem., 8: 34–38.*
- Ravichandran, V., Vasanthi, S., Shalini, S., Ali, S., Tripathy, M., Paliwal, N. (2019). *Green Synthesis, characterization, antibacterial, antioxidant and photocatalytic activity of Parkia speciose leaves extractmediated silver nanoparticles. Results in Physics 15. 102565. <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2019.102565>*
- Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., & Saller, R. (2009). *Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties—an overview. Complementary Medicine Research, 16(2): 79-90.*
- Reino, J. L., Guerrero, R. F., Hernandez-Galan, R., & Collado, I. G. (2008). *Secondary metabolites from species of the biocontrol agent Trichoderma. Phytochemistry Reviews, 7(1): 89-123.*
- Rekha, C., Nayar, V., Gopchandran, K. (2018). *Synthesis of highly stable silvernanorods andtheir application as SERS substrates. Journalof Science Advanced Materials and Devices3, 196-205. <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2018.03.003>*
- Riaz, M.; Mutreja, V.; Sareen, S.; Ahmad, B.; Faheem, M.; Zahid, N.; Jabbour, G.; Park, J. (2021). *Exceptional antibacterial and cytotoxic potency of monodisperse greener AgNPs prepared under optimized pH and temperature. Sci. Rep., 11: 1–11.*
- Rice-Evans CA, Miller NJ and Paganga G. (1976). *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Rad Bio & Med; 20(7): 933-56.*
- Rodríguez-González, Á.; Álvarez-García, S.; González-López, Ó.; Da Silva, S.; Casquero, P.A. (2019). *Insecticidal properties of Ocimum basilicum and Cymbopogon winterianus against Acanthoscelides obtectus, insect*

pest of the common bean (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Insects* 10(5): 151; <https://doi.org/10.3390/insects10050151>

- Röska, B., Park, S. H., Behal, D., Hess, K. U., Günther, A., Benka, G. & Kimura, T. (2018). Determination of the hydrogen-bond network and the ferrimagnetic structure of a rockbridgeite-type compound. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 30(23): 235401.
- Rotello, V.M. (2004). *Nanoparticles: Building Blocks for Nanotechnology*; (Ed.) Springer Science & Business Media: Berlin/Heidelberg, Germany.
- Rothwell, J.; Day, A.J.; Morgan, M.R.A. (2005). Experimental Determination of Octanol Water Partition Coefficients of Quercetin and Related Flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4355–4360.
- Rycenga, M.; Cogley, C.M.; Zeng, J.; Li, W.; Moran, C.H.; Zhang, Q.; Qin, D.; Xia, Y. (2011). Controlling the Synthesis and Assembly of Silver Nanostructures for Plasmonic Applications. *Chem. Rev.*, 111, 3669–3712.
- Saba, I.; Anwar, F. (2018). Effect of Harvesting Regions on Physico-chemical and Biological Attributes of Supercritical Fluid-Extracted Spearmint (*Mentha spicata* L.) Leaves Essential Oil. *J. Essent. Oil Bear. Plants*, 21: 400–419.
- Safdar, M. N., Kausar, T., Jabbar, S., Mumtaz, A., Ahad, K., & Saddozai, A. A. (2017). Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of food and drug analysis*, 25(3), 488-500.
- Saijō, R., & Takeo, T. (1970). The production of phenylacetaldehyde from L-phenylalanine in tea fermentation. *Agricultural and Biological Chemistry*, 34(2): 222-226.
- Salehi, B.; Valussi, M.; Jugran, A.K.; Martorell, M.; Ramírez-Alarcón, K.; Stojanović-Radić, Z.Z.; Antolak, H.; Kręgiel, D.; Mileski, K.S.; Sharifi-Rad, M. et al. (2018). *Nepeta* species: From farm to food applications and phytotherapy. *Trends Food Sci. Technol.*, 80: 104–122.
- Samad, A. F. A., Sajad, M., & Ismail, I. (2020). Emerging of microRNAs as Key Regulators in Plant Secondary Metabolism. In *Plant microRNAs* (pp. 121-142). Springer, Cham.

- Sanchez-Muñoz, R., Almagro, L., Cusido, R. M., Bonfill, M., Palazon, J., & Moyano, E. (2020). *Transfecting Taxus × media Protoplasts to Study Transcription Factors BIS2 and TSAR2 as Activators of Taxane- Related Genes. Plant and Cell Physiology*, 61(3): 576-583.
- Sanders, F.E., Tinker, P.B., Black, R.L.B., Palmerle, S.M. (1977). *The development of endomycorrhizal root system. I. Spread of infection and growth promoting effects with four species of vesicular-arbuscular endophyte. New Phytol.* 78: 257-268.
- Saratale, R.G.; Saratale, G.D.; Shin, H.S.; Jacob, J.M.; Pugazhendhi, A.; Bhaisare, M.; Kumar, G. (2018). *New insights on the Green synthesis of metallic nanoparticles using plant and waste biomaterials: Current knowledge, their agricultural and environmental applications. Environ. Sci. Pollut. Res.*, 25: 10164–10183.
- Schäfer, H., & Wink, M. (2009). *Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: progress in alkaloid biosynthesis. Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 4(12): 1684-1703.
- Scherrer, P. (1918). *Göttinger Nachrichten Math. Physical*, 2: 98–100.
- Segura R. (2003). *Evaluación de microorganismos antagonistas para el control biológico del Repilo y la Antracnosis del olivo. Tesis doctoral, ETSIAM, Córdoba.*
- Sergeeva V, Nair NG, Spooner-Hart R. (2008). *Evidence of early flower infection in olives (Olea europaea) by Colletotrichum acutatum and C. gloeosporioides causing anthracnose dis-ease. Australas. Plant Dis. Not.* 3: 81–82.
- Sevindik, M. (2018). *Pharmacological properties of Mentha species. J Tradit Med Clin Natur*, 7(259), 2.
- Sevindik, M., Akgul, H., Pehlivan, M., & Selamoglu, Z. (2017). *Determination of therapeutic potential of Mentha longifolia ssp. longifolia. Fresen Environ Bull*, 26(7): 4757-4763.
- Seyedeh, F., Nooshin, T., Mohaddeseh, M. (2020). *Green synthesis of silver nanoparticles using Teucrium polium leaf extract and assessment of their antitumor effects against MNK45 human gastric cancer cell line Photophysical, Photochemical and Photocatalytic Aspects of Metal Nanoparticles. Journal of Molecular Structure Journal of Physical*

- Shaikh, S.; Bin Yaacob, H.; Rahim, Z.H.A. (2014). *Prospective Role In Treatment Of Major Illnesses And Potential Benefits As A Safe Insecticide And Natural Food Preservative of Mint (Mentha spp.): A Review*. *Asian J. Biomed. Pharm. Sci.*, 4: 1–12.
- Sharaf, M., El-Ansari, M. A., & Saleh, N. A. M. (1999). *Flavone glycosides from Mentha longifolia*. *Fitoterapia*, 70(5): 478-483.
- Sharma P, Brown S, Walter G, Santra S and Moudgil B. (2006). *Nanoparticles for bioimaging Adv. Colloid Interface Sci.* 123–126 471–85
- Sharma, D.; Kanchi, S.; Bisetty, K. (2019). *Biogenic synthesis of nanoparticles: A review*. *Arab. J. Chem.*, 12: 3576–3600.
- Sharopov, F. S., Sulaimonova, V. A., & Setzer, W. N. (2012). *Essential oil composition of Mentha longifolia from wild populations growing in Tajikistan*. *Journal of Medicinally Active Plants*, 1(2): 76-84.
- Shelton, A.L. (2005). *Within-Plant Variation in Glucosinolate Concentrations of Raphanus sativus Across Multiple Scales*. *J. Chem. Ecol.*, 31: 1711–1732.
- Shen D, Pan HM, Wu QL, Park CH, Rodolfo Juliani H, Ho CT, Simon JE (2011). *A rapid LC/MS/MS method for the analysis of nonvolatile antiinflammatory agents from Mentha spp*. *J Food Sci* 76:C900–C908. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02281.x>
- Shume, W.M.; Murthy, H.C.A.; Zereffa, E.A. (2020). *A Review on Synthesis and Characterization of Ag<sub>2</sub>O Nanoparticles for Photocatalytic Applications*. *J. Chem.*, 9479.
- Siddiqi, K. S., Husen, A., & Rao, R. A. (2018). *A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties*. *Journal of nanobiotechnology*, 16(1): 1-28.
- Siddiqui, M.R.H.; Adil, S.; Assal, M.; Ali, R.; Al-Warthan, A.A. (2013). *Synthesis and Characterization of Silver Oxide and Silver Chloride Nanoparticles with High Thermal Stability*. *Asian J. Chem.*, 25: 3405–3409.

- Silva L, Pezzini B, Soares L. (2015). Spectrophotometric determination of the total flavonoid content in *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) leaves. *Pharmacogn Mag.*;11(41):96
- Singh, P., & Pandey, A. K. (2018). Prospective of essential oils of the genus *Mentha* as biopesticides: A review. *Frontiers in plant science*, 9: 1295.
- Singh SP, Singh HB. (2015). Effect of mixture of *Trichoderma* isolates on biochemical parameter in tomato fruits against *Sclerotinia sclerotiorum* rot of tomato plant. *J Environ Biol. Jan*; 36(1):267-72.
- Smeriglio, A.; Barreca, D.; Bellocco, E.S.; Trombetta, D. (2016). Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: Occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *Br. J. Pharmacol.*, 174: 1244–1262.
- Smith, D. J. (2015). Characterisation of nanomaterials using transmission electron microscopy. In J. Hutchison, & A. Kirkland (Eds.), *Nanocharacterisation* (pp. 1e27). RSC Publishing.
- Smitha, S. L., Nissamudeen, K. M., Philip, D., & Gopchandran, K. G. (2008). Studies on surface plasmon resonance and photoluminescence of silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 71(1): 186-190.
- Sodré A.C.B., Luz J.M.Q., Haber L.L., Marques M.O.M., Rodrigues C.R., Blank A.F. (2012): Organic and mineral fertilization and chemical composition of lemon balm (*Melissa officinalis*) essential oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia/Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22: 40–44.
- Solomons, T.W.G., Fryhle, C. (2015). *Química Orgânica*, vol. 2. (8th Ed.), 2004, Rio de Janeiro: editora LTC. Tondi G. and Petutschnigg A., Middle infrared (ATRFT-MIR) characterization of industrial tannin extracts. *Ind. Crop. Prod.* 65: 422–428.
- Sõukand R, Pieroni A. (2016). The importance of a border: medical, veterinary, and wild food ethnobotany of the Hutsuls living on the Romanian and Ukrainian sides of Bukovina. *J Ethnopharmacol.*; 185:17–40 <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.009>.
- Souza, R.F.; De Giovani, W.F. (2004). Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Rep.*, 9: 97–104.

- Srikar, S.K.; Giri, D.D.; Pal, D.B.; Mishra, P.K.; Upadhyay, S.N. (2016). *Green Synthesis of Silver Nanoparticles: A Review. Green Sustain. Chem.*, 6: 34–56.
- Standke, B.; Jansen, M. (1986). *Ag<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, the First Silver (II, III) Oxide. Angew. Chem. Int. Ed.*, 25: 77–78.
- Stanisavljevic, D.; Stojicevic, S.; Djordjevic, S.; Zlatkovic, B.; Velickovic, D.; Karabegovic, I.; Lazic, M. (2012). *Antioxidant activity, the content of total phenols and flavonoids in the ethanol extracts of Mentha longifolia (L.) Hudson dried by the use of different techniques. Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* 18: 411–420.
- Suhaj M. (2006): *Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 531–537.
- Sutradhar, P., Debnath, N., & Saha, M. (2013). *Microwave-assisted rapid synthesis of alumina nanoparticles using tea, coffee and triphala extracts. Advances in Manufacturing*, 1(4): 357–361. <https://doi.org/10.1007/s40436-013-0043-0>
- Tafrihi, M., Imran, M., Tufail, T., Gondal, T. A., Caruso, G., Sharma, S., ... & Pezzani, R. (2021). *The wonderful activities of the genus Mentha: Not only antioxidant properties. Molecules*, 26(4): 1118.
- Tampieri MP, Galuppi R, Macchioni F. et al. (2005). *The inhibition of Candida albicans by selected essential oils and their major components . Mycopathologia* 159: 339-345
- Taneja, S. C., & Chandra, S. (2012). *Mint. In Handbook of herbs and spices (pp. 366-387). Woodhead Publishing.*
- Tao, A.R.; Habas, S.; Yang, P. (2008). *Shape Control of Colloidal Metal Nanocrystals. Small*, 4: 310–325.
- Tasca, F.; Antiochia, R. (2020). *Biocide Activity of Green Quercetin-Mediated Synthesized Silver Nanoparticles. Nanomaterials*, 10: 909.
- Tehri, N., Vashishth, A., Gahlaut, A., & Hooda, V. (2020). *Biosynthesis, antimicrobial spectra and applications of silver nanoparticles: current progress and future prospects. Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, 1–19.
- Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P. K., & Puri, S. (2019). *Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic*

elicitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 12: 1-12.

Thangam, R., Suresh, V., Rajkumar, M., Vincent, J. D., Gunasekaran, P., Anbazhagan, C. & Kannan, S. (2013). Antioxidant and In Vitro Anticancer Effect of 2-Pyrrolidinone Rich Fraction of *Brassica oleracea* var. *capitata* Through Induction of Apoptosis in Human Cancer Cells. *Phytotherapy Research*, 27(11): 1664-1670.

Thuong, P. T., Hung, T. M., Ngoc, T. M., Ha, D. T., Min, B. S., Kwack, S. J., ... & Bae, K. (2010). Antioxidant activities of coumarins from Korean medicinal plants and their structure–activity relationships. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 24(1): 101-106.

Tommerup, I.C., (1983). SPORE dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Transfer. Brit. Mycol. Soc.* 81: 37-45.

Torreggiani, A.; Jurasekova, Z.; Sanchez-Cortes, S.; Tamba, M. (2008). Spectroscopic and pulse radiolysis studies of the antioxidant properties of (+) catechin: Metal chelation and oxidizing radical scavenging. *J. Raman Spectrosc. Int. J. Orig. Work. Asp. Raman Spectrosc. Incl. High. Order Process. Brillouin Rayleigh Scatt.*, 39: 265–275.

Torres-Contreras, A. M., Nair, V., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2014). Effect of exogenous amylolytic enzymes on the accumulation of chlorogenic acid isomers in wounded potato tubers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(31): 7671-7675.

Trakoontivakorn G., Tangkanakul P., Nakahara K. (2012): Changes of antioxidant capacity and phenolics in *Ocimum* herbs after various cooking methods. *Jarq-Japan Agricultural Research Quarterly*, 46: 347–353.

Trapero A, Blanco MA. (2008). Enfermedades. In Barranco D, Fernández-Escobar R, Rallo L (Eds) *El cultivo de olivo*. Coedición Junta de Andalucía/Mundi-Prensa, Madrid, 595–656.

Trapero, A., Roca, L.F., Moral, J., López-Escudero, F.J., Blanco-López, M.A. (2009). *En enfermedades del olivo*. *Phytoma* 209: 18-28.

Tsuchiya, H., M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., & Iinuma, M. (1996). Comparative study on the antibacterial activity of

*phytochemical flavonones against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Journal of Ethnopharmacology, 50: 27-34*

Tsuji, M.; Gomi, S.; Maeda, Y.; Matsunaga, M.; Hikino, S.; Uto, K.; Tsuji, T.; Kawazumi, H. (2012). *Rapid Transformation from Spherical Nanoparticles, Nanorods, Cubes, or Bipyramids to Triangular Prisms of Silver with PVP, Citrate, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Langmuir, 28: 8845–8861.*

Tucker AO, Naczi RFC (2007) *Mentha: an overview of its classification and relationships. In: Lawrence BM (ed) Mint. The genus Mentha — Medicinal and aromatic plants — Industrial profiles. CRC Press, Boca Raton*

Tunc, tu`rk M, Tunc, tu`rk R, Sekeroglu N, Ertus MM, Ozgokce F (2011) *Lead concentrations of herbs used in Van Herby cheese. Nat Prod Commun 6:1473–1474*

Umadevi, M.; Shalini, S.; Bindhu, M.R. (2012). *Synthesis of silver nanoparticle using D. carota extract. Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol., 3: 025008.*

Vasconsuelo, A., & Boland, R. (2007). *Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. Plant science, 172(5): 861-875.*

Viljoen, A. M., Petkar, S., Van Vuuren, S. F., Figueiredo, A. C., Pedro, L. G., & Barroso, J. G. (2006). *The chemo-geographical variation in essential oil composition and the antimicrobial properties of “wild mint”—Mentha longifolia subsp. polyadena (Lamiaceae) in southern Africa. Journal of Essential Oil Research, 18(sup1): 60-65.*

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Barbetti, M. J., Li, H., ... & Lorito, M. (2008). *A novel role for Trichoderma secondary metabolites in the interactions with plants. Physiological and molecular plant pathology, 72(1-3): 80-86.*

Vladimir-Knežević S, Blaz`ekovic´ B, Kindl M, Vladic´ J, Lower-Nedza AD, Brantner AH (2014). *Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the Lamiaceae family. Molecules 19:767–782. <https://doi.org/10.3390/molecules19010767>*

Wang G.X. (2010). *In vivo anti elmintic activity of five alkaloids from Macelya microcarpa against Dactylogyrus intermedius in Carassius auratus. Veterinary Parasitology. 171:305-313.*

- Wang, Y., & Liu, H. (2021). *Liquid and vapor-phase antifungal activities of natural borneol against Candida albicans and its germ tube formation.* bioRxiv.
- Weindling, R. (1932). *Trichoderma lignorum as a parasite of other soil fungi.* *Phytopathology*, 22(8): 837-845.
- Wexler, R.B.; Qiu, T.; Rappe, A.M. (2019). *Automatic Prediction of Surface Phase Diagrams Using Ab Initio Grand Canonical Monte Carlo.* *J. Phys. Chem. C*, 123: 2321–2328.
- Wichi HP. (1986) *Enhanced tumor development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the prospective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium.* *Food Chem. Toxicol.* 26: 717-723.
- Wink M. (2003): *Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective.* *Phytochemistry*, 64: 3–1
- Wink, M. (2010). *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*, 2nd ed.; Blackwell Publishing Ltd.: Hoboken, NJ, USA,
- Xavier, C. J. (2015). *Resistencia y control químico en la Antracnosis del olivo causada por Colletotrichum spp.* Tesis doctoral, ETSIAM, Córdoba.
- Xiong, J.; Wang, Y.; Xue, Q.; Wu, X. (2011). *Synthesis of highly stable dispersions of nanosized copper particles using l-ascorbic acid.* *Green Chem.*, 13: 900–904.
- Yadav, M., Chatterji, S., Gupta, S. K., & Watal, G. (2014). *Preliminary phytochemical screening of six medicinal plants used in traditional medicine.* *Int J Pharm Pharm Sci*, 6(5), 539-42.
- Yang, L.; Wen, K.-S.; Ruan, X.; Zhao, Y.-X.; Wei, F.; Wang, Q. (2018). *Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors.* *Molecules* 23: 762.
- Younis MHY, Beshir SM (2011). *Carvone-rich essential oils from Mentha longifolia (L.) Huds. ssp. schimperii Briq. and Mentha spicata L. grown in Sudan.* *J Ess Oil Res* 16:539–541. <https://doi.org/10.1080/10412905.2004.969879>
- Zenkevich, I.G.; Eshchenko, A.Y.; Makarova, S.V.; Vitenberg, A.G.; Dobryakov, Y.G.; Utsal, V.A. (2007). *Identification of the Products of Oxidation of Quercetin by Air Oxygen at Ambient Temperature.* *Molecules*, 12: 654–672.

- Zhang, Q.; Hu, Y.; Guo, S.; Goebel, J.; Yin, Y. (2010). *Seeded Growth of Uniform Ag Nanoplates with High Aspect Ratio and Widely Tunable Surface Plasmon Bands*. *Nano Lett.*, 10: 5037–5042.
- Zhang, Q.; Li, N.; Goebel, J.; Lu, Z.; Yin, Y. (2011). *A systematic study of the synthesis of silver nanoplates: Is citrate a “magic” reagent?* *J. Am. Chem. Soc.*, 133: 18931–18939.
- Zhang, X.-F.; Liu, Z.-G.; Shen, W.; Gurunathan, S. (2016). *Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches*. *Int. J. Mol. Sci.*, 17: 1534.