

SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ



TRABAJO PROFESIONAL

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA BIOQUÍMICA

QUE PRESENTA:

DEYSI ERMETH GÓMEZ HERNÁNDEZ

CON EL TEMA:

**“COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD
ANTIRRADICAL EN PLANTAS DE HIERBA
SANTA (*Piper auritum* Kunth) CULTIVADAS
CON INSUMOS ORGÁNICOS”**

MEDIANTE:

**OPCION I
(TESIS PROFESIONAL)**

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS

OCTUBRE 2015

SEP

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

"2015, Año del Generalísimo José María Morelos Y Pavón"

DIRECCIÓN
SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas 03 de noviembre del 2015

OFICIO NUM. DEP-CT-692-2015

C. DEYSI ERMETH GÓMEZ HERNÁNDEZ
PASANTE DE LA CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA
EGRESADO DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ.
P R E S E N T E.

Habiendo recibido la comunicación de su trabajo profesional por parte de los CC. DR. FEDERICO ANTONIO GUTIÉRREZ MICELI, DRA. ROCIO MEZA GORDILLO Y DR. JOAQUIN ADOLFO MONTES MOLINA en el sentido que se encuentra satisfactorio el contenido del mismo como prueba escrita, **AUTORIZO** a Usted a que se proceda a la impresión del mencionado Trabajo denominado:

" COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ANTIRRADICAL EN PLANTAS DE HIERBA SANTA (Piper auritum kunth) CULTIVADA CON INSUMOS ORGÁNICOS."

Registrado mediante la opción:
I (TESIS PROFESIONAL)

ATENTAMENTE
"CIENCIA Y TECNOLOGÍA CON SENTIDO HUMANO"

ING. JUAN JOSÉ ARREOLA ORDAZ
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE LA DIVISION DE
ESTUDIOS PROFESIONALES

Vo. Bo.

M. en C. JOSÉ LUIS MÉNDEZ NAVARRO
DIRECTOR

C.c.p.- Departamento de Servicios Escolares
C.c.p.- Expediente
I'JLMN/I'JJAO/I'eeam

Secretaría de Educ. Pública
Instituto Tecnológico
de Tuxtla Gutiérrez,
Div. de Est. Profesionales



Carretera Panamericana Km. 1080, C.P. 29050, Apartado Postal 599
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; Tels. (961) 61 54285, 61 50461
www.ittg.edu.mx



AGRADECIMIENTOS

Al Tecnológico Nacional de México y al Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez por la oportunidad brindada para mi superación profesional.

Al Dr. Federico Gutiérrez Miceli por la oportunidad de realizar este trabajo y por su apoyo para la elaboración del mismo.

A la Dra. Rocío Meza Gordillo y al Dr. Joaquín Montes Molina por sus recomendaciones para mejorar el contenido de este trabajo.

A la MC. Celina Lujan Hidalgo por todo el apoyo prestado durante el desarrollo experimental del trabajo, por darse tiempo para revisarlo y resolver mis dudas.

DEDICATORIAS

A mis padres, Salvador Gómez y Asunción Hernández

A la memoria de mi abuela, Ángela Nucamendi

A Alexei Robles

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	II
RESUMEN.....	1
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN.....	2
CAPÍTULO II ANTECEDENTES.....	5
2.1 Radicales libres y estrés oxidativo.....	5
2.1.1 Sistema de defensa antioxidante.....	5
2.2 Compuestos fenólicos.....	6
2.2.1 Fenoles simples y ácidos fenólicos.....	9
2.2.2 Flavonoides.....	9
2.2.3 Método de Folin-Ciocalteu para determinación de fenoles totales.....	11
2.2.4 Método de cloruro de aluminio para determinación de flavonoides.....	12
2.2.5 Actividad antirradical.....	13
2.2.6 Ensayo con DPPH para determinar actividad antirradical.....	13
2.3 Género <i>Piper</i>	15
2.3.1 Hierba santa (<i>Piper auritum</i> Kunth).....	15
2.4 Fertilizantes.....	17
2.4.1 Vermicomposta.....	19
2.4.2 Lixiviado.....	20
2.4.3 Roca fosfórica.....	22
2.5 Importancia de los biofertilizantes.....	25
CAPÍTULO III JUSTIFICACIÓN.....	26
CAPÍTULO IV OBJETIVOS.....	27
4.1 General.....	27
4.2 Específicos.....	27
CAPÍTULO V MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
5.1 Recolección de material vegetal.....	28
5.2 Obtención de extractos metanólicos.....	28
5.3 Determinación de compuestos fenólicos.....	29
5.3.1 Fenoles totales (método de Folin – Ciocalteu).....	29

5.3.2 Flavonoides (método del cloruro de aluminio)	29
5.4 Determinación de actividad antirradical	30
5.4.1 Método del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)	30
5.5 Diseño experimental y análisis estadístico	31
CAPÍTULO VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
6.1 Características de crecimiento.	32
6.2 Cuantificación de fenoles totales y flavonoides.	42
CAPÍTULO VII CONCLUSIONES	21
BIBLIOGRAFÍA	52

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Niveles reales y codificados de los parámetros del diseño.	31
Cuadro 2. Parámetros de crecimiento de plántulas de <i>Piper auritum</i> Kunth después de 30 días de crecimiento.....	33
Cuadro 3. Valores P para vermicomposta, lixiviado y roca fosfórica en las características de crecimiento de <i>Piper auritum</i> Kunth.	35
Cuadro 4 Efecto de la aplicación de diferentes dosis de vermicomposta, lixiviado y roca fosfórica en las características de crecimiento de <i>Piper auritum</i> Kunth.....	36
Cuadro 5. Optimización de la concentración de vermicomposta, lixiviado y roca fosfórica para maximizar las características químicas y de crecimiento en <i>Piper auritum</i> Kunth. ...	40
Cuadro 6. Ecuaciones para maximizar las características de crecimiento y producción de fenoles y flavonoides en <i>Piper auritum</i> Kunth.	41
Cuadro 7. Resultado de la cuantificación de fenoles totales y flavonoides en hojas de <i>Piper auritum</i> Kunth.	43
Cuadro 8. Valores P de vermicomposta, lixiviado y roca fosfórica en las características químicas de <i>Piper auritum</i> Kunth.	44
Cuadro 9. Efecto de diferentes concentración de vermicomposta, lixiviado y roca fosfórica en contenido de fenoles totales y flavonoides de <i>Piper auritum</i> Kunth.....	44
Cuadro 10. Actividad antirradical de <i>Piper auritum</i> Kunth.	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del fenol.	7
Figura 2. Metabolismo secundario de plantas.	8
Figura 3. Ejemplos de fenoles simples y ácidos fenólicos.	9
Figura 4. Ejemplo de flavonoides.	10
Figura 5. Biosíntesis de flavonoides.	10
Figura 6. Mecanismo de acción de la reacción entre un compuesto fenólico y el reactivo de Folin- Ciocalteau.	12
Figura 7. Formación del complejo de coordinación de color amarillo debido a la quelación de Al con el flavonol quercetina.	13
Figura 8. Estructura química del 2,2-difenil-1-picrilhidracilo.	14
Figura 9. Hojas y flores de <i>Piper auritum</i> Kunth.	16
Figura 10. Composición elemental promedio de las plantas (IFA, 1992).....	17
Figura 11. Vermicomposta.	19
Figura 12. Lixiviado de vermicomposta.	21
Figura 13. Roca fosfórica granulada.	24
Figura 14. a) Gráfico de efectos principales para fenoles totales, b) Gráfico de superficie de respuesta para vermicomposta y roca fosfórica, c) Gráfico de superficie de respuesta para vermicomposta y lixiviado, d) Gráfico de superficie de respuesta para lixiviado y roca fosfórica. MS= muestra seca, VC= vermicomposta, L= lixiviado y RF= roca fosfórica.	47
Figura 15. a) Gráfico de efectos principales para flavonoides, b) Gráfico de superficie de respuesta estimada para vermicomposta y roca fosfórica, c) Gráfico de superficie de respuesta estimada para lixiviado y roca fosfórica, d) Gráfico de superficie de respuesta estimada para vermicomposta y lixiviado. MS= muestra seca, VC= vermicomposta, L= lixiviado y RF= roca fosfórica.	48

RESUMEN

Actualmente se ha incrementado la preocupación de las personas por consumir alimentos de origen natural ya que poseen compuestos que son benéficos para la salud, como es el caso de los fenoles y flavonoides, siendo estos también de importancia para las industrias cosmética y alimentaria; de la misma manera se ha buscado realizar cultivos utilizando alternativas naturales a los fertilizantes químicos sintéticos usados comúnmente en la agricultura, los cuales representan un fuente de contaminación al agua y al suelo e incluso riesgos a la salud. En el presente trabajo se tomaron como alternativas de fertilizantes la vermicomposta, el lixiviado de vermicomposta y la roca fosfórica y se evaluó su efecto en las características de crecimiento en plántulas de hierba santa (*Piper auritum* Kunth) durante 30 días; posteriormente se evaluó el efecto de la adición de estos tres biofertilizantes en la síntesis de fenoles totales y flavonoides presentes en los extractos metanólicos de las hojas, así como su actividad antirradical. Se encontró que el uso de lixiviado y roca fosfórica tuvo efecto significativo en altura de la planta, diámetro del tallo, número de hojas, peso fresco de la raíz, cantidad de fenoles totales y flavonoides mientras que el uso de lixiviado únicamente tuvo efecto estadístico significativo en el peso fresco del tallo. Debido a esto los insumos orgánicos utilizados pueden ser una alternativa viable de fertilización en la agricultura.

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

La producción y comercialización de productos biofertilizantes está encaminada al fortalecimiento de sistemas de producción sostenible, esto en respuesta a la preocupación que a nivel mundial se ha generado en la demanda de productos alimenticios sin o casi nula aplicación de pesticidas, que no solo repercuten en la contaminación ambiental, sino que también impactan en la salud humana como agentes tóxicos y carcinogénicos (Alarcón y Farrera, 2000). Los abonos orgánicos y fertilizantes naturales son los principales insumos que aportan nutrientes en la agricultura orgánica. Esta forma de producción se ha incrementado en los tiempos recientes, en el año 2000 se cultivaron en el mundo 15 millones de hectáreas, mientras que en el 2010 fueron 37 millones de hectáreas (Willer, 2012).

El fósforo es un elemento nutritivo esencial para las plantas y los animales. El uso adecuado y racional de las rocas fosfóricas como fuente de fósforo puede contribuir a la intensificación agrícola sostenible en los países en vías de desarrollo, en particular, en aquellos dotados con depósitos de roca fosfórica. Roca fosfórica es un nombre colectivo utilizado para denominar todos los minerales que contienen fosfatos.

El composteo consiste en la conversión biológica de diversos residuos de origen orgánico con base en el control de temperatura y agua, principalmente. El material que resulta de este proceso permite ser utilizado como biofertilizantes, ya que además de proporcionar nutrimentos para las plantas, tiene alto contenido de humus, por lo que es factible usarlo como mejorador de suelos (Santamaría, 1996; Montero, 1999).

Los abonos orgánicos líquidos llamados lixiviados de primera, segunda y tercera vuelta, son el resultante o producto obtenido del drenaje del regadío a canteros utilizados en la producción de lombrices (Reinés *et al.*, 2006). Reinés *et al.* (2006) señalan que en lixiviados de la lombricultura se pueden encontrar fosfatos, sulfatos, nitratos, carbonatos, iones nitratos solubles, hormonas vegetales

(giberelinas y auxinas), antibióticos y fungicidas, partículas sólidas de humus y oligoelementos.

Los fenoles o compuestos fenólicos son compuestos orgánicos en cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido a al menos un grupo funcional hidroxilo (Madiz *et al.*, 2011). Muchos son clasificados como metabolitos secundarios de las plantas, aquellos productos biosintetizados en las plantas que poseen la característica biológica de ser productos secundarios de su metabolismo. De acuerdo con su diversidad química, los fenoles tienen funciones muy diversas en las plantas. Muchos son productos de defensa ante herbívoros y patógenos. Otros participan en el soporte mecánico a la planta, en la atracción de polinizadores y dispersores de frutos, en la absorción la radiación ultravioleta, o actúan como agentes alelopáticos. Protegen a las plantas del daño por oxidación y realizan la misma función en los humanos. (Taiz y Zeiger, 2006). Los compuestos más simples son unidades individuales de fenol que se encuentran de forma abundante en las hierbas culinarias. Todos ellos tienen una larga historia de utilización como conservantes de los alimentos.

Los flavonoides representan una de las principales clases de fenoles vegetales. El esqueleto carbonado básico de los flavonoides contiene 15 átomos de carbono ordenado en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos (Taiz y Zeiger, 2006). En general, los flavonoides, actúan como antioxidantes neutralizando las moléculas reactivas llamadas "radicales libres". Poseen propiedades muy apreciadas en medicina, como antimicrobianos, anticancerígenos, disminución del riesgo de enfermedades cardíacas, entre otros efectos.

La demanda por aditivos naturales, incluyendo antioxidantes, se ha incrementado mundialmente en los años recientes. El creciente interés por reemplazar los antioxidantes sintéticos por naturales, obtenidos de diversas partes de plantas, ha promovido la investigación para obtener e identificar nuevos antioxidantes que pueden ser usados en alimentos. Las reacciones de oxidación no solo son

importantes para la industria de alimentos, también son requeridos para detener la oxidación de productos encontrados en las industrias cosmética, farmacéutica y plástica (Moure *et al.*, 2001).

La hierba santa (*Piper auritum* Kunth), es una planta tropical con propiedades medicinales. Endémica de América Central y América del Sur, se encuentra distribuida en gran cantidad en el estado de Chiapas y en el país.

Las hojas de la hierba santa son de amplio uso medicinal en los estados de Hidalgo, Veracruz, Oaxaca y Quintana Roo, donde se aplica sobre afecciones de la piel. También se emplea para padecimientos como infección de la matriz, galactógeno (aumentar la leche de las mujeres que amamantan) y para acelerar el parto, mediante las hojas remojadas en alcohol. También se usa en trastornos del aparato digestivo como dolor de estómago, dolor de muelas, falta de apetito, estreñimiento, diarrea e inflamación de estómago. Otros usos comunes de la hierba santa son para afecciones como asma, laringitis, reumatismo, desparasitante, llagas e irritación ocular y además tiene uso culinario. Se han realizado estudios en los cuales se ha demostrado que el aceite esencial de esta especie es efectivo contra diversos hongos fitopatógenos (Lam, 2011).

CAPÍTULO II ANTECEDENTES

2.1 Radicales libres y estrés oxidativo.

Los radicales libres, producidos normalmente durante el metabolismo aerobio se utilizan en diversos procesos fisiológicos como un mecanismo de defensa contra agentes infecciosos. Sin embargo, estas moléculas son altamente reactivas, capaces de dañar a las diversas biomoléculas de nuestras células ocasionando un fenómeno conocido como estrés oxidativo, el cual está asociado con diversas enfermedades crónico degenerativas, que afectan tanto la calidad como la esperanza de vida de los pacientes (Delgado *et al.*, 2010).

El oxígeno molecular (O_2), que se encuentra en el aire que respiramos, al ser utilizado por los organismos aerobios da lugar a la formación de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). La reducción del O_2 se produce a través de los electrones que escapan de la cadena respiratoria, dando origen al súper oxido (O_2^-), el cual puede dismutar fácilmente y formar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que en presencia de metales de transición como el hierro (Fe^{2+}) y el cobre (Cu^+), produce el radical hidroxilo (OH), mediante la reacción de Fenton (Roche y Romero, 1994), que es considerado la especie oxidante más dañina en los sistemas biológicos y el principal responsable del daño oxidativo.

Las ROS son también considerados radicales libres (RL), ya que son moléculas cuyos átomos carecen de un electrón (e^-), esto hace que sean muy reactivos porque toman el e^- que les falta de una molécula vecina, provocando así la oxidación de ésta última, que a su vez, al quedarse sin un e^- , se convierte en un RL con la capacidad de oxidar a otra molécula cercana, induciendo una reacción en cadena (Adam, 2005; Benezer *et al.*, 2008; Turrens, 2003).

2.1.1 Sistema de defensa antioxidante

Los procesos metabólicos normales de todos los organismos que utilizan oxígeno pueden producir especies reactivas del oxígeno (ROS), se estima que cerca del 2

al 5% del oxígeno total consumido se convierte en ROS (O_2^- , OH^- , H_2O_2 , O_2 , entre otros) (Murillo *et al.*, 2007).

En situación patológica se incrementan sustancialmente estas especies químicas, provocando una alteración orgánica conocida como estrés oxidativo caracterizado por el daño a biomoléculas, viéndose implicadas en el origen de numerosos procesos en el aparato cardiovascular (aterosclerosis, cardiopatía alcohólica), sistema neurológico (enfermedad de Parkinson, Alzheimer, traumatismos craneales), aparato ocular (catarata, fibroplasia), aparato respiratorio (cáncer de pulmón), riñón (nefrotoxicidad por metales), artritis reumatoide (Murillo *et al.*, 2007).

Si bien los organismos vivos soportan multitudinarios factores endógenos y exógenos de estrés oxidativo, también poseen numerosos sistemas de defensa antioxidantes regulables, enzimáticos (superóxido dismutasa, la catalasa, la GSH-peroxidasa, las quinonas reductasas y hemoxigenasa) y no enzimáticos (Se, Zn, vitaminas C y E y carotenoides) que conforman la defensa antioxidante frente a las ROS (Kim, 2003), pero que no siempre resultan ser una barrera efectiva.

Una alternativa válida son los vegetales, quienes contienen amplia variedad de compuestos con capacidad de atrapar ROS: vitaminas, carotenoides, compuestos nitrogenados (alcaloides, aminos, betalaínas) e incluso ciertos terpenoides; quizá los metabolitos más reconocidos por su actividad antioxidante son los de naturaleza fenólica: ácidos fenólicos, flavonoides, quinonas, cúmarinas, lignanos, estilbenos y taninos (Murillo *et al.*, 2007).

2.2 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos están formados por un grupo hidroxilo funcional unido a un anillo aromático (Figura 1) (Madiz *et al.*, 2011).

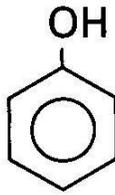


Figura 1. Estructura del fenol.

Los compuestos fenólicos de las plantas forman un grupo químicamente heterogéneo de unos 10,000 compuestos: algunos son solubles sólo en solventes orgánicos, otros son ácidos carboxílicos y glucósidos solubles en agua, mientras que otros son grandes polímeros muy insolubles. Los compuestos fenólicos de las plantas son biosintetizados en diferentes rutas, y por ello, constituyen un grupo heterogéneo desde el punto de vista metabólico. Existen dos rutas básicas implicadas: la ruta del ácido shiquímico y la ruta del ácido mevalónico. La ruta del ácido shiquímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los fenoles en las plantas. La vía del ácido mevalónico, aunque es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, es poco empleada en plantas superiores. La mayor parte de los compuestos fenólicos de las plantas derivan de la fenilalanina por la eliminación de una molécula de amonio para formar ácido cinámico (Figura 2) (Taiz y Zeiger, 2006).

Los compuestos fenólicos juegan un papel importante en los sistemas de defensa de las plantas contra plagas y enfermedades, incluyendo nemátodos que parasitan la raíz (Wuyts *et al.*, 2006). Una concentración elevada de ozono incrementa el contenido de fenoles totales en las hojas (Savirnata *et al.*, 2010). Estos compuestos comprenden: cumarinas, flavonoides, lignina, antocianinas, antocianidinas y taninos.

2.2.1 Fenoles simples y ácidos fenólicos

Son los compuestos fenólicos más simples y consisten en un anillo fenólico sustituido. Algunos ejemplos los constituyen el catecol, el pirogalol, y los ácidos cinámico y caféico (Figura 3).

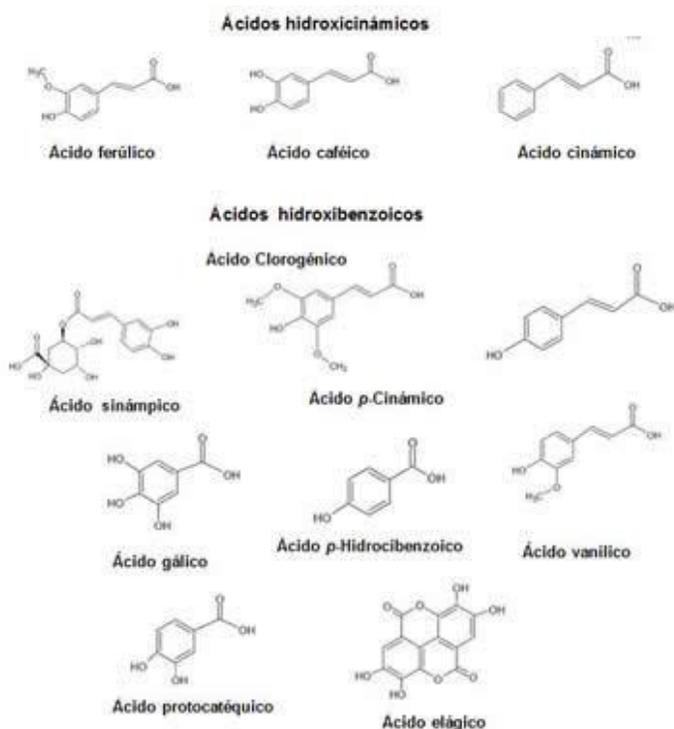


Figura 3. Ejemplos de fenoles simples y ácidos fenólicos.

2.2.2 Flavonoides

Entre los compuestos fenólicos también se encuentran los flavonoides (Figura 4). Su esqueleto carbonado contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos. Se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, siendo las principales antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas. Entre sus funciones se encuentra la defensa y la pigmentación.

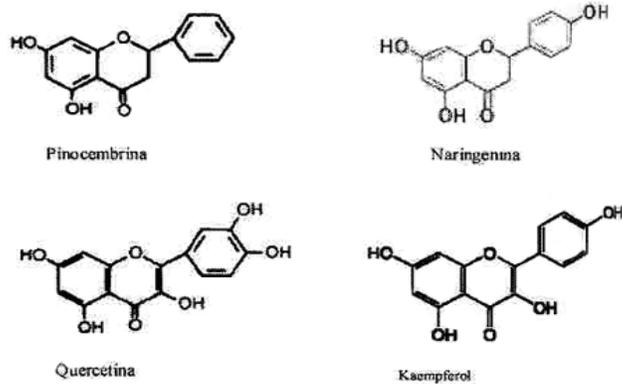


Figura 4. Ejemplo de flavonoides.

En la ruta de biosíntesis de flavonoides (Figura 5), la primera etapa consiste en la condensación de 3 moléculas de malonil-CoA con una molécula de p-cumaril-CoA. Esta reacción está catalizada por calcona sintasa y da lugar a naringerina calcona, precursor de los flavonoles y antocianinas. La misma condensación catalizada por la estilbeno sintasa conduce a la formación estilbenos implicados en mecanismos de defensa de plantas frente a patógenos (Taiz y Zeiger, 2006).

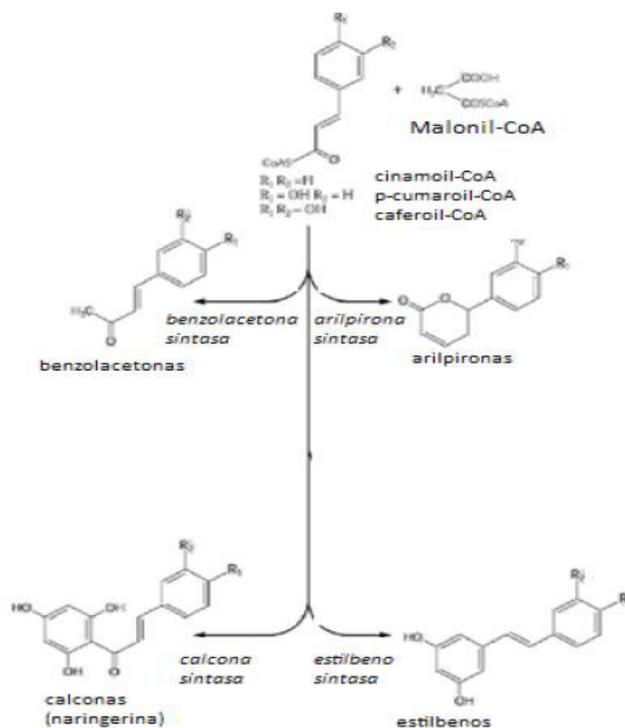


Figura 5. Biosíntesis de flavonoides.

2.2.3 Método de Folin-Ciocalteu para determinación de fenoles totales.

El ensayo de Folin-Ciocalteu cuantifica los fenoles totales de una muestra a través de su capacidad reductora, aunque no está directamente relacionada con la medición de actividad antioxidante, puede ser útil para tales estudios, en especial si se combina con otros métodos que evalúen dicha capacidad (Heimler *et al.*, 2010). Es uno de los métodos más antiguos para determinar el contenido de fenoles totales. Originalmente, el reactivo para determinar fenoles fue propuesto por Folin y Denis (1912), quienes descubrieron que una mezcla de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico reaccionaban con derivados fenólicos y al agregar un álcali, la reacción daba un color azul. Actualmente, considerando la heterogeneidad de los fenoles naturales y la posibilidad de interferencias de otras sustancias fácilmente oxidables, existen otros métodos que compiten con el de Folin-Ciocalteu, por ejemplo la titulación con permanganato, colorimetría con sales de hierro y absorbencia con luz UV, sin embargo ninguno es perfecto (Singleton *et al.*, 1999).

La técnica consiste en mezclar el reactivo comercial de Folin-Ciocalteu en un medio altamente básico (Na_2CO_3 al 5-10%, acuoso). Los polifenoles son fácilmente oxidables en medio básico por el reactivo de Folin -Ciocalteu, los fenoles en su pK (usualmente cerca de pH 10) se convierten en iones fenolatos quienes al perder un electrón producen un radical libre semiquinona, si se remueve otro electrón da una quinona o bien se produce la polimerización. La molécula que acepta ese electrón se reduce, así pues, lo que cuantifica la reacción es la reducción del fosfomolibdato de MoO_4^+ a MoO_3^+ que produce un color azul verdoso (Figura 6), este compuesto puede ser identificado y cuantificado por espectroscopía de UV/Vis debido a que absorbe a una longitud de 760 nm. El contenido de fenoles totales generalmente, se expresa en equivalentes de ácido gálico (Singleton *et al.*, 1999). Esta técnica, sólo se puede emplear en muestras hidrofílicas, dado que el ensayo se lleva a cabo en una fase acuosa (Huang *et al.*, 2005).

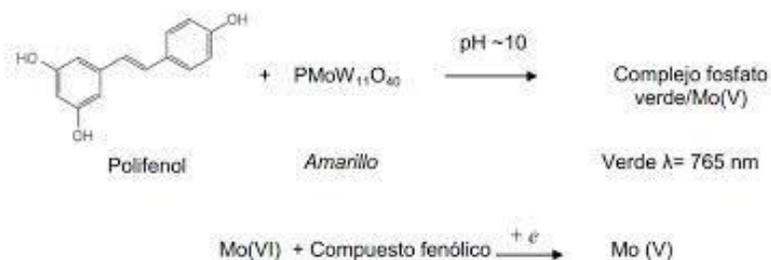


Figura 6. Mecanismo de acción de la reacción entre un compuesto fenólico y el reactivo de Folin- Ciocalteau.

2.2.4 Método de cloruro de aluminio para determinación de flavonoides.

La espectroscopia UV ha llegado a ser la mejor técnica para el análisis estructural de los flavonoides por dos principales razones: 1) requiere sólo una pequeña cantidad de sustancia pura y 2) la información estructural obtenida de un espectro UV se incrementa por el uso de reactivos específicos que reaccionan con uno o más grupos funcionales del núcleo de los flavonoides. La adición de cada uno de esos reactivos por separado a una solución alcohólica de los flavonoides induce cambios estructuralmente significativos en el espectro UV. Los cambios de este tipo son comúnmente inducidos por la adición de metóxido de sodio (NaOMe), acetato de sodio (NaOAc), acetato de sodio/ácido bórico (NaOAc/ H_3BO_3), cloruro de aluminio (AlCl_3) y cloruro de aluminio/ácido clorhídrico (AlCl_3/HCl) (Markham y Mabry, 1975). Estudios más recientes emplean cloruro de aluminio/acetato de potasio ($\text{AlCl}_3/\text{KOAc}$) (Salamanca *et al.*, 2007).

Se basa en la formación de un complejo resultante de la quelación con Al de los grupos 5-hidroxi-4-ceto, 3-hidroxi-4-ceto y O-dihidroxi (Figura 7), que puede ser evidenciado y cuantificado por desplazamientos batocrómicos de una o ambas bandas características de los flavonoides en el espectro.

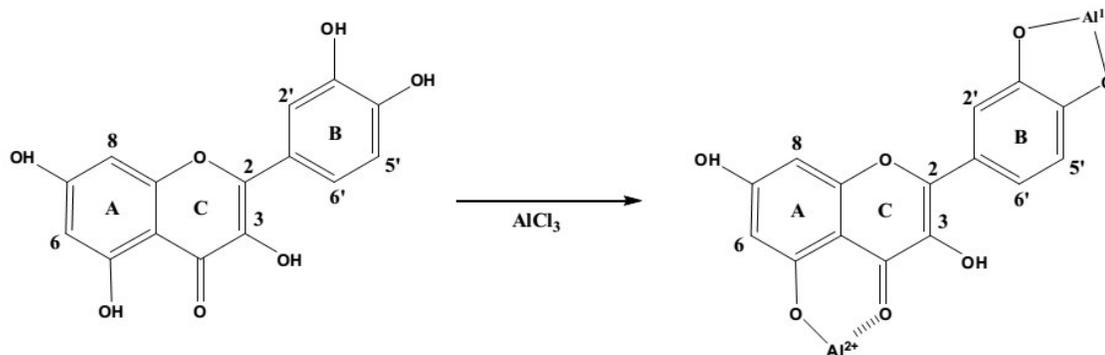


Figura 7. Formación del complejo de coordinación de color amarillo debido a la quelación de Al con el flavonol quercetina.

La estabilidad relativa de los complejos ocurre en el siguiente orden: 3-hidroxi (flavonol) > 5-hidroxi (flavona) > 5-hidroxi (flavanona) > grupos O-dihidroxi > 3-hidroxi (dihidroflavonol) (Markham y Mabry, 1975).

2.2.5 Actividad antirradical

Uno de los grupos más estudiados dentro de los compuestos fenólicos ha sido el de los flavonoides, debido a su distribución numerosa y a su actividad antioxidante elevada, siendo el subgrupo de los flavonoles el más estudiado. La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de especies reactivas del oxígeno (ROS), además de la inhibición de enzimas, tales como: lipoxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y NADPH oxidasa; evitando así la formación de ROS e hidroxiperóxidos orgánicos. También se ha visto que flavonoides como catequina, epicatequina, epigalocatequina, epicatequina galato y epigalocatequina galato reducen la producción de radicales libres por inhibición de la xantina oxidasa (XO), enzima que cataliza la oxidación de hipoxantina y xantina a ácido úrico (Dörner *et al.*, 2006).

2.2.6 Ensayo con DPPH para determinar actividad antirradical.

El 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) es un radical libre estable en virtud de su deslocalización electrónica sobre toda la molécula (Figura 8). Esta resonancia, le

proporciona un profundo color violeta, además de que impide su dimerización (Molyneux, 2004).

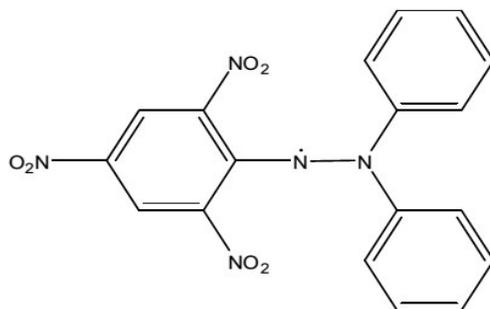
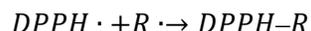
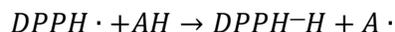
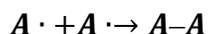


Figura 8. Estructura química del 2,2-difenil-1-picrilhidracilo.

Brand *et al* (1995) reportaron por primera vez el método, con el que evaluaron la actividad antioxidante de diversos compuestos y extractos usando el DPPH• en una solución metanólica. En su forma de radical libre, el DPPH• absorbe a 515 nm y cuando se reduce por acción de un antioxidante (AH) o de un radical (R•), la absorción desaparece.



En consecuencia, la desaparición del DPPH• proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales. El modelo que explica la actividad de un compuesto como antirradical se ejemplifica con la siguiente ecuación:



Donde AH es un antioxidante que actúa como antirradical donando átomos de hidrógeno, dando como resultado radicales con estructuras moleculares estables que detendrán la reacción en cadena, tal es el caso de los fenoles. El nuevo radical formado (A•) puede interactuar con otro radical para formar moléculas estables (DPPH-A, A-A) (Molyneux, 2004).

2.3 Género *Piper*

La familia *Piperaceae* comprende diez géneros y unas 3,000 especies de distribución tropical. Entre los cuales, el género *Piper* está conformado por más de 1,200 especies (Flores, 2006).

Las especies del género *Piper* tienen importancia comercial, económica y medicinal. Las semillas de *P. nigrum* constituyen la conocida “pimienta negra”, utilizada como condimento en la preparación de alimentos. Otras especies son consideradas remedios para el dolor de estómago, para aliviar dolores de pecho, fiebre y afecciones hemorroides, como antiinflamatorio, en el tratamiento del asma, bronquitis; igualmente se les reconocen actividad insecticida y fungicida (Parmar *et al.*, 1997). Recientemente, extractos de varias especies de *Piper*, colectadas en Colombia, han mostrado una moderada actividad antiplasmodial y baja actividad citotóxica (Mesa *et al.*, 2012). Las especies del género *Piper* han sido ampliamente investigadas y los estudios fitoquímicos han conducido al aislamiento de una amplia variedad de metabolitos secundarios (Virinder *et al.*, 1997) a los que se atribuyen sus propiedades.

2.3.1 Hierba santa (*Piper auritum* Kunth)

La clasificación taxonómica de la hierba santa es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Manoliopsida

Orden: Piperales

Familia: Piperaceae

Género: *Piper*

Especie: *auritum*

Nombre binomial: Kunth

2.3.1.1 Generalidades

Piper auritum Kunth, hierba santa u hoja santa, es un arbusto de hojas frondosas de 2 m de altura. Las hojas son acorazonadas y grandes, de color verdoso (Figura 9). Las flores están colocadas en espigas parecidas a cordoncillos de color verde



Figura 9. Hojas y flores de *Piper auritum* Kunth.

pálido. Al estrujarse las hojas despiden un olor agradable. Ésta planta se encuentra en la lista de la agencia del gobierno de los Estados Unidos Food and Drug Administration (FDA), (Administración de Drogas y Alimentos, por sus siglas en inglés) para su uso como saborizante de alimentos (Diego, 2011).

2.3.1.2 Características de crecimiento y distribución geográfica.

Es una especie originaria de México, distribuida en la parte sur del continente Americano, habita en climas cálido, semicálido y semiseco desde el nivel del mar hasta los 2000 m. Crece a orillas de caminos en vegetación de bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio, perennifolio y bosque mixto de pino-encino de terreno semiseco (Diego, 2011). Es cultivada también, ya que crece fácilmente y puede ser sembrada en cualquier época del año.

2.4 Fertilizantes

Puede ser llamado fertilizante cualquier material natural o industrializado, que contenga al menos cinco por ciento de uno o más de los tres nutrientes primarios (N, P₂O₅, K₂O). Fertilizantes fabricados industrialmente son llamados fertilizantes minerales.

Dieciséis elementos son esenciales para el crecimiento de una gran mayoría de plantas y éstos provienen del aire y del suelo circundante. En el suelo, el medio de transporte es la solución del suelo. Los elementos siguientes son derivados: a. del aire: carbono (C) como CO₂ (dióxido de carbono); b. del agua: hidrógeno (H) y oxígeno (O) como H₂O (agua); c. del suelo, el fertilizante y abono animal: nitrógeno (N), las plantas leguminosas obtienen el nitrógeno del aire con la ayuda de bacterias que viven en los nódulos de las raíces (*Rhizobium/ Mycorrhizae*), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), azufre (S), hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), cobre (Cu), boro (B), molibdeno (Mo) y cloro (Cl).

Estos nutrientes y sus promedios porcentuales en la sustancia seca de la planta son mostrados en la Figura 10. Otros elementos químicos son tomados en cuenta. Estos pueden ser nutrientes beneficiosos para algunas plantas, pero no esenciales para el crecimiento de todas. Los fertilizantes, abonos o residuos de cultivos aplicados al suelo aumentan la oferta de nutrientes de las plantas (IFA, 1992).

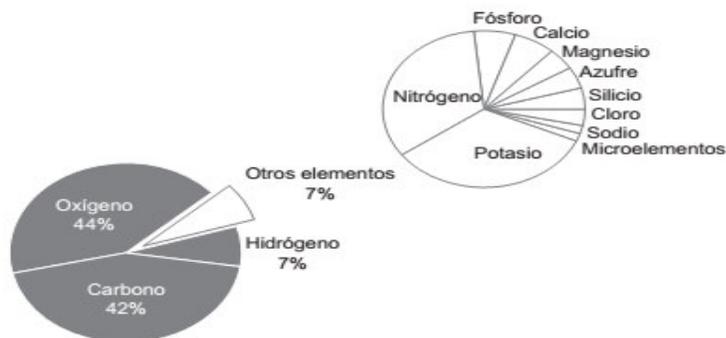


Figura 10. Composición elemental promedio de las plantas (IFA, 1992)

Los fertilizantes nitrogenados se caracterizan por su baja eficiencia en su uso por los cultivos, misma que puede ser menor al 50% (Keeney, 1982), lo que trae como consecuencia un impacto ambiental adverso, tal como contaminación de mantos acuíferos con NO_3^- , eutrofización, lluvia ácida y calentamiento global (Ramanathan, *et al.*, 1985). Otro problema no menos importante es la contaminación de aguas superficiales y subterráneas con nitratos y la emisión de gases de nitrógeno a la atmósfera (NO y N_2O) que es consecuencia del uso inadecuado de fertilizantes nitrogenados (Castellanos y Peña, 1990; Puckett, 1995; Gilliam *et al.*, 1985) y de la aplicación de láminas inapropiadas de agua de riego, y asociado a esto, está el riesgo de acumulación de nitratos en frutos y verduras comestibles, así como en acuíferos, lo cual es de alto riesgo para la salud humana cuando la concentración de NO_3^- supera el 0.2% en las partes comestibles de las plantas como frutos de hortalizas o verduras y en agua potable llega a 10 ppm (Malakouti, *et al.*, 1999).

Los biofertilizantes son preparados de microorganismos aplicados al suelo y/o planta con el fin de sustituir parcial o totalmente la fertilización sintética así como disminuir la contaminación generada por los agroquímicos.

El aumento de la concientización sobre el cuidado del medio ambiente y la evidencia del deterioro ambiental que causan los agroquímicos ha hecho que los productores agrícolas, vean como buena alternativa la aplicación de los biofertilizantes, la mayor demanda de abonos orgánicos por los productores agrícolas vienen siendo los fermentados líquidos (compostas líquidas y biofertilizantes líquidos) que al aplicarse al suelo tienen importantes beneficios entre los que destacan, el aumento en los nutrientes (Ma *et al.*, 2003); mejoramiento de la capacidad del suelo para retener agua; mejores condiciones físicas para el desarrollo de las raíces y el laboreo del suelo (Badaruddin *et al.*, 1999); control de algunas enfermedades del suelo que causan la pudrición de raíces, y un aumento en la actividad microbiana (Litterick *et al.*, 2004).

2.4.1 Vermicomposta

Las lombrices de tierra son consumidores voraces de residuos orgánicos y aun cuando sólo utilizan sólo una pequeña porción para la síntesis en sus cuerpos, ellas excretan una gran parte de los residuos consumidos en una forma parcialmente digerida. Puesto que los intestinos de las lombrices contienen una amplia gama de microorganismos, enzimas, hormonas, etc., éstos materiales se descomponen rápidamente y son transformados a una forma de vermicomposta en un período de tiempo corto (Figura 11) (Ghosh *et al.*, 1999).



Figura 11. Vermicomposta.

Hoy en día existen diversas evidencias de que las lombrices de tierra provocan diferentes efectos benéficos, físicos, químicos y biológicos, sobre los suelos y diversos investigadores han demostrado que estos efectos pueden incrementar el crecimiento de la planta y el rendimiento de los cultivos tanto en ecosistemas naturales como en los ecosistemas manejados. Estos efectos se han atribuido al mejoramiento de las propiedades y la estructura del suelo, a una mayor disponibilidad de los elementos nutritivos para las plantas, y a una creciente población microbiana y metabolitos biológicamente activos, como los reguladores de crecimiento de la planta (Atiyeh *et al.*, 2002).

Las lombrices, durante el proceso de alimentación, fragmentan los residuos, incrementan la actividad microbiana y los índices de descomposición y/o

mineralización de los residuos orgánicos, alteran las propiedades físicas y químicas de los materiales, provocando un efecto de composteo o humificación mediante el cual la materia orgánica inestable es oxidada y estabilizada. El producto final, comúnmente llamado vermicomposta es obtenido conforme los residuos orgánicos pasan a través del intestino de la lombriz, y es bastante diferente al material original (Atiyeh *et al.*, 2000a). Además, se ha demostrado que bajo la acción de las lombrices se incrementa tanto la velocidad de mineralización del N como los índices de conversión del NH_4^+ a NO_3^- (Atiyeh *et al.*, 2000b; Atiyeh *et al.*, 2000c; Atiyeh *et al.*, 2002).

Mientras los microorganismos son responsables de la degradación bioquímica de la materia orgánica en el proceso de vermicomposteo, las lombrices son importantes para acondicionar el sustrato y para promover la actividad microbiana. Las lombrices actúan como batidoras mecánicas ya que éstas desintegran el material orgánico, incrementan el área superficial expuesta a los microorganismos y mueven los fragmentos y los excrementos ricos en bacterias, en consecuencia homogenizan el material orgánico (Domínguez *et al.*, 2003). Adicionalmente, la actividad de las lombrices en el proceso de vermicomposteo es tanto física/mecánica y bioquímica.

Los procesos mecánicos incluyen: aeración del sustrato, mezclado, y molienda. El proceso bioquímico es afectado por la descomposición microbiana del sustrato en el intestino de las lombrices (Buck *et al.*, 2000).

2.4.2 Lixiviado

Los abonos orgánicos líquidos llamados lixiviados de primera, segunda y tercera vuelta, son el resultante o producto obtenido del drenaje del regadío a canteros utilizados en la producción de lombrices (Figura 12) (Reinés *et al.*, 2006).

Reinés *et al.*, (2006) señalan que en lixiviados de la lombricultura se pueden encontrar fosfatos, sulfatos, nitratos, carbonatos, iones nitratos solubles, hormonas

vegetales (giberelinas y auxinas), antibióticos y fungicidas, partículas sólidas de humus y oligoelementos.



Figura 12. Lixiviado de vermicomposta.

También se observa que la lombriz de tierra lleva a cabo una disminución drástica de microorganismos patógenos que se encuentran en las excretas cuando estas pasan por el tracto digestivo de las lombrices.

La presencia de elementos mayores como el nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y elementos menores como el hierro, cobre, zinc y cloro, considerados con funciones esenciales para la nutrición de las plantas (Ortiz y Ortiz, 1990), confirman lo señalado por Reinés *et al.* (2006), al considerar al lixiviado de lombriz como un subproducto de calidad que puede emplearse como biofertilizante para aplicación foliar o al suelo. Los valores encontrados de materia orgánica, carbono orgánico, ácidos fúlvicos y ácidos húmicos, confirman la importante función de estos (Reinés *et al.*, 2006) como desestresantes, protectores contra plagas por su textura pegajosa, antibióticos (por las sustancias antibióticas que producen los microorganismos que conviven en las lombrices en el criadero y que también se encuentran en los lixiviados).

También se señala que los lixiviados aplicados al follaje en plantas cultivadas, por su control de patógenos, pueden sustituir a los fungicidas y bactericidas químicos, generando así ahorros económicos importantes. Los procesos de biodegradación

de materiales orgánicos contemplan bioquímicamente la formación de sustancias húmicas tales como los ácidos húmicos, y ácidos fúlvicos, denominados componentes principales del humus (Stevenson, 1994).

2.4.3 Roca fosfórica

El fósforo es un elemento ampliamente distribuido en la naturaleza y ocurre conjuntamente con el nitrógeno y el potasio como constituyente primario de los seres vivos, vegetales y animales. El fósforo posee una serie de funciones en el metabolismo vegetal y es uno de los nutrientes esenciales requeridos para el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Desempeña funciones estructurales en las macromoléculas como los ácidos nucleicos y de transferencia de la energía en los procesos metabólicos de biosíntesis y degradación. A diferencia de los nitratos y sulfatos, los fosfatos no son reducidos en la planta y permanecen en su forma más altamente oxidada (Marschner, 1993).

El fósforo es absorbido principalmente durante el crecimiento vegetativo y luego la mayoría del fósforo absorbido es movilizado a los frutos y semillas durante las etapas reproductivas. Las plantas con deficiencias de fósforo tienen un crecimiento retardado (reducción del crecimiento celular y de la expansión foliar así como de la fotosíntesis y de la respiración) y a menudo presentan un color verde oscuro (más alta concentración de clorofila) y rojizo (aumento de la formación de antocianinas). Se ha indicado que el nivel de abastecimiento de fósforo durante los estados reproductivos regula el fraccionamiento entre las hojas y los órganos reproductivos, siendo este efecto esencial para las leguminosas fijadoras de nitrógeno (Marschner, 1993).

Las características fisicoquímicas del fósforo en los suelos minerales son bastante complejas debido a la ocurrencia de una serie de reacciones simultáneas e instantáneas tales como solubilización, precipitación, adsorción (retención/desorción) y oxido-reducción. Los compuestos solubles del fósforo presentan reactividad muy alta, solubilidad baja y movilidad reducida. La

mineralización e inmovilización son procesos importantes del ciclo del fósforo en los suelos con alto contenido de materia orgánica (Black, 1968; FAO, 1984).

Cuando se aplica al suelo un fertilizante fosfatado soluble en agua, este reacciona rápidamente con los compuestos del suelo, los productos resultantes son compuestos de fósforo menos solubles y fósforo que es adsorbido sobre las partículas coloidales del suelo (FAO, 1984). Fox y Kamprath (1970) y Barber (1995) han sugerido que una concentración de 0,2 ppm de fósforo es suficiente para un crecimiento óptimo. Sin embargo, para que las plantas absorban las cantidades de fósforo necesarias para producir buenos rendimientos, la concentración de fósforo en la solución suelo que está en contacto con las raíces debe ser renovada continuamente durante todo el ciclo de crecimiento. Una pequeña concentración de fósforo en la solución del suelo es por lo general adecuada para el desarrollo normal de las plantas.

Se denomina roca fosfórica al producto obtenido de la extracción de una mina y del procesamiento metalúrgico subsiguiente de los minerales fosfatados, es el nombre común comercial de unos 300 fosfatos de diferentes calidades conocidos en el mundo (Hammond y Day, 1992). Las rocas fosfóricas (Figura 13) pueden ser utilizadas ya sea como materia prima para la fabricación industrial de los fertilizantes fosfatados solubles en agua o bien como fuentes de fósforo para la aplicación directa en la agricultura.



Figura 13. Roca fosfórica granulada.

Además del mineral fosfatado principal, los depósitos de roca fosfórica también poseen minerales accesorios e impurezas. Si bien cantidades importantes de los minerales accesorios y de las impurezas son eliminadas durante el proceso de beneficio, el mineral beneficiado siempre contiene algunas de las impurezas originales. Tales impurezas incluyen sílice, minerales arcillosos, calcita, dolomita y óxidos hidratados de hierro y aluminio en diversas combinaciones y concentraciones, algunos de los cuales pueden tener una influencia profunda en la eficiencia de la roca fosfatada utilizada para la aplicación directa (FAO, 1984). Los depósitos de roca fosfórica se hallan ampliamente distribuidos en todo el mundo, tanto geográfica como geológicamente y los enormes recursos existentes son capaces de satisfacer la demanda estimada en un futuro previsible.

Las rocas fosfóricas de origen sedimentario son aptas para aplicación directa porque consisten de agregados de microcristales ampliamente abiertos y débilmente consolidados, con un área específica relativamente grande. Presentan una proporción considerable de sustitución isomórfica en la red cristalina y contienen minerales accesorios e impurezas en cantidades y proporciones variables. Diversos autores han indicado que estas rocas son adecuadas para la aplicación directa a los suelos bajo ciertas condiciones (Khasawneh y Doll, 1978; Chien y Friesen, 1992; Rajan *et al.*, 1996; Zapata, 2003).

2.5 Importancia de los biofertilizantes

La aplicación de materia orgánica humificada aporta nutrientes y funciona como base para la formación de múltiples compuestos que mantienen la actividad microbiana, como son ácidos húmicos, fúlvicos y huminas, que al incorporarlas ejercerán distintas reacciones en el suelo como mejorar su estructura facilitando la formación de agregados estables con lo que mejora la permeabilidad, aumenta la fuerza de cohesión a suelos arenosos y disminuye esta en suelos arcillosos; mejora la retención de humedad en el suelo y la capacidad de retención del agua (Tisdale y Nelson, 1966; Guerrero,1996; Bollo,1999) estimula el desarrollo de plantas; mejora y regula la velocidad de infiltración del agua, disminuyendo la erosión producida por el escurrimiento superficial.

Los cultivos fertilizados de manera orgánica han demostrado tener mayor contenido de metabolitos secundarios (Dossier, 2007), lo cual puede deberse a que estos cultivos no tienen tratamiento químico por lo que deben mejorar su defensa contra insectos y patógenos.

CAPÍTULO III JUSTIFICACIÓN

El método más empleado en el campo para la fertilización es el químico, sin embargo, el uso indiscriminado de fertilizantes y plaguicidas sintéticos ha ocasionado no solo la aparición de poblaciones de insectos cada vez más resistentes a estos productos, sino también un impacto ambiental negativo, afectando a los enemigos naturales, contaminando las capas freáticas y el aire (Albert, 2007).

Por esta razón, se ha considerado a los fertilizantes y abonos naturales como un campo apropiado para la búsqueda de nuevas estructuras con menor impacto ambiental y con potencial para el control de plagas agrícolas, conservación de alimentos (antioxidantes obtenidos de plantas y frutas) y en el área medicinal dando origen a nuevas e interesantes líneas de investigación en los países de América Latina (Mancebo *et al.* 2000, Rodríguez *et al.* 1982).

La hierba santa (*Piper auritum* Kunth), es una planta endémica de América Central y América del Sur, y se encuentra distribuida en gran cantidad en el estado de Chiapas. En este estudio se evaluarán los efectos de la fertilización en plántulas de hierba santa con vermicomposta, lixiviado y roca fosfórica sobre el crecimiento y el contenido de polifenoles en los extractos metanólicos de las hojas y su actividad antirradical. Con esto se espera aumentar la concentración y la capacidad antioxidante de los polifenoles contenidos en la hierba santa y obtener mejores características de crecimiento.

CAPÍTULO IV OBJETIVOS

4.1 General

Evaluar el efecto de la fertilización con vermicomposta, lixiviado y roca fosfórica en las plantas de hierba santa (*Piper auritum* Kunth) sobre las características de crecimiento y la síntesis de compuestos fenólicos y su actividad antirradical.

4.2 Específicos

Determinar el efecto de la fertilización con vermicomposta, lixiviado y roca fosfórica sobre las características de crecimiento de la planta de hierba santa (altura, tallo, entrenudos, hojas y raíces).

Cuantificar la concentración de fenoles totales y flavonoides en los extractos metanólicos de las hojas de *Piper auritum* Kunth cultivadas orgánicamente

Determinar la actividad antirradical del extracto metanólico de hojas de hierba santa provenientes de plantas cultivadas con vermicomposta, lixiviado y roca fosfórica.

Optimizar las dosis de vermicomposta, lixiviado y roca fosfórica para maximizar la producción de fenoles totales y flavonoides y para obtener el máximo crecimiento.

CAPÍTULO V MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Recolección de material vegetal

Las plantas de *Piper auritum* se obtuvieron a partir de esquejes que fueron cultivadas en vivero por cuatro meses, se especificaron los tratamientos de acuerdo con un diseño de tres niveles y tres factores de Box-Behnken con tres repeticiones en el punto central. Las variables y sus niveles seleccionados fueron vermicomposta (5, 10 y 15 ml planta⁻¹), lixiviado (10, 20 y 30 g planta⁻¹), y roca fosfórica (1, 2 y 3 g planta⁻¹). Se obtuvieron un total de quince tratamientos y se repitió cuatro veces para que un total de 60 plantas fueran utilizadas.

Las plantas de hierba santa fueron colectadas a partir de 30 días de aplicación de vermicomposta, lixiviado y roca fosfórica, se tomaron las mediciones de altura, diámetro del tallo número de hojas, numero de entrenudos y peso fresco y seco de tallo, hojas y raíz.

Las hojas de hierba de santa recolectadas fueron deshidratadas en un horno al vacío a 60°C. Posteriormente se registró el peso seco y las muestras fueron molidas en un molino eléctrico hasta obtener un polvo fino. Las muestras pulverizadas se guardaron a temperatura ambiente en bolsas de papel estraza protegidas de la luz.

5.2 Obtención de extractos metanólicos

Se pesaron entre 500 y 100 mg de hojas pulverizadas de cada muestra, las cuales se colocaron en tubos Falcon de 50 mL y se adicionaron 20 mL de metanol por cada gramo de muestra seca, cada muestra fue sometida a un tratamiento con sonicación durante dos horas a temperatura ambiente, y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a 4° C. El sobrenadante fue evaporado a vacío en un rotavapor a una temperatura de 45° C. El residuo se resuspendió en 2 mL de metanol y se almaceno a -20° C en tubos Eppendorf protegidos de la luz hasta su uso.

5.3 Determinación de compuestos fenólicos

5.3.1 Fenoles totales (método de Folin – Ciocalteu)

La concentración de fenoles totales se determinó empleando método de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999), que determina la capacidad que tienen los polifenoles para reducir el Mo (VI) a Mo (V), como resultado de tal reacción, el reactivo de color amarillo adquiere un intenso color azul que se mide con el espectrofotómetro. Para ello se realizó una curva patrón de ácido gálico a las siguientes concentraciones de ácido gálico: 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1 mg/mL.

En tubos de ensayo se agregaron 50 μ L de cada concentración de ácido gálico, luego se agregaron 2.1 mL de agua destilada y 0.25 mL de reactivo de Folin – Ciocalteu, los tubos fueron agitados durante 1 minuto en un vórtex, posteriormente se añadieron 0.5 mL de solución de carbonato de sodio al 20%, nuevamente se agregó 2.1 mL de agua destilada y se dejó reposar por dos horas en la oscuridad, transcurrido el tiempo se midieron las absorbancias a 765 nm. Para realizar el blanco se añadieron 50 μ L de agua destilada en lugar de la solución de ácido gálico. Para cuantificar cada muestra, se agregaron 50 μ L de los extractos con una dilución 1:50. Las pruebas se realizaron por triplicado.

5.3.2 Flavonoides (método del cloruro de aluminio)

El análisis del contenido de flavonoides se determinó mediante el método colorimétrico del tricloruro de aluminio (Chang *et al.*, 2002). Una alícuota de 0.5 mL de cada extracto diluido 1:100 se mezcló con 1.5 mL de Etanol al 95% y 100 μ L de tricloruro de aluminio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) al 10%, luego de agitar se agregó 100 μ L de acetato de potasio 1M y 2.8 mL de agua destilada. La mezcla se dejó en reposo durante 30 minutos. Se leyó la absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro. El resultado fue expresado en equivalentes de quercetina a partir de una curva patrón obtenida con diferentes concentraciones de quercetina (0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09 y 0.1 mg/mL).

5.4 Determinación de actividad antirradical

5.4.1 Método del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

La actividad antirradical de los extractos se determinó en términos de la habilidad de donar hidrógeno o de atrapar radicales, utilizando el radical estable DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo), de la muestra; se procedió según la metodología citada por Mensor *et al.* en 2001 con algunas modificaciones. Se tomaron diluciones de cada muestra de 0.5, 2, 4, 6, 8 y 10 µg/mL y en cada tubo se colocaron 2.5 mL de cada concentración, posteriormente se agregó 1 mL de una solución etanólica 0.3 mM de DPPH, se dejó reposar por 30 minutos en la oscuridad y se leyó a 518 nm en un espectrofotómetro. Se preparó un blanco muestra con 2.5 mL de muestra y 1 mL de etanol al 96%, así mismo, se preparó un control negativo con 2.5 mL de etanol al 96% y 1 mL de solución de DPPH. El espectrofotómetro se ajustó a cero utilizando etanol al 96%.

Como estándar se utilizaran diluciones de 0.5, 1,1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6 y 8 µg/mL de ácido ascórbico.

Los resultados se expresaron como porcentaje de actividad antirradical (AA%) calculado mediante la siguiente fórmula:

$$AA\% = 100 - \left[\frac{(Abs\ m - Abs\ b)(100)}{Abs\ c} \right]$$

Dónde:

AA% es el porcentaje de actividad antirradical

Abs *m* es la absorbancia de la muestra

Abs *b* es la absorbancia del blanco muestra

Abs *c* es la absorbancia del control negativo

La concentración efectiva media (EC50) se determinó mediante una regresión lineal, graficando AA% vs Concentración (µg/mL).

5.5 Diseño experimental y análisis estadístico.

El diseño experimental empleado es un modelo de superficie de respuesta de tres niveles y tres factores de Box-Behnken con tres repeticiones en el punto central y un total de 60 muestras (cuadro 1). El efecto del tratamiento se determinó mediante análisis de varianza con un nivel de significación del 95% y la prueba se llevó a cabo por diferencia significativa media. La calidad del ajuste del modelo fue expresada por el coeficiente de determinación R^2 . La significación del coeficiente de regresión se puso a prueba por un t-test. El nivel de significación fue de $P < 0.05$. A continuación, un método de cálculo diferencial se utilizó para predecir el resultado óptimo. Se aplicó una regresión no lineal utilizando el software Statgraphics Plus (Statgraphics Plus 5.1, 2001) para graficar la superficie de respuesta. Se utiliza la siguiente ecuación polinómica y R^2 determina la calidad del ajuste del modelo.

$$y = a + b(x_1) + c(x_2) + d(x_3) + e(x_1)(x_2)(x_3) + f(x_1)(x_2) + g(x_1)(x_3) + h(x_2)(x_3) + i(x_1^2) + j(x_2^2) + k(x_3^2)$$

Donde y es la respuesta y x_1 , x_2 y x_3 los factores (vermicomposta, lixiviado y roca fosfórica) y a , b , c , d , e , f , g , h , i , j , k son los parámetros a identificar.

Cuadro 1. Niveles reales y codificados de los parámetros del diseño.

Factores	Niveles		
	Bajo (-1)	Central (0)	Alto (+1)
(X_1) vermicomposta (g planta ⁻¹)	10	20	30
(X_2) lixiviado(mL planta ⁻¹)	5	10	15
(X_3) roca fosfórica (g planta ⁻¹)	1	2	3

CAPÍTULO VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Características de crecimiento.

La altura de las plantas de hierba santa biofertilizadas varió en un rango de 4.0 a 8.6 cm, el diámetro del tallo fue desde 6.7 hasta 12.1 mm, el número de hojas fue de 1.5 hasta 3 y el número de entrenudos fue de 4.3 a 6.3 en los diferentes tratamientos experimentales (Cuadro 2). El análisis de varianza ANOVA mostró que la adición de vermicomposta, lixiviado y roca fosfórica como biofertilizantes en la planta de Hierba Santa (*Piper auritum* Kunth) no tuvo efecto estadístico significativo ($p \leq 0.05$) sobre los parámetros de crecimiento de la planta (Cuadro 3). Sin embargo, se encontró diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$) entre las diferentes dosis de lixiviado y roca fosfórica aplicadas y que se observa en el peso fresco de la raíz y peso seco de la raíz, presentando valores de 4.3 a 6.7 g y 0.6 a 0.2 g respectivamente, mientras que la vermicomposta únicamente tuvo diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$) en el peso fresco del tallo que tiene valores de 6.4 a 12.8 g (Cuadro 4).

Cuadro 2. Parámetros de crecimiento de plántulas de *Piper auritum* Kunth después de 30 días de crecimiento

Tratamiento	Dosis			Parámetros de crecimiento				
	Vermicomposta	Lixiviado	Roca fosfórica	Altura ^a	Diámetro del tallo ^a	Número de hojas ^a	Número de entrenudos ^a	Peso fresco del tallo ^a
	—g planta ⁻¹ —	—ml planta ⁻¹ —	— g planta ⁻¹ —	—cm—	—mm—			—g planta ⁻¹ —
1	20	10	2	5.5±1.86	9.7±1.03	2.0±0	6.3±1.25	10.2±2.99
2	10	5	2	5.3±0.96	9.7±1.73	1.8±0.96	5.5±1.0	6.4±2.07
3	30	5	2	5.2±1.43	10.1±1.44	2.0±0	5.3±0.47	7.2±2.24
4	10	15	2	4.0±2.16	10.6±0.75	2.0±0.82	5.8±1.26	8.8±3.35
5	30	15	2	7.7±0.94	6.7±4.47	3.0±1.15	4.3±2.22	7.8±5.90
6	10	10	1	4.3±1.31	10.8±2.12	3.0±0.82	5.0±0.82	8.9±4.71
7	30	10	1	6.5±0.91	10.9±2.81	2.3±0.5	5.8±0.5	9.8±4.05
8	20	10	2	6.8±1.89	11.2±1.26	1.8±0.96	6.0±0	12.8±1.44
9	10	10	3	8.6±3.12	9.8±1.40	2.5±0.58	5.8±0.96	9.1±4.16
10	30	10	3	7.8±2.18	12.1±1.75	2.0±0.82	6.0±0	12.1±3.23
11	20	5	1	7.3±1.54	10.0±0.24	2.0±0	5.6±0.42	12.1±1.14
12	20	15	1	6.9±3.01	9.0±0.41	2.3±0.47	6.0±0	7.5±2.91
13	20	5	3	5.5±1.47	11.7±1.10	1.5±0.41	5.0±0	10.3±1.43
14	20	15	3	7.3±4.03	11.2±0.85	2.0±0	5.3±0.94	10.9±2.22
15	20	10	2	6.0±2.34	10.3±0.50	2.0±0	5.0±0.82	9.2±1.11
LSD (0.05)				4.6	5.4	1.5	2.08	6.3

^a Los valores son el promedio de cuatro repeticiones.

Cuadro 2. (Continuación) Parámetros de crecimiento de plántulas de *Piper auritum* Kunth después de 30 días de crecimiento.

Tratamiento	Dosis			Parámetros de crecimiento				
	Vermicomposta	Lixiviado	Roca fosfórica	Peso fresco hojas ^a	Peso fresco raíz ^a	Peso seco tallo ^a	Peso seco hojas ^a	Peso seco raíz ^a
	—g planta ⁻¹ —	—ml planta ⁻¹ —	— g planta ⁻¹ —	—g planta ⁻¹ —	—g planta ⁻¹ —	—g planta ⁻¹ —	—g planta ⁻¹ —	—g planta ⁻¹ —
1	20	10	2	6.6±1.48	6.4±1.56	1.8±0.37	0.9±0.22	1.3±0.34
2	10	5	2	5.3±3.91	5.8±2.20	2.3±1.30	0.9±0.42	1.5±0.89
3	30	5	2	6.4±0.60	5.5±1.63	1.8±0.33	0.8±0.07	1.4±0.48
4	10	15	2	6.8±4.28	3.7±1.75	2.1±1.01	0.7±0.46	0.6±0.40
5	30	15	2	7.9±7.20	6.0±1.63	2.3±2.47	1.1±1.13	1.0±0.95
6	10	10	1	7.1±1.32	5.3±2.52	2.1±1.31	0.9±0.25	1.1±0.55
7	30	10	1	7.8±4.09	4.8±0.95	2.0±0.91	0.8±0.46	1.1±0.31
8	20	10	2	6.0±4.03	5.4±0.84	2.7±1.05	0.8±0.47	1.0±0.18
9	10	10	3	7.1±2.24	5.4±2.06	1.7±1.17	0.9±0.45	1.1±0.28
10	30	10	3	7.5±4.55	6.0±2.52	2.5±0.31	0.9±0.58	0.9±0.39
11	20	5	1	8.0±0.86	6.7±0.65	2.4±0.73	1.1±0.18	1.3±0.23
12	20	15	1	8.0±0.75	4.3±0.61	2.2±0.96	0.6±0.24	0.9±0.19
13	20	5	3	6.2±2.40	6.5±1.73	3.5±1.57	0.9±0.36	1.9±0.60
14	20	15	3	7.4±0.95	8.1±1.66	3.1±0.55	1.2±0.35	2.2±1.05
15	20	10	2	6.0±1.51	5.1±0.80	1.9±0.78	0.7±0.16	1.1±0.19
LSD (0.05)				-	4.42	1.84	-	1.59

^a Los valores son el promedio de cuatro repeticiones.

Cuadro 3. Valores P para vermicomposta, lixiviado y roca fosfórica en las características de crecimiento de *Piper auritum* Kunth.

Factor	Altura	Diámetro del tallo	Numero de hojas	Numero de entrenudos	Peso fresco hoja	Peso fresco tallo	Peso fresco raíz	Peso seco hoja	Peso seco tallo	Peso seco raíz
	Valor - P									
Vermicomposta	0.2825	0.7319	0.0958	0.6446	0.7022	0.1039	0.2105	0.9395	0.3776	0.1341
Lixiviado	0.6191	0.1204	0.0731	0.3796	0.5983	0.2143	0.4487	0.7921	0.4674	0.0662
Roca fosfórica	0.1101	0.0935	0.1675	0.9640	0.3907	0.3845	0.0867	0.6687	0.2231	0.0926

Cuadro 4. Efecto de la aplicación de diferentes dosis de vermicomposta, lixiviado y roca fosfórica en las características de crecimiento de *Piper auritum* Kunth.

Fertilizante orgánico	Tasa de aplicación —g o ml planta ⁻¹ —	Altura de la planta ^a —cm—	Diámetro del tallo ^a —mm—	Número de hojas ^a	Número de entrenudos ^a
Vermicomposta					
	10	5.67 a	10.23 a	2.32 a	5.45 a
	20	6.53 a	10.44 a	1.94 a	5.57 a
	30	6.89 a	9.96 a	2.32 a	5.28 a
	LSD ^b	-	-	-	-
Lixiviado					
	5	5.93 a	10.45 ab	1.90 b	5.32 a
	10	6.56 a	10.71 a	2.26 ab	5.68 a
	15	6.60 a	9.46 b	2.42 a	5.31 a
	LSD ^b	-	1.256	0.520	-
Roca fosfórica					
	1	6.17 ab	9.99 ab	2.44 a	5.48 a
	2	5.71 b	9.65 b	2.10 a	5.39 a
	3	7.21 a	10.99 a	2.05 a	5.42 a
	LSD ^b	1.49	1.34	-	-

^a Incremento del parámetro de crecimiento después de un mes de aplicación de fertilizantes; ^b LSD = diferencia mínima significativa a P <0,05.

Letras diferentes indican diferencia mínima significativa.

Cuadro 4. (Continuación) Efecto de diferentes dosis de vermicomposta, lixiviado y roca fosfórica en las características de crecimiento de *Piper auritum* Kunth

Fertilizante orgánico	Tasa de aplicación —g o mL planta ⁻¹ —	Peso fresco hojas ^a — (g planta ⁻¹) —	Peso fresco tallo ^a — (g planta ⁻¹) —	Peso fresco raíz ^a — (g planta ⁻¹) —	Peso seco hojas ^a — (g planta ⁻¹) —	Peso seco tallo ^a — (g planta ⁻¹) —	Peso seco raíz ^a — (g planta ⁻¹) —
Vermicomposta							
	10	6.76 a	8.21 b	5.17 a	0.88 a	2.15 a	1.13 a
	20	7.00 a	10.36 a	6.14 a	0.90 a	2.59 a	1.45 a
	30	7.62 a	9.15 ab	5.67 a	0.94 a	2.25 a	1.15 a
	LSD ^b	-	2.15	-	-	-	-
Lixiviado							
	5	6.68 a	8.88 a	6.10 a	0.93 a	2.49 a	1.50 a
	10	6.99 a	10.23 a	5.45 a	0.86 a	2.10 a	1.07 b
	15	7.72 a	8.62 a	5.46 a	0.94 a	2.41 a	0.15 ab
	LSD ^b	-	-	-	-	-	0.42
Roca fosfórica							
	1	7.79 a	9.04 a	5.19 b	0.88 a	2.17 a	1.09 a
	2	6.49 a	8.63 a	5.38 ab	0.86 a	2.13 a	1.14 a
	3	7.12 a	10.04 a	6.43 a	0.98 a	2.70 a	1.49 a
	LSD ^b	-	-	1.24	-	-	-

^a incremento del parámetro de crecimiento después de un mes de aplicación de fertilizantes; ^b LSD = diferencia mínima significativa a P <0,05.

Los parámetros de crecimiento de las plantas fueron influenciados positivamente por la adición de lixiviado y roca fosfórica. El fósforo (P), después del nitrógeno, es el segundo macronutriente requerido para el crecimiento de las plantas. El desarrollo de la raíz, tallo, fortaleza del tallo, flores, formación de semillas, la madurez del cultivo, la fijación del N en leguminosas y la calidad de los cultivos son atribuidos a la nutrición con fósforo (Thakur *et al.*, 2014).

Se ha demostrado también, que la aplicación de lixiviado mejora la salud de las plantas, el rendimiento del cultivo y la calidad nutritiva (Gamaley *et al.*, 2001; Pant *et al.*, 2009), se cree que los nutrientes minerales solubles, ácidos orgánicos y reguladores de crecimiento hidrosolubles presentes en el lixiviado tienen efectos positivos en el desarrollo inicial de las raíces, y el crecimiento de las plantas (Keeling *et al.*, 2003; Edwards *et al.*, 2006; Arancon *et al.*, 2007). Los microorganismos presentes en el lixiviado también puede inducir resistencia a las enfermedades, así como estimular la absorción de nutrientes y crecimiento de las plantas (Scheuerell y Mahaffee, 2002; Ingham, 2005; Hargreaves *et al.*, 2008).

El suelo enriquecido con vermicomposta provee sustancias que no se encuentran en los fertilizantes químicos (Kale, 1998; Ansari e Ismail, 2008), tales como ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas (Nagavallemma *et al.*, 2004). Los biofertilizantes contribuyen con macronutrientes y micronutrientes en las cantidades requeridas por las plantas (Ansari y Sukhraj, 2010), estos nutrientes de las plantas se adsorben sobre las moléculas de ácidos húmicos y se liberan lenta y gradualmente en el suelo y puestos a disposición de los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas (Senesi, 1992, Arancon *et al.*, 2005; Gutiérrez, *et al.*, 2007). La vermicomposta se compone principalmente de C, H y O, y contiene nutrientes como el NO₃, PO₄, Ca, K, Mg, S y micronutrientes que exhiben efectos similares sobre el crecimiento de las plantas y el rendimiento que los fertilizantes inorgánicos aplicados a los suelos (Singh *et al.*, 2008). Sáenz *et al.* (1998) reportaron que la adición de vermicomposta al suelo tiene como consecuencia un aumento en el contenido de minerales en el sustrato y concentraciones más altas de P, Ca, Mg, Cu, Zn y Mn en los tejidos de brotes de trébol rojo y pepino.

Los valores máximos obtenidos mediante la optimización por superficie de respuesta de la concentración de biofertilizantes (Cuadro 5) son plantas con 8.67 cm de altura agregando 29.9 g de vermicomposta, 14.8 mL de lixiviado y 3 g de roca fosfórica; diámetro del tallo de 12.50 mm agregando 30 g de vermicomposta, 5.3 mL de vermicomposta y 3 g de roca fosfórica ; plantas con un promedio de 2.84 hojas, agregando 30 g de vermicomposta, 13.8 mL de vermicomposta y 1 g de roca fosfórica y 5.91 entrenudos agregando 10 g de vermicomposta, 12.1 mL de lixiviado y 3 g de roca fosfórica. Los coeficientes de la ecuación de segundo grado para la altura de la planta, diámetro del tallo, número de hojas y número de entrenudos se calcularon por ajuste de mínimos cuadrados (Cuadro 6).

Cuadro 5. Optimización de la concentración de vermicomposta, lixiviado y roca fosfórica para maximizar las características químicas y de crecimiento en *Piper auritum* Kunth.

Características	Vermicomposta (g)	Valores óptimos	
		Lixiviado (mL)	Roca fosfórica (g)
Altura de la planta	29.9	14.8	3.0
Diámetro del tallo	30.0	5.3	3.0
Número de hojas	30.0	13.8	1.0
Número de entrenudos	10.0	12.1	3.0
Peso fresco tallo	22.4	11.8	3.0
Peso fresco hojas	29.9	14.9	1.0
Peso fresco raíz	28.4	15.0	2.9
Peso seco tallo	30.0	15.0	2.9
Peso seco hojas	21.4	5.0	3.0
Peso seco raíz	17.6	5.0	3.0
Fenoles totales	30.0	14.8	1.0
Flavonoides	30.0	14.9	1.0

Cuadro 6. Ecuaciones para maximizar las características de crecimiento y producción de fenoles y flavonoides en *Piper auritum* Kunth.

Factor	Ecuación
Altura de la planta	$7.75 + 0.1225*VC - 0.295*VW - 2.875*PR - 0.0025*VC^2 + 0.019*VC*VW - 0.075*VC*PR - 0.012*VW^2 + 0.11*VW*PR + 0.95*PR^2$
Diámetro del tallo	$7.95 + 0.23125*VC + 0.9*VW - 4.2375*PR - 0.0035*VC^2 - 0.0215*VC*VW + 0.055*VC*PR - 0.031*VW^2 + 0.025*VW*PR + 0.85*PR^2$
Número de hojas	$4.63333 - 0.203333*VC + 0.0433333*VW - 0.933333*PR + 0.00383333*VC^2 + 0.004*VC*VW + 0.005*VC*PR - 0.00466667*VW^2 + 0.01*VW*PR + 0.133333*PR^2$
Número de entrenudos	$2.11667 + 0.159583*VC + 0.426667*VW + 0.0458333*PR - 0.00183333*VC^2 - 0.0065*VC*VW - 0.015*VC*PR - 0.0143333*VW^2 - 0.005*VW*PR + 0.0666667*PR^2$
Peso fresco del tallo	$5.58333 + 0.712917*VC + 0.818333*VW - 6.92083*PR - 0.0170417*VC^2 - 0.009*VC*VW + 0.0525*VC*PR - 0.0591667*VW^2 + 0.26*VW*PR + 0.945833*PR^2$
Peso fresco hojas	$11.45 - 0.01875*VC - 0.185*VW - 4.7375*PR + 0.001875*VC^2 + 0.0*VC*VW - 0.0075*VC*PR + 0.0085*VW^2 + 0.06*VW*PR + 0.9875*PR^2$
Peso fresco raíz	$12.4333 + 0.122917*VC - 0.976667*VW - 3.72083*PR - 0.00704167*VC^2 + 0.013*VC*VW + 0.0275*VC*PR + 0.0128333*VW^2 + 0.2*VW*PR + 0.445833*PR^2$
Peso seco tallo	$2.65 - 0.0275*VC - 0.1925*VW - 0.6875*PR + 0.0*VC^2 + 0.0025*VC*VW + 0.0025*VC*PR + 0.003*VW^2 + 0.04*VW*PR + 0.075*PR^2$
Peso seco hojas	$= 4.18333 + 0.0716667*VC - 0.344167*VW - 1.32083*PR - 0.00366667*VC^2 + 0.0035*VC*VW + 0.0225*VC*PR + 0.0143333*VW^2 - 0.01*VW*PR + 0.308333*PR^2$
Peso seco raíz	$2.73333 + 0.0929167*VC - 0.361667*VW - 0.770833*PR - 0.00266667*VC^2 + 0.0025*VC*VW - 0.005*VC*PR + 0.0103333*VW^2 + 0.035*VW*PR + 0.183333*PR^2$
Fenoles totales	$26.3875 + 0.177438*VC - 2.8605*VW - 2.0975*PR - 0.00674063*VC^2 + 0.0352125*VC*VW - 0.115687*VC*PR + 0.122388*VW^2 - 0.035625*VW*PR + 0.818437*PR^2$
Flavonoides	$5.04375 + 0.0222188*VC - 0.234875*VW + 0.139063*PR + 0.00148125*VC^2 - 0.0012875*VC*VW - 0.041125*VC*PR + 0.01895*VW^2 - 0.080125*VW*PR + 0.279375*PR^2$

VC= vermicomposta; VW= lixiviado; PR= roca fosfórica

6.2 Cuantificación de fenoles totales y flavonoides.

De acuerdo al ANOVA realizado con un nivel de confianza del 95%, la concentración de lixiviado y roca fosfórica tuvieron efecto estadístico significativo ($p \leq 0.05$) sobre la producción de compuestos fenólicos y flavonoides en las plantas de hierba santa (*Piper auritum* Kunth) (Cuadro 8). La concentración de fenoles totales y flavonoides disminuyó conforme aumentó la dosis aplicada de roca fosfórica (Cuadro 9). El mayor contenido de fenoles totales fue 19.4 mg EAG/g de muestra seca obtenido fertilizando la planta con 20gr de vermicomposta, 15mL de lixiviado y 1g de roca fosfórica (Cuadro 7). Conde y Guerrero en (2013), reportaron una concentración de compuestos fenólicos en extractos etanólicos de hojas de hierba santa en un rango de 6.79 – 23.83 mg GAE/ g de muestra seca usando sonicación como método de extracción. Respecto al contenido de flavonoides, bajo las mismas condiciones de fertilización se obtuvieron 5.6 mg EQ/g de muestra seca (Cuadro 7).

Cuadro 7. Resultado de la cuantificación de fenoles totales y flavonoides en hojas de *Piper auritum* Kunth.

Tratamiento	Vermicomposta — (g planta ⁻¹) —	Lixiviado — (ml planta ⁻¹) —	Roca fosfórica — (g planta ⁻¹) —	Fenoles totales ^{ab} —mg g planta ⁻¹ —	Flavonoides ^{ac}
1	20	10	2	10.9±0.82 ^{sd}	3.4±0.14 ^{sd}
2	10	5	2	13.4±1.02	5.3±0.37
3	30	5	2	12.1±0.31	4.5±0.01
4	10	15	2	12.5±0.94	3.9±1.11
5	30	15	2	18.2±4.57	2.9±0.09
6	10	10	1	11.4±0.34	3.5±0.29
7	30	10	1	12.7±1.72	4.6±0.17
8	20	10	2	14.8±3.09	4.0±0.51
9	10	10	3	13.2±0.80	4.0±0.23
10	30	10	3	9.9±2.08	3.6±0.20
11	20	5	1	17.1±0.05	4.2±0.16
12	20	15	1	19.3±1.34	5.6±0.32
13	20	5	3	12.1±1.07	3.8±0.68
14	20	15	3	13.5±1.00	3.6±0.33
15	20	10	2	9.2±1.93	3.1±0.76
LSD (0.05)				10.08	2.7

^a Los valores son el promedio de tres repeticiones.

^b El contenido de fenoles totales está expresado como equivalentes de ácido gálico (GAE mg/g planta).

^c El contenido de flavonoides está expresado como equivalentes de quercetina (QE mg/g planta).

^{sd} Desviación estándar.

LSD = diferencia mínima significativa a P<0.05

Cuadro 8. Valores P de vermicomposta, lixiviado y roca fosfórica en las características químicas de *Piper auritum* Kunth.

Factor	Fenoles totales	Flavonoides
	Valor - P	
Vermicomposta	0.5030	0.4526
Lixiviado	0.0000	0.0217
Roca fosfórica	0.0042	0.0124

Cuadro 9. Efecto de diferentes concentración de vermicomposta, lixiviado y roca fosfórica en contenido de fenoles totales y flavonoides de *Piper auritum* Kunth.

Fertilizante orgánico	Tasa de aplicación	Fenoles totales ^{ac}	Flavonoides ^{ad}
	—g o ml planta ⁻¹ —		—mg g planta ⁻¹ —
Vermicomposta	10	13.28 a	4.30 a
	20	14.24 a	4.02 a
	30	13.85 a	4.03 a
	LSD ^b	-	-
	Lixiviado		
Lixiviado	5	13.70 b	4.49 a
	10	11.75 c	3.80 b
	15	15.91 a	4.07 ab
	LSD ^b	1.95	0.68
	Roca fosfórica		
Roca fosfórica	1	15.56 a	4.58 a
	2	13.25 b	3.93 b
	3	12.57 b	3.84 b
	LSD ^b	2.98	0.73

^a incremento del parámetro químico después de un mes de aplicación de fertilizantes.

^b LSD = diferencia mínima significativa a P < 0.05.

^c El contenido de fenoles totales esta expresado como equivalentes de ácido gálico (GAE mg/g planta).

^d El contenido de flavonoides esta expresado como equivalentes de quercetina (QE mg/g planta).

La concentración de compuestos fenólicos de extractos metanólicos de hojas de *Piper auritum* se vieron afectados positivamente por la adicción de lixiviado, mientras que aumentando la concentración de roca fosfórica disminuye la síntesis de flavonoides en plantas. Esto puede explicarse con estudios que han indicado que la deficiencia de P, N, B y Mn induce la acumulación de flavonoides (Lillo *et al.*, 2007; Stewart *et al.*, 2001), mientras que la implementación de Co y Ni incrementa la producción de flavonoides y la actividad antioxidante enzimática (Jayakumar *et al.*, 2007).

El alto porcentaje de ácidos húmicos en vermicomposta contribuye a la salud de las plantas, ya que promueve la síntesis de compuestos fenólicos como antocianinas y flavonoides, que pueden mejorar la calidad de la planta y actúan como un elemento de disuasión a las plagas y enfermedades (Theunissen *et al.*, 2010); estos compuestos también están presentes en el lixiviado.

Los compuestos fenólicos son uno de los principales metabolitos secundarios de las plantas. Estos mismos compuestos se hayan presentes en gran cantidad de frutas y son parte de la dieta humana. La importancia de los fenoles radica en que producen soporte mecánico a la planta, contribuyen en la coloración de flores y frutos, protegen contra patógenos y herbívoros y son muy efectivos contra radiación UV (Strack, 1997). El valor de estos compuestos se basa en las condiciones en que se cultivan las plantas. Se ha demostrado que las cantidades de compuestos fenólicos a partir de plantas cultivadas bajo condiciones orgánicas son más altos que los que se cultivan bajo condiciones no orgánicas (Grusak y Dellapenna, 1999; Dixon, 2001). Asami *et al.* (2003) encontró que las cantidades totales de sustancias fenólicas fueron mayores en las fresas (*Fragaria Ananasa*, var. Chandler) y el maíz (*Zea mays*) de cultivo orgánico que en los cultivados con fertilizantes inorgánicos. El total más alto observado de compuestos fenólicos puede ser debido al incremento en el estrés ambiental a las plantas por el poco o nada uso de pesticidas y fertilizantes sintéticos para ayudar en el crecimiento de la planta (Asami *et al.*, 2003). Conde y guerrero (2013) reportaron una concentración de 6.79 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca para extracto

etanólico de hojas secas de plantas de hierba santa cultivadas sin fertilizar, la cual es menor que los 19.3 mg equivalentes de ácido gálico por g de muestra seca en extracto metanólico de las hojas de hierba santa encontrada en este trabajo.

Muchos compuestos fenólicos (por ejemplo, ésteres, ác. caféico, catequinas) son funcionales como antioxidantes en concentraciones relativamente bajas, mientras que, en concentraciones más altas, ellos mismos son susceptibles a la oxidación, se pueden comportan como pro-oxidantes debido a su participación en las reacciones de iniciación.

Los flavonoides son uno de los grupos más extensos y variados de compuestos naturales y son probablemente los fenoles naturales más importantes. Estos compuestos poseen un amplio espectro de actividades químicas y biológicas incluyendo la capacidad eliminadora de radicales libres. Los flavonoides tales como la quercetina, son compuestos fenólicos que pueden ser sintetizados por las plantas como respuesta al ataque de patógenos, el nivel de compuestos fenólicos en las plantas depende de su etapa de madurez, variedad, almacenamiento y los factores genéticos entre otros (Nicolas *et al.*, 1994), y pueden presentar diferentes niveles en la misma planta creciendo bajo diferentes condiciones de suelo.

Los compuesto fenólicos antioxidantes, especialmente los flavonoides, neutralizan las especies reactivas de oxígeno (ROS) antes de que causen daño a las células y las prácticas de cultivo pueden interferir con la cantidad producida de estos compuestos (Sristisri *et al.*, 2010). Como los compuestos fenólicos también proporcionan color, sabor y aroma al fruto (Hattenschwiler y Vitousek, 2000) son esenciales en la producción de alimentos, ya que son un requisito previo a la comercialización de la cosecha y a la aceptabilidad del consumidor.

Para maximizar la concentración de flavonoides mediante la optimización con la metodología de superficie de respuesta, las concentraciones de los biofertilizantes para obtener una concentración de 5,23 mg por gramo de peso seco son 30 g de vermicomposta por planta, 14,99 mL de lixiviado por planta y 1 g de roca fosfórica por planta (Figura 15), y para obtener una concentración de fenoles totales de

20.55 mg g⁻¹ de muestra seca, se requieren 30 g de vermicomposta, 14.8 mL de lixiviado y 1 g de roca fosfórica (Figura 14) (Cuadro 5). Los coeficientes de la ecuación de segundo grado para la concentración de fenoles y flavonoides se calcularon por ajuste de mínimos cuadrados (Cuadro 6).

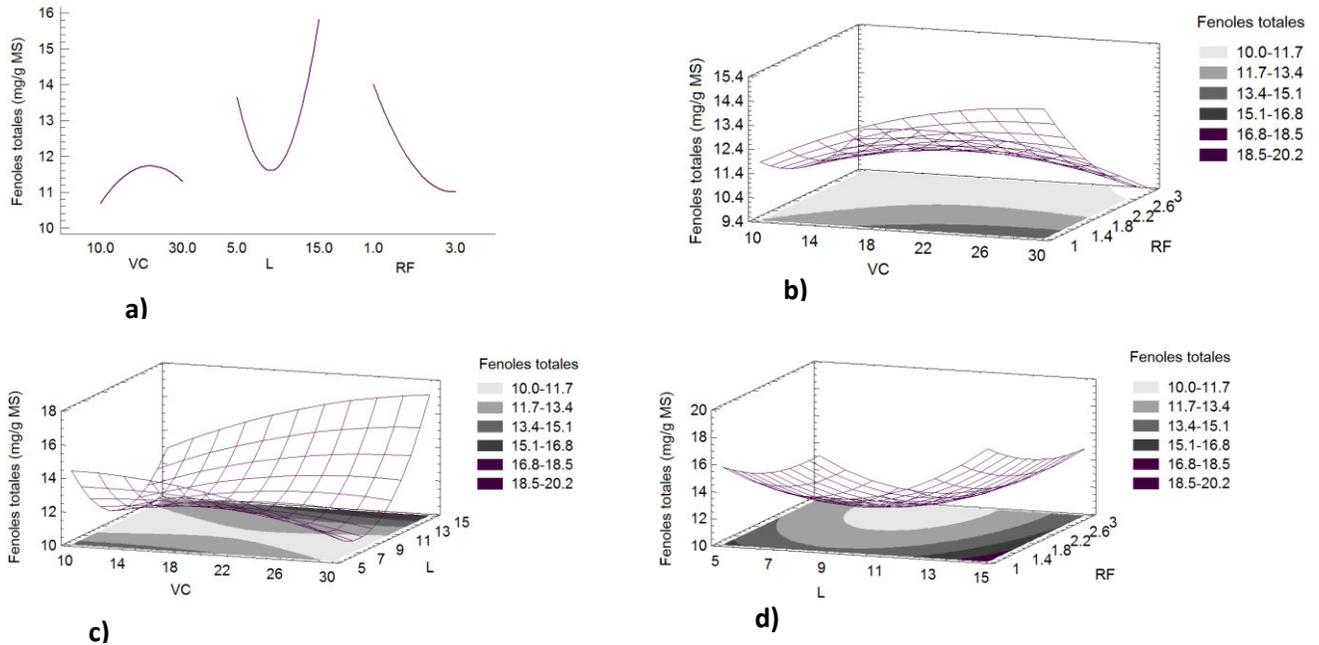


Figura 14. a) Gráfico de efectos principales para fenoles totales, b) Gráfico de superficie de respuesta para vermicomposta y roca fosfórica, c) Gráfico de superficie de respuesta para vermicomposta y lixiviado, d) Gráfico de superficie de respuesta para lixiviado y roca fosfórica. MS= muestra seca, VC= vermicomposta, L= lixiviado y RF= roca fosfórica.

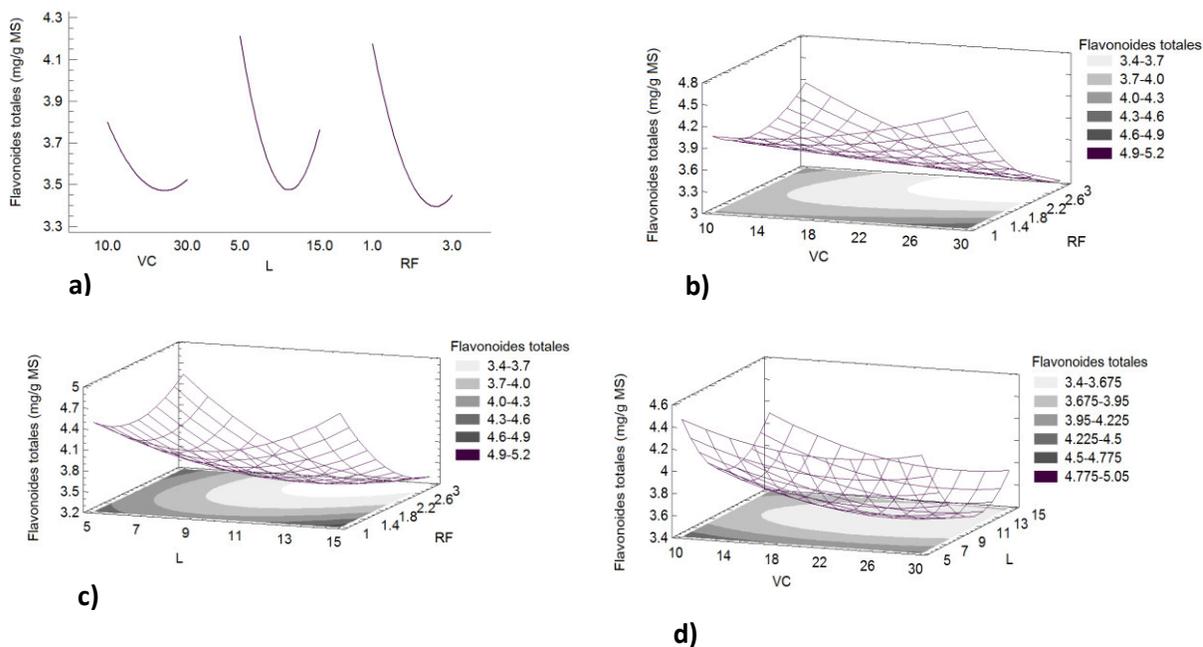


Figura 15. a) Gráfico de efectos principales para flavonoides, b) Gráfico de superficie de respuesta estimada para vermicomposta y roca fosfórica, c) Gráfico de superficie de respuesta estimada para lixivado y roca fosfórica, d) Gráfico de superficie de respuesta estimada para vermicomposta y lixivado. MS= muestra seca, VC= vermicomposta, L= lixivado y RF= roca fosfórica.

6.3 Actividad antirradical.

Diversos autores han reportado que la actividad antirradical está relacionada con los compuestos fenólicos en algunas plantas (Chizzola *et al.*, 2008, Djeridane *et al.*, 2006). En los extractos metanólicos de las hojas de hierba santa se obtuvieron valores de actividad antirradical en un rango de 3.02 hasta 4.86 $\mu\text{g ml}^{-1}$ reportado como la concentración mínima para inhibir el 50% del radical DPPH (EC_{50}) (Cuadro 10). Alcanzándose inhibiciones hasta del 91% a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ de extracto, actividad similar a la obtenida con los antioxidantes comerciales (ácido ascórbico, EC_{50} = 5.49 $\mu\text{g ml}^{-1}$), y al ácido gálico con 2.14 $\mu\text{g ml}$. Conde y Guerrero (2013), reportaron valores de actividad antirradical en hojas secas de hierba santa que van de 8.79 a 18.89 mg Trolox/g de muestra seca y de 7.57 a 12.65 mg ac. ascórbico/g de muestra seca.

Cuadro 10. Actividad antirradical de *Piper auritum* Kunth.

Tratamiento	Vermicomposta	Lixiviado	Roca fosfórica	EC ₅₀ ^a
	—g planta -1—	—ml planta -1—	—g planta -1—	—μg ml ⁻¹ —
1	20	10	2	4.86±0.96 ^{sd} a
10	30	10	3	3.02±0.45 b
12	20	15	1	4.22±0.85 ab

^a Los valores son el promedio de cuatro repeticiones.

^{sd} Desviación estándar.

Letras iguales indican diferencia estadística significativa.

Estándar: ácido gálico EC₅₀ 2.14 μg/mL, estándar: ácido ascórbico EC₅₀ 2.34 μg/mL reportado por Navarro *et al.*, (2003).

Los antioxidantes son compuestos que retrasan la autooxidación mediante la inhibición de la formación de radicales libres o por la interrupción de la propagación del radical libre por uno o más de varios mecanismos: 1) barrido de las especies que inician la peroxidación, 2) iones quelantes de metales que no sean capaces de generar especies reactivas o descomponer los peróxidos de lípidos, 3) reaccionar con O₂ – previniendo la formación de peróxidos, 4) romper la reacción en cadena autooxidativa y 5) la reducción de las concentraciones de O₂ localizadas (Nawar, 1996). Los antioxidantes más efectivos son aquellos que interrumpen la reacción en cadena de los radicales libres. Por lo general, contienen anillos aromáticos o fenólicos, estos antioxidantes donan H a los radicales libres, durante la oxidación se convierten en un radical así mismos. Estos intermediarios radicales se estabilizan por la deslocalización por resonancia del electrón dentro del anillo aromático y forman estructuras de quinonas (Nawar 1996). Los compuestos fenólicos hallados en el extracto metanólico de las hojas de hierba santa presentan actividad antirradical.

Moure *et al* en 2000 reportaron que la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos depende de factores tanto como de las condiciones de crecimiento, calidad y origen de las plantas, como de los métodos de extracción y purificación usados para determinar la actividad antirradical. También se ha reportado que los polifenoles se encuentran en el citoplasma de las células, por lo que el uso de ultrasonido causa un tipo de permeabilidad del tejido por alteración de la estructura celular, como la pared celular y las membranas celulares que son importantes para controlar la transferencia de masa del medio circundante (Usaquén *et al.*, 2006).

A veces los antioxidantes endógenos no son capaces de prevenir daños oxidativos, lo que requiere el suministro de antirradicales exógenos. Por lo tanto, el consumo de compuestos fenólicos en la dieta puede apoyar la prevención del estrés oxidativo (Habib y Ibrahim, 2011). A pesar del consumo de frutas y verduras, por lo general las partes no comestibles podrían ser una buena alternativa para agregar compuestos bioactivos en la dieta (Leite *et al.*, 2012). La presencia de flavonoides y antocianinas en muchos tipos de frutos comestibles y vegetales en las dietas modernas proporcionan una pigmentación natural y poseen una amplia gama de protección antioxidante y beneficios terapéuticos para la salud humana, incluyendo potentes propiedades cardioprotectoras, neuroprotectoras, anti-inflamatorias y anti-cancerígenas. Hay fuertes evidencias experimentales que indican que los productos vegetales orgánicos contienen concentraciones más altas de metabolitos secundarios, como los flavonoides, que los cultivados con productos químicos, esto podría ser debido a la menor cantidad de nitrógeno aportada por los abono orgánicos comparada con la de los abonos inorgánicos (Sharma y Agarwal, 2014). Navarro *et al.* (2010) reportan para *piper auritum* una muy baja actividad antirradical ($EC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$) del extracto metanólico de hojas recolectadas de plantas de crecimiento silvestre, por lo que puede ser que el tratamiento con biofertilizantes haya aumentado la actividad antirradical a $3.02 \mu\text{g/mL}$ reportadas en el presente trabajo.

CAPÍTULO VII CONCLUSIONES

La adición de diferentes dosis de vermicomposta, lixiviado y roca fosfórica tuvo efecto estadístico significativo sobre la producción de compuestos fenólicos.

La adición de lixiviado no presentó efecto estadístico significativo sobre el crecimiento pero sí tuvo diferencia mínima significativa en el diámetro del tallo, el número de hojas y peso seco de la raíz, la adición de roca fosfórica no tuvo efecto estadístico significativo, sin embargo tuvo diferencia mínima significativa en la altura de las plantas, el peso fresco de la raíz y el diámetro del tallo, la vermicomposta únicamente tuvo diferencia mínima significativa en el peso fresco del tallo.

El lixiviado y la roca fosfórica tuvieron un efecto mínimo significativo sobre la producción de fenoles totales y flavonoides, a mayor dosis de lixiviado fue mayor la concentración de compuestos fenólicos, mientras que a mayor dosis de roca fosfórica se obtuvo menor concentración de compuestos fenólicos.

El tratamiento que presentó mayor actividad antirradical fue al que se le aplicaron 30 g de vermicomposta, 10 mL de lixiviado y 3 g de roca fosfórica, y presentó diferencia mínima significativa comparado con el tratamiento al que se le aplicó 20 g de vermicomposta, 10 ml de lixiviado y 2 g de roca fosfórica.

Las condiciones de cultivo, tales como la fertilización, el estrés hídrico, el clima y la aplicación de insecticidas, sí afectan la producción de fenoles totales y flavonoides en plantas de *Piper auritum* Kunth.

BIBLIOGRAFÍA

- Adam, V. 2005. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: Contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources, *Antioxidants and Redox Signaling*. 7(8) ,1140-1149.
- Alarcón, A. y Ferrera, R. 2000. Biofertilizantes: importancia y utilización en la agricultura. *Agricultura Técnica en México*, julio-diciembre, 191-203.
- Albert L.A. 2007, "Panorama de los plaguicidas en México", 7° Congreso de Actualización en Toxicología Clínica, pág. 359-378.
- Ansari, A.A. and Ismail, S.A. 2008. Reclamation of sodic soils through vermitechnology. *Pakistan J. Agric. Res.*, 21(1-4): 92-97.
- Ansari, A.A. and Sukhraj, K. 2010. Effect of vermiwash and vermicompost on soil parameters and productivity of okra (*Abelmoschus esculentus*) in Guyana. *African Journal of Agricultural Research* Vol. 5(14), pp. 1794-1798.
- Arancon, N.Q., Edwards C.A., Bierman P., Metzger J.D. and Lucht C. 2005. Effects of vermicomposts produced from cattle manure, food waste and paper waste on the growth and yield of peppers in the field. *Pedobiologia*, 49(4): 297-306.
- Arancon, N.Q., Edwards, C.A., Dick, R. and Dick, L. 2007. Vermicompost tea production and plant growth impacts. *BioCycle*, 48, 51-52.
- Asami D, Hang Y, Barnett D and Mitchelle A .2003. Comparison of the total phenolic and ascorbic content of freeze-dried and air dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic and sustainable agricultural practices. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 1237-1241.
- Atiyeh, R. M. Subler, S., Edwards, C. A., Bachman, G., Metzger, J. D., and Shuster, W. 2000a. Effects of vermicomposts and composts on plantgrowth in horticultural container media and soil. *Pedobiologia*. 44: 579-590.

- Atiyeh, R. M., Arancon, N., Edwards, C. A. and Metzger, J. D., 2000c. Influence of earthwormprocessed pig manure on the growth and yield of greenhouse tomatoes. *Biores. Technol.*, 75: 175-180.
- Atiyeh, R. M., Domínguez, J., Subler, S. and Edwards, C. A., 2000b. Changes in biochemical properties of cow manure during processing by earthworms (*Eisenia andrei*, Bouché) and the effects on seedling growth. *Pedobiologia*, 44: 709-724.
- Atiyeh, R.M., Lee, S., Edwards, C.A., Arancon, N.Q. and Metzger, J.D. 2002. The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. *Biores. Technol.* 84: 7-14.
- Badaruddin, M., Reynolds, M.P. and Ageeb, O.A. 1999. Wheat management in warm environments: effect of organic and inorganic fertilizers, irrigation frequency, and mulching. *Agron. J.* 91:975-983.
- Barber, S.A. 1995. Soil nutrient bioavailability. A mechanistic approach. New York, United States of America, John Wiley y Sons.
- Benezer, M., Castro, E. y García-Pineda, E. 2008. La producción de Especies Reactivas de Oxígeno Durante la Expresión de la Resistencia a Enfermedades en plantas, *Revista Mexicana de Fitopatología.* 26 (1), 56-6.
- Black, C.A.1968. Soil-plant relationships. New York, United States of America, John Wiley y Sons.
- Bollo, E. 1999. Lombricultura, una alternativa de reciclaje. Ediciones Mundi-Prensa. Bilbao, España.
- Brand, W.W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28(1): 25-30.
- Buck, C., Langmaack, M. and Schrader, S. 2000. Influence of mulch and soil compaction on earthworm cast properties. *Appl. Soil Ecol.*, 14: 223-229.

- Castellanos, J. Z., y Peña, J. J. 1990. Los nitratos provenientes de la agricultura. Una fuente de contaminación de los acuíferos. *Terra*. 8 (1):113-126.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. and Chern, J.C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3) 178-182.
- Chien, S.H. and Friesen, D.K. 1992. Phosphate rock for direct application In: F.J. Sikora, ed. Future directions for agricultural phosphorus research, pp. 47–52. Bulletin Y-224. Muscle Shoals, Estados Unidos de América, Valley Authority.
- Chizzola, R., Michitsch, H., and Franz, C. 2008. Antioxidative properties of *Thymus vulgaris* leaves: Comparison of different extracts and essential oil chemotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6897-6904.
- Conde, L.A.; Guerrero, J. 2013. Total phenolics and antioxidant activity of *Piper auritum* and *Porophyllum ruderale*. *Food Chemistry*, Volume 142, 1 January 2014, Pages 455–460.
- Delgado, L.; Betanzos, G. y Sumaya, M. T. 2010. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y Ciencia*, núm. 50, septiembre-diciembre, pp. 10-15, 1665-4412.
- Diego, S. 2011. Evaluación del rendimiento en la obtención del aceite “*Piper auritum* Kunth” mediante la hidrodestilación asistida por microondas (pp. 12-15). Tesis de licenciatura no publicada, Universidad Veracruzana, Veracruz, México.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., and Vidal, N. 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, 654–660.
- Domínguez, J., Parmelee, R.W. and Edwards, C.A., 2003. Interactions between *Eisenia Andrei* (Oligochaeta) and nematode populations during vermicomposting. *Pedobiologia*, 47: 53-60.

- Dörner, C., Galleguillos, M. y Adarmes, H 2006. ¿Qué son los flavonoides y a qué se debe su efecto protector? *Revista TecnoVet* 12(2): 14-18.
- Dossier FiBL, 2007, La calidad y la seguridad de los productos ecológicos. Research Institute of Organic Agriculture, (Forschungsinstitut für biologischen Landbau, FiBL) Switzerland, Germany, Austria.
- Edwards, C.A., Arancon, N.Q. and Greytak, S. 2006. Effects of vermicompost teas on plant growth and disease. *BioCycle*, 47, 28-31.
- FAO.1984. Fertilizer and plant nutrition guide. FAO Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin N° 9. Rome.
- Flores, E. 2006. Metabolitos secundarios bioactivos del género Piper de la flora boliviana (pp.30-36). Tesis doctoral no publicada, Universidad la Laguna, Santa Cruz de Tenerife, España.
- Folin, O. and Denis, W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *The Journal of Biological Chemistry*, 12 (2): 239-243.
- Fox, R.L. and Kamprath, E.J. 1970. Phosphorus sorption isotherms for evaluating the phosphate requirements of soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 34: 902–907.
- Gamaley, A.V., Nadporozhskaya, M.A., Popov, A.I., Chertov, O.G., Kovsh, N.V. and Gromova, O.A. 2001. Non-root nutrition with vermicompost extracts as the way of ecological optimization. *Plant nutrition: food security and sustainability of agro-ecosystems through basic and applied research. Fourteenth International Plant Nutrition Colloquium*. Springer, Netherlands, Hannover, Germany. pp. 862-863.
- Ghosh, M., Chattopadhyay, G.N. and Baral, K. 1999. Transformation of phosphorus during vermicomposting. *Biores. Technol.* 69: 149-154.
- Gilliam, J.W., Logan, T.J. and Broadbent, F.E. 1985. Fertilizer use in relation to the environment. In: *Fertilizer technology and use*; Engelstad, O.P. (ed.); third edition. Soil Science Society of America, Inc. Madison Wis. USA. 561-588 pp.

- Grusak, M.A. and DellaPenna, D. 1999. Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Plant Mol. Biol.* 50: 133-161.
- Guerrero A. 1996. El suelo, los abonos y la fertilizacion de los cultivos. Ediciones Mundi-Prensa. Bilbao, España.
- Gutiérrez, F.A., Santiago, J., Molina, J.A., Nafate, C.C., Abud, M., Llaven, M.A., Rincón, R. and Dendooven, L. 2007. Vermicompost as a soil supplement to improve growth, yield and fruit quality of tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Bioresour. Technol.*, 98(15): 2781-2786.
- Habib, H.M. and Ibrahim, W.H. 2011. Effect of date seeds on oxidative damage and antioxidant status in vivo. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91 (9) (2011), pp. 1674–1679
- Hammond, L.L. y Day, D.P.1992. Phosphate rock standardization and product quality. In: A.T. Bachik y A. Bidin, eds. Proceedings of a workshop on phosphate sources for acid soils in the humid tropics of Asia, pp. 73–89. Kuala Lumpur, Malaysian Society of Soil Science.
- Hargreaves, J., Adl, M.S., Warman, P.R., Rupasinghe, H.P.V. 2008. The effects of organic amendments on mineral element uptake and fruit quality of raspberries. *Plant Soil*, 308, 213-226.
- Hattenschwiler, S. and Vitousek, P.M. (2000). The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Tr. Ecol. Evolution*, 15: 238-243.
- Heimler, D., Vignolini, P., Isolani, L., Arfaioli, P., Ghiselli, L. and Romani, A. 2010. Polyphenol content of modern and old varieties of *Triticum aestivum* L. and *T. durum* Desf. grains in two years of production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 7329-7334.
- Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1841-1856.
- IFA, World Fertilizer use Manual, 1992, París, 632p.

- Ingham, E.R. 2005. The Compost Tea Brewing Manual; Latest Methods and Research. Soil Food Web Inc., Corvallis, OR.
- Jayakumar, V., R. Bhaskaran, and S. Tsushima. 2007. "Potential of plant extracts in combination with bacterial antagonist treatment as biocontrol agent of red rot of sugarcane". Canadian Journal of Microbiology, 53: 196-206. doi: 10.1139/w06-126.
- Kale, R.D 1998. Earthworm Cinderella of Organic Farming. Prism Book Pvt Ltd, Banglore, India. p.88
- Keeling, A.A., McCallum, K.R. and Beckwith, C.P. 2003. Mature green waste compost enhances growth and nitrogen uptake in wheat (*Triticum aestivum* L.) and oilseed rape (*Brassica napus* L.) through the action of water-extractable factors. Bioresource Technology, 90, 127-132.
- Keeney, D.R. 1982. Nitrogen management for maximum efficiency and minimum pollution. Farmed soils, fertilizer, agroecosystems. Agronomy. A series of monographs-Americans Society of Agronomy. (22):605-649.
- Khasawneh, F.E. y Doll, E.C.1978. The use of phosphate rock for direct application to soils. Adv. Agron., 30: 159–206.
- Kim K.S. 2003. Anti-oxidant activities of the extracts from the herbs of *Artemisia apiacea*, J. Ethnopharmacol.: 85 (1), 69-72.
- Lam, A. 2011. Efecto antimicótico de aceites esenciales y extracto metanólicos de plantas de uso tradicional (pp. 1-26). Tesis de maestría, Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.
- Leite, A.V., Batista, Â.G., Dragano, N.R., Marques, A.C., Malta, L.G. and Riccio, M.F. 2012. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. Food Research International, 49 (1) (2012), pp. 596–603.

- Lillo, C., Lea, U.S. and Ruoff, P. 2007. "Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway". *Plant Cell and Environment*, 31: 587-601.
- Litterick, A.M., Harrier, L., Wallace, P., Watson, C.A. and Wood, M. 2004. The role of uncomposted materials, composts, manures, and compost extracts in reducing pest and disease incidence and severity in sustainable temperate agricultural and horticultural crop production – a review. *Critical Reviews in Plant Science*, 23(6):453-479.
- Ma, Y., Zhang, J.Y. and Wong, M.H., 2003. Microbial activity during composting of anthracenecontaminated soil. *Chemosphere* 55, 1505– 1513.
- Madiz, M., Khan, T. and Mohammad, F. 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*, 3: 232-249. Madrid, España. 127-142 pp.
- Malakouti, M., Navabzadeth, M. and Hashemi, S.H. 1999. The effect of different amounts of N-fertilizer on the nitrate accumulation in the edible parts of vegetables. In: Anac, D. y Martin-Prevel P. (editors); *Improved Crop Quality by Nutrien Mnagement*. Kluwer Academic Publisher. London. 43-45 pp.
- Mancebo, F., Hilje, L., Mora, G.A. y Salazar, R. 2000. Efecto de extractos vegetales sobre larvas de *Hypsipyla grandella*. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 55 (1):1-5.
- Markham, K.R. and Mabry, T.J. 1975. Ultraviolet-visible and proton magnetic resonance spectroscopy of flavonois. En: Harbone, J.B., Mabry, T.J., Mabry, H. (eds.), *The Flavonoids*. Academic Press, New York, pp. 45-77.
- Marschner, H. 1993. *Mineral nutrition of higher plants*. Londres, Academic Press Ltd., Harcourt Brace y Co. Publishers.
- Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leita, G.G., Reis, A.S., Dos Santos, T.C., Coube, C.S. and Leita, S.G. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant

- activity by the use of dpph free radical method. *Phytotherapy Research*. 15, 127–130.
- Mesa, A.M., Toro, J.F., Cardona, F. y Blair S. 2012. Actividad antiplasmodial y citotóxica de extractos etanólicos de especies de Piper. *BLACPMA*. 11: 154-162.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal Science Technology*, 26(2): 211-219.
- Montero, C.P. 1999. Efecto de enmiendas orgánicas sobre la disponibilidad de fosforo en un andisol. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de Méx., México.
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Domínguez, J.M., Sineiro, J. and Domínguez, H. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72, 145–171.
- Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Domínguez, H., Nuñez, M. J., and Lema, J. M. 2000. Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3890–3897.
- Murillo, E., Lombo, O., Tique, M., y Méndez, J.J. 2007. Potencial Antioxidante de *Bauhinia kalbreyeri* Harms (FABACEAE). *Información tecnológica*, 18(6), 65-74.
- Nagavallema, K.P., Wani, S.P., Lacroix, S., Padmaja, V.V., Vineela, C., Babu Rao, M. and Sahrawat, K.L. (2004). Vermicomposting: Recycling wastes into valuable organic fertilizer. *Global Theme on Agrecosystems Report no. 8*. Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, p. 20.
- Navarro, M.C., Montilla, M.P., Cabo, M.M., Galisteo, M., Cáceres, A., Morales, C. and Berger, I. 2003. Antibacterial, Antiprotozoal and Antioxidant Activity of Five

- Plants Used in Izabal for Infectious Diseases. *Phytotherapy Research* Phytother. Res.17, 325 – 329.
- Nawar, W.F. 1996. Lipids. In: Fennema O, editor. *Food chemistry*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, Inc. p 225–320.
- Nicolas, J.J., Richard-Forget F.C., Goupy P.M., Amiot M.J., and Aubert S., 1994. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 34:109–157.
- Ortiz, V .B., y. Ortiz, C.A. 1990. *Edafología*. Universidad Autónoma Chapingo. México. 352-355.
- Pant, A., Radovich, T.J., Hue, N.V., Talcott, S.T .and Krenek, K.A. 2009. Vermicompost extracts influence growth, mineral nutrients, phytonutrients and antioxidant activity in Pak choi (*Brassica rapa* cv. Bonsai, Chinensis group) grown under vermicompost and chemical fertilizer. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 89, 2383-2392.
- Parmar, V.S., Jain, S.C., Bisht, K.S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O.D., Prasad, A.K., Wengel, J., Olsen, C.E. and Boll, P.M. 1997. Phytochemistry of the genus Piper. *Phytochemistry*. 46: 597-673.
- Puckett, L.J. 1995. Identifying the major sources of nutrient water pollution. *Environmental Science and Technology*. 408A-414A.
- Rajan, S.S., Watkinson, J.H. and Sinclair, A.G. 1996. Phosphate rock for direct application to soils. *Ad. Agron.*, 57: 78–159.
- Ramanathan, V., Cicerone, R.J., Singh, H.B. and Kiehl. 1985. Trace gas trends and their potential role in climate change. *J. Geophys. Res.* 90: 5547-5566.
- Reinés, A.M., Rodríguez, C., Carrillo, O. Loza, A. y Contreras, S.H. 2006. *Nuevos avances en la biotecnología de la lombricultura*. Editorial Universitaria. Ciudad de La Habana. Cuba. 38 p.

- Roche, C.E. Y Romero, A.D. 1994. Estrés oxidativo y degradación de proteínas, *Medicina clínica*.103 (5), 189-196.
- Rodríguez, C., Lagunes, A. y Domínguez, R. 1982. Búsqueda de plantas nativas del estado de México con propiedades tóxicas contra gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith, y mosquito casero *Culex quinquefasciatus* Say. *Revista Chapingo (México)* 7 (37-38): 35-39.
- Sainz, M.J., Taboada, M.T. and Vilariño, A. 1998. Growth, mineral nutrition and mycorrhizal colonization of red clover and cucumber plants grown in a soil amended with composted urbanwastes. *Plant Soil*, 205: 85-92.
- Salamanca, G.G., Correa, C.I., y Principal, J. 2007. Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootecnia Tropical*, 25 (2): 95-102.
- Santamaría, S. 1996. Aspectos biotecnológicos del proceso de vermicomposteo y su aplicación agronómica. Tesis de licenciatura. Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver., México.
- Savirrata, N., Jukunen, R., Oksanen, E and Karjalainen, R. 2010. Leaf phenolic compounds in red clover (*Trifolium Pratense* L.) induced by exposure to moderately elevated ozone. *Environmental Pollution*, 158(2):440-446.
- Scheuerell, S.J. and Mahaffee, W.F. 2002. Compost tea: Principles and prospects for plant disease control. *Compost Science & Utilization*, 10, 313-338.
- Senesi, N., Saiz, C. and Miano, T.M. 1992. Spectroscopic characterization of metal-humic acid-like complexes of earthworm composted organic wastes. *Sci. total Environ.*, 117/118: 111-120.
- Sharma, J. and Agarwal, S. 2014. Vermihorticulture: an horticulturally viable and environmentally sustainable technology to chemical farming. *Cibtech Journal of Bio-Protocols* ISSN: 2319–3840 (Online) An Open Access, Online International

Journal Available at <http://www.cibtech.org/cjbp.htm>. 2014 Vol. 3 (2) May-August, pp.7-20

Singh, R., Sarma, R., Satyendra, K., Gupta R. and Patil, R. 2008. Vermicompost substitution influences growth, physiological disorders, fruit yield and quality of strawberry (*Fragaria x ananassa* (Duch.). *Biorecour. Technol.*, 99: 8502-8511.

Singleton, V., Orthofer, R. and Lamuela, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299:153-178.

Sristisri, U., Elija, K. and Lakhi, R.S. 2010. "Comparison of total phenol and flavonoid content in *Adhatoda vasica* Nees. Grown usind different organic manure". *Journal of Pharmacy Research*", 3(10); 2408 – 2409.

Stevenson, F.J. 1994. *Humus chemistry. Genesis, Composition, Reactions*. Edit. John Wiley & Sons, Inc. 188-211.

Stewart, A.J., Chapman, W., Jenkins, G.I., Graham, I., Martin, T. and Crozier, A. 2001. The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. *Plant, Cell and Environment* 24, 1189–1197.

Strack, D. 1997. Phenolic metabolism. *Plant biochemistry*, pp.388-416

Taiz, L. and Zeiger, E. 2006. Metabolitos secundarios y defensa en las plantas. En *Fisiología vegetal* (pp. 529-576). Castellón de la Plana: Universitat Jaume I.

Thakur, D., Kaushal, R. and Shyam, V. 2014. Phosphate solubilising microorganisms: Role in phosphorus nutrition of crop plants- a review. *Agricultural Research Communication Centre*. 35 (3): 159-171.

Theunissen, J., Ndakidemi, P.A. and Laubscher, C.P. 2010. Potential of vermicompost produced from plant waste on the growth and nutrient status in vegetable production. Review. *International Journal of the Physical Sciences* Vol. 5 (13), pp. 1964-1973

- Tisdale S.L. and Nelson W. 1996. Soil fertility and fertilizers. Second edition. Macmillan Company. Nueva York, USA. 694p.
- Turrens, F.J. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species, *Journal Physiology*. 552(2), 335-344.
- Usaquén, X., Martínez, M., Aya, H., and González, G. 2006. Ultrasound assisted extraction of polyphenols from red-grape (*Vitis vinifera*) residues. The International Union of Food Science and Technology (IUFOST) World Congress. pp. 1315–1324.
- Virinder, S., Subhash, C., Kirpal, S., Rajni, J., Poonam, T., Amitabh, J., Om, D., Ashok, K., Jesper, W., Carl, E. and Per, M. 1997. Phytochemistry of genus Piper. *Phytochemistry*, 46: 597-673.
- Willer, H. 2012. Organic Agriculture Worldwide: Current Statistics. BioFach Congress 2012, Nürnberg, Session. The World of Organic Agricultures 15.2.2012.
- Wuyts, N., De waele, D. and Swennen, R. 2006. Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* grandnaine) roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44:308-314.
- Zapata, F. 2003. FAO/IAEA Research activities on direct application of phosphate rocks for sustainable crop production. In: S.S.S. Rajan y S.H. Chien, eds. Direct application of phosphate rock and related technology: latest developments and practical experiences. Proc. Int. Meeting, Kuala Lumpur, 16–20 July 2001. Muscle Shoals, USA, IFDC. 441 pp.