

Effect of storage temperature on enzyme activity and antioxidant capacity in *Salvia officinalis* L. shoots

Efecto de la temperatura de almacenamiento en la actividad enzimática y capacidad antioxidante en brotes de *Salvia officinalis* L.

María de la Luz Romero-Tejeda; María Teresa Martínez-Damián*;
Juan Enrique Rodríguez-Pérez

Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo, México, C.P. 56230, MÉXICO. Correo-e: teremd13@gmail.com, tel.: (595) 95 21 616, ext.: 6163 *(Autor para correspondencia).

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of low temperatures on antioxidant activity and enzyme activity in sage (*Salvia officinalis* L.). To do this, terminal buds of this plant, previously packed in polyethylene bags at 0, 6 and 23 °C (control), were stored for 21 days. Every three days, total phenolic content (TP), antioxidant capacity (AC), and the activity of the enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and polyphenol oxidase (PPO) were evaluated. In the 0 and 6 °C treatments, TP content increased from 4.52 to 5.07 mg·kg⁻¹ FW up to 12 days after storage (das). A 6 °C, AC had the highest values at 12 das with 53.75 to 88.57 mg VCEAC·g⁻¹ FW. SOD activity decreased considerably at 9 das in the cooling treatments, falling from 5.2 to 3.2 U·mg⁻¹ P. On the other hand, low storage temperatures increased CAT activity, relative to the control, although during storage it was on the decrease. Cooling decreased POD and PFO activity relative to the control, but at 12 das the highest activity of these enzymes in the three treatments was observed. The cooling decreased total phenolic content, antioxidant capacity and the enzyme activity of POD, and increased the activity of PFO, CAT and SOD.

Keywords: cooling, catalase, superoxide dismutase, peroxidase, polyphenol oxidase.

Resumen

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de las bajas temperaturas sobre la capacidad antioxidante y actividad enzimática en salvia (*Salvia officinalis* L.). Para ello, se almacenaron brotes terminales de esta planta, previamente empacados en bolsas de polietileno en 0, 6 y 23 °C (testigo), durante 21 días. Cada tres días, se evaluó el contenido de fenoles totales (FT), capacidad antioxidante (CA), y la actividad de las enzimas catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POD) y polifenoloxidasa (PFO). En los tratamientos de 0 y 6 °C se incrementó el contenido de FT de 4.52 a 5.07 mg·kg⁻¹ PF hasta los 12 días de almacenamiento (dda). A 6 °C la CA tuvo los mayores valores a los 12 dda con 53.75 a 88.57 mg AAEVC·g⁻¹ PF. La actividad de la SOD disminuyó considerablemente a los 9 dda en los tratamientos de refrigeración de 5.2 a 3.2 U·mg⁻¹ de P. Por otra parte, bajas temperaturas de almacenamiento aumentaron la actividad de la CAT, con respecto al testigo, aunque durante el almacenamiento fue en decremento. La refrigeración disminuyó la actividad de la POD y PFO con respecto al testigo, no obstante, a los 12 dda se observó la mayor actividad de estas enzimas en los tres tratamientos. La refrigeración disminuyó el contenido de fenoles totales, capacidad antioxidante y la actividad enzimática de la POD, y aumentó la actividad de la PFO, CAT y SOD.

Palabras clave: refrigeración, catalasa, superóxido dismutasa, peroxidasa, polifenol oxidasa.

Please cite this article as follows (APA 6): Romero-Tejeda, M. L., Martínez-Damián, M. T., & Rodríguez-Pérez, J. E. (2015). Effect of storage temperature on enzyme activity and antioxidant capacity in *Salvia officinalis* L. shoots. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 21(3), 199-213. doi: 10.5154/r.rchsh.2015.01.003

Received: January 19, 2015 / Accepted: September 23, 2015.



Revista Chapingo
Serie Horticultura

www.chapingo.mx/revistas/horticultura

Introduction

Research on natural antioxidants and enzyme activity in plants has increased considerably in recent years, partly because synthetics are volatile, readily degrade at high temperatures and produce negative effects on health (Rodríguez-Vaquero, Tomassini-Serravalle, Manca-DeNadra, & Strasser-De Saad, 2010). For this reason, some herbs, among which the most notable are basil (*Ocimum basilicum* L.), peppermint (*Mentha x piperita* L.), oregano (*Origanum vulgare*) and thyme (*Thymus vulgaris*), have been studied in order to evaluate the enzymes related to the biosynthesis of different metabolites that have antioxidant capacity in plant tissues (Nickavar, Alinaghi, & Kamalinejad, 2008).

In the case of sage, belonging to the family Labiatae, it is used in gastronomy to flavor dishes and is beneficial to health, as it is considered antidiabetic, antidiarrheal, anti-inflammatory and antiseptic; it is also used in the food, cosmetic and liquor industries (Melero, Moré, & Cristóbal, 2009).

In studies related to antioxidants and enzymes in plants, a key role is the reduction of oxygen (O_2) to water, which occurs sequentially. In this sense, if the O_2 molecule only receives one to three electrons, reactive oxygen species (ROS) are formed. These, in turn, incorporate into the hydrogen peroxide molecule, which has similar chemical properties to those of superoxide and can easily form the highly reactive hydroxyl radicals (Quirós-Sauceda, Palafox, Robles-Sánchez, & González-Aguilar, 2011). ROS play an important role in plant signaling, since they control processes such as growth, development, senescence, response to both biotic and abiotic environmental stimuli and programmed cell death (Bailey-Serres & Mittler, 2006).

Some abiotic changes, such as low and high temperatures, excess irradiation, drought, salinity, injury, anoxia and natural contaminants, modify cellular balance and increase the generation of reactive oxygen species; therefore, the response of a plant tissue to produce these species may result not only from the existence and function of different proteins, but also from the presence or absence of antioxidants in the cell. Reactive oxygen species are closely related to the delay or inhibition of the oxidation of lipids and other molecules, accompanied by the progressive deterioration of plants. It is also linked to the rapid cell growth that causes heart disease and cancer (Rodríguez, Valdés, & Alemán, 2006); this is why the consumption of foods high in antioxidants coupled with other health care-related alternatives can prevent these alterations (Erdemoglu, Turan, Caköcö, Sener, & Aydin, 2006).

Generally plants with high antioxidant capacity contain more antioxidants, most of which are phenolic compounds

Introducción

La investigación sobre antioxidantes naturales y actividad enzimática en plantas, se ha incrementado considerablemente en los últimos años, en parte porque los sintéticos son volátiles, se degradan fácilmente en altas temperaturas y generan efectos negativos en la salud (Rodríguez-Vaquero, Tomassini-Serravalle, Manca-DeNadra, & Strasser-De Saad, 2010). Es por ello que, algunas plantas aromáticas, entre las que sobresalen: albahaca (*Ocimum basilicum* L.), menta (*Mentha x piperita* L.), orégano (*Origanum vulgare*), tomillo (*Thymus vulgaris*) se han estudiado con el fin de evaluar a las enzimas relacionadas a la biosíntesis de los diferentes metabolitos que tienen capacidad antioxidante en los tejidos vegetales (Nickavar, Alinaghi, & Kamalinejad, 2008).

En el caso particular de la salvia, perteneciente a la familia Labiatae, se emplea en la gastronomía para condimentar platillos y es benéfica para la salud, ya que se considera antidiabética, antidiarreica, antiinflamatoria y antiséptica; también se utiliza en la industria alimentaria, cosmética y en la elaboración de licores (Melero, Moré, & Cristóbal, 2009).

En estudios relacionados con antioxidantes y enzimas en plantas, una función primordial es la reducción de oxígeno (O_2) a agua, que ocurre secuencialmente. En este sentido, si la molécula de O_2 sólo recibe de uno a tres electrones, forma a las especies reactivas de oxígeno (ERO) las cuales incorporan a la molécula de peróxido de hidrógeno, que tiene propiedades químicas similares a las del superóxido, y fácilmente puede formar los radicales hidroxilo que son altamente reactivos (Quirós-Sauceda, Palafox, Robles-Sánchez, & González-Aguilar, 2011). Las ERO juegan un papel importante en la señalización de plantas, ya que controlan procesos como el crecimiento, desarrollo, senescencia, respuesta a estímulos ambientales tanto bióticos como abióticos y la muerte celular programada (Bailey-Serres & Mittler, 2006).

Algunos cambios abióticos, tales como las bajas y altas temperaturas, el exceso de irradiación, la sequía, salinidad, heridas, anoxia y los contaminantes naturales, modifican el balance celular e incrementan la generación de especies reactivas de oxígeno, por lo que la respuesta de un tejido vegetal para producir estas especies podría resultar no solo de la existencia y función de distintas proteínas, sino también de la presencia o ausencia de antioxidantes en la célula. Las especies reactivas de oxígeno se encuentran estrechamente relacionadas con el retraso o inhibición de la oxidación de lípidos y otras moléculas, que se acompañan por el deterioro progresivo de las plantas. También se vincula con el acelerado incremento celular que provoca enfermedades de corazón y cáncer (Rodríguez, Valdés, & Alemán, 2006), es por ello que el consumo de

(Connor, Luby, Hancock, Berkheimer, & Hanson, 2002) with the presence of hydroxyl groups, a situation that also occurs in aromatic plants. Specifically in the case of sage, it has been found to contain a high content of polyphenolic compounds that contribute to its strong antioxidant capacity (Bichra, El-Modafar, El-Abbassi, Bouamama, & Benkhalti, 2013).

The antioxidant activity of phenolic compounds is mainly due to their redox properties, which allow them to act as reducing agents, hydrogen donors and singlet oxygen extinguishers (Pizzale, Bortolomeazzi, Vichi, Beregger, & Lanfranco, 2005). Therefore, the content of antioxidants is an increasingly important parameter with respect to their role in human health and vegetable quality; therefore, it is of great interest to evaluate their changes during postharvest storage (Ayala, Wang, Wang, & González-Aguilar, 2004).

In this regard, the antioxidant defense systems in plants involve a non-enzymatic system, which promotes the synthesis of many secondary metabolites (phenolic acids, flavonoids, tannins and vitamins) in the phenylpropanoid pathway (Yanishlieva, Marinova, & Pokorny, 2006), and an antioxidant system based on enzyme activity that is located in several cellular compartments, which include the enzymes superoxide dismutase, which converts superoxide to H_2O_2 , peroxidase, which converts H_2O_2 to water, and catalase, which eliminates H_2O_2 (Oueslati, Karray-Bouraoui, Attia, Rabhi, Ksouri, & Lachal, 2010).

Added to this, the enzyme activity in fruits and vegetables has served as an indicator of intrinsic metabolic disorders, manifested as external physiological disorders (Pérez, Vargas, Díaz, & Tellez, 1999). This makes it desirable to quantify the activity of various enzymes such as CAT and SOD, which catalyze reactions that lower ROS concentrations, and in some plants they are increased due to the effect of cold during storage (Aquino & Mercado, 2004; Sala & Lafuente, 2000), and peroxidase, which participates in the construction and lignification of the cell wall, the biosynthesis of ethylene and hydrogen peroxide, the regulation of auxin levels, and protection against tissue damage and infection by pathogenic microorganisms.

However, postharvest studies of enzymatic and antioxidant behavior in sage plants stored in refrigeration are scarce. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effect of three temperatures (0, 6 and 23 °C) on the antioxidant capacity and activity of the enzymes superoxide dismutase, catalase, peroxidase and polyphenol oxidase during seven storage times in sage terminal buds.

Materials and methods

Plant material

The *Salvia officinalis* commercial variety Extrakta, grown in the spring-summer of 2012 with export quality, provided by the Glezte S. P. R. de R. L. company, located in Axochiapan, Morelos, Mexico, was used. After

alimentos con alto contenido de antioxidantes aunado con otras alternativas relacionadas con el cuidado de la salud permiten prevenir estas alteraciones (Erdemoglu, Turan, Caköc, Sener, & Aydin, 2006).

Generalmente las plantas con alta capacidad antioxidante contienen más antioxidantes y la mayoría de ellos son compuestos fenólicos (Connor, Luby, Hancock, Berkheimer, & Hanson, 2002) con la presencia de grupos hidroxilo; situación que también prevalece en plantas aromáticas. Específicamente en el caso de salvia se ha encontrado que contiene alto contenido de compuestos polifenólicos que contribuyen a su fuerte capacidad antioxidante (Bichra, El-Modafar, El-Abbassi, Bouamama, & Benkhalti, 2013).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe principalmente a sus propiedades redox, que les permiten actuar como agentes reductores, donantes de hidrógeno y extintores del oxígeno singlete (Pizzale, Bortolomeazzi, Vichi, Beregger, & Lanfranco, 2005). Por lo anterior, el contenido de antioxidantes es un parámetro cada vez más importante con respecto a su funcionalidad en la salud y calidad en hortalizas; por lo cual, es de gran interés evaluar sus cambios durante el almacenamiento poscosecha (Ayala, Wang, Wang, & González-Aguilar, 2004).

En este sentido, los sistemas de defensa antioxidantes en las plantas implican, un sistema no enzimático, donde se promueve la síntesis de numerosos metabolitos secundarios (ácidos fenólicos, flavonoides, taninos y vitaminas) en la ruta de los fenilpropanoides (Yanishlieva, Marinova, & Pokorny, 2006); y un sistema antioxidante basado en la actividad enzimática que se encuentra localizado en varios compartimentos celulares, en los que se incluyen a las enzimas superóxido dismutasa que convierte al superóxido a H_2O_2 , la peroxidasa que convierte el H_2O_2 a agua y la catalasa que elimina al H_2O_2 (Oueslati, Karray-Bouraoui, Attia, Rabhi, Ksouri, & Lachal, 2010).

Aunado a esto, la actividad enzimática ha servido en productos hortofrutícolas como un indicador de alteraciones metabólicas intrínsecas, manifestadas como desórdenes fisiológicos externos (Pérez, Vargas, Díaz, & Tellez, 1999). Lo anterior hace conveniente cuantificar la actividad de varias enzimas como CAT y SOD, las cuales catalizan las reacciones que disminuyen las concentraciones de ERO, y en algunas plantas se incrementan por efecto del frío, durante el almacenamiento (Aquino & Mercado, 2004; Sala & Lafuente, 2000), y la peroxidasa, que participa en la construcción y lignificación de la pared celular, en la biosíntesis de etileno y peróxido de hidrógeno, la regulación de niveles de auxina, así como en la protección contra el deterioro de tejidos e infección por microorganismos patógenos.

harvesting sage terminal buds of 20 cm in length, they were precooled for 24 h at 5 °C; subsequently, 250 g of sage were packed in 500-g, low-density, transparent, 40 x 60 cm polyethylene bags, with six holes of 0.5 cm in diameter per side, which remained closed during storage.

Experiment location and evaluated treatments

The material was moved to the Fruit Physiology and Multipurpose Laboratories at the Universidad Autónoma Chapingo. The packed sage was stored for 21 days at temperatures of 0 to 6 °C, in a cold-storage room and at 23 °C (control treatment).

Experimental unit and design

The experimental unit was a package with 250 g of sage. The experimental design used in each sampling was completely randomized with four replications, in each of which four analytical determinations were performed.

Evaluated variables

At each temperature level, four packages were transferred to a freezer (-20 °C) for seven different times: 3, 6, 9, 12, 15, 18 and 21 days of storage.

The following were recorded in each sampling: total phenolic concentration (TP), antioxidant capacity (AC), and enzyme activity of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and polyphenol oxidase (POF). Catalase (CAT) activity was determined from acetone extract and the activity of the other enzymes by acetone powder. The results of the variables are reported based on fresh weight.

Extract preparation

Acetone powder was made from the frozen samples (Alia-Tejacal, Colinas-León, Martínez-Damián, & Soto-Hernández, 2005); for this purpose, 80 mL of frozen acetone (-15 °C) were added to 15 g of leaves (without petiole), homogenized in a blender for 25 s and vacuum filtered. After homogenizing and filtering twelve times, the acetone extract was kept under refrigeration (4 ± 2 °C) and the solid was allowed to dry for 15 min at room temperature (23 ± 2 °C), obtaining the acetone powder, which was weighed and stored in a freezer (-20 °C). The weight of the acetone powder was determined according to the ratio: fresh weight of macerated leaves/dry weight of powder.

Total phenolic concentration

Phenols were quantified by the Folin-Ciocalteu method described by Waterman and Mole (1994). First, 7.9 mL of deionized water and 0.5 mL of Folin and Ciocalteu reagent (2N) were added to 0.1 mL of acetone extract;

Sin embargo, estudios poscosecha del comportamiento enzimático y antioxidante en plantas de salvia almacenadas en refrigeración son escasos. Por ello el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de tres temperaturas (0, 6 y 23 °C) sobre la capacidad antioxidante y actividad de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasas durante siete momentos del almacenamiento en brotes terminales de salvia.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se utilizó *Salvia officinalis* de la variedad comercial Extrakta, cultivada en el ciclo primavera-verano de 2012, con calidad de exportación, proporcionada por la empresa Glezte S. P. R. de R. L., localizada en Axochiapan, Morelos, México. Después de cosechar brotes terminales de salvia de 20 cm de longitud, se preenfriaron durante 24 h a 5 °C; posteriormente, se empacaron 250 g de salvia en bolsas de 500 g, de polietileno de 40 x 60 cm transparente de baja densidad, con seis perforaciones de 0.5 cm de diámetro por lado, las cuales permanecieron cerradas durante el almacenamiento.

Ubicación del experimento y tratamientos evaluados

El material se trasladó a los Laboratorios de Fisiología de Frutales y de Usos Múltiples de la Universidad Autónoma Chapingo. La salvia empacada se almacenó durante 21 días, en temperaturas de 0 y 6 °C, en cámaras frigoríficas y en 23 °C (tratamiento testigo).

Unidad y diseño experimental

La unidad experimental fue un empaque con 250 g de salvia. El diseño experimental empleado en cada muestreo fue completamente al azar con cuatro repeticiones, en cada una de las cuales se realizaron cuatro determinaciones analíticas.

Variables evaluadas

En cada nivel de temperatura, cuatro empaques fueron transferidos a un congelador (-20 °C) en siete oportunidades: 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21 días de almacenamiento.

En cada muestreo se registraron: concentración total de fenoles (FT), capacidad antioxidante (CA), actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POD) y polifenoloxidasas (POF). La actividad de la catalasa (CAT) se determinó a partir del extracto de acetona y la actividad de las otras enzimas mediante polvo de acetona. Los resultados de las variables se reportaron con base en peso fresco.

the mixture was vigorously stirred and 1.5 mL of sodium carbonate solution (20 %) were added. Then it was allowed to stand for 2 h in darkness; then the samples were read at 760 nm in a spectrophotometer. By means of a standard curve of tannic acid, the results were reported in mg of tannic acid equivalent expressed as fresh weight (mg TAE·kg⁻¹ FW).

Antioxidant capacity

The antioxidant capacity was determined according to the 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method (Ozgen, Reese, Tulio, Scheerens, & Miller, 2006). An ABTS solution (7 mM) with potassium persulfate (2.45 mM) was kept in darkness for 24 h at room temperature; then the solution was diluted with phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) until obtaining an absorbance value of 0.700 nm ± 0.02 in a spectrophotometer (GENESYS™ 10UV) calibrated at 734 nm.

The assay of the samples was performed with 2.9 mL of ABTS solution and 0.1 mL of ethanol extract from acetone powder (0.05 g of acetone powder in 5 mL of ethanol, homogenized with 24 h rest); after 2 h, reading was performed at 734 nm. Quantification was done by calibration curve with ascorbic acid, and the values were reported in mg of vitamin C equivalent antioxidant capacity per g of sample expressed in fresh weight (mg VCEAC·g⁻¹ FW).

Enzyme activity of superoxide dismutase (Enzyme Commission [EC] number 1.15.1.1, SOD)

Extraction of SOD was made from 0.05 g of acetone powder, to which 5 mL of Tris-HCl buffer (0.1 M, pH 7.8) were added and homogenized for 20 s; it was centrifuged at 12,000 x g at 4 °C for 30 min and the supernatant was stored. For the enzyme assay, the methodology proposed by Beyer and Fridovich (1987) was used; 27 mL of phosphate buffer (0.05 M, pH 7.8) containing 0.1 mM of EDTA (pH 7.8), 1.5 mL of L-methionine (30 mg·mL⁻¹), 1 mL of nitro blue tetrazolium (1.41 mg·mL⁻¹) and 0.75 mL of Triton X-100 at 1 % were mixed. Then 0.5 mL of the supernatant and 0.03 mL of riboflavin (4.4 mg·100 mL⁻¹) were added to this reaction mixture; the mixture was stirred and illuminated for seven minutes with fluorescent light, and then the samples were read in absorbance at 560 nm. The enzyme activity was reported as units of enzyme activity per mg of protein (U·mg⁻¹ P), where a U of superoxide dismutase is equal to the amount of supernatant that photo-inhibits 50 % of the formation of nitro blue tetrazolium formazan (Giannopolities & Ries, 1977).

The increase in absorbance due to the formation of nitro blue tetrazolium formazan per unit of time equals the rate of reaction, and the absorbance in the absence or presence of various amounts of superoxide dismutase was used to determine the number of

Preparación de los extractos

Con las muestras congeladas se elaboró polvo de acetona (Alia-Tejecal, Colinas-León, Martínez-Damián, & Soto-Hernández, 2005); para lo cual, a 15 g de hojas (sin peciolo) se adicionaron 80 mL de acetona en congelación (-15 °C), se homogenizaron en licuadora por 25 s y se filtraron al vacío. Después de homogenizar y filtrar en doce ocasiones, el extracto de acetona se guardó en refrigeración (4 ± 2 °C) y el sólido se dejó secar por 15 min a temperatura ambiente (23 ± 2 °C), obteniendo el polvo de acetona, que se pesó y almacenó en un congelador (-20 °C). El peso del polvo de acetona se determinó en función de la relación: peso fresco de hojas maceradas/ peso del polvo seco.

Concentración total de fenoles

Se cuantificaron por el método de Folin y Ciocalteu descrito por Waterman y Mole, (1994). A 0.1 mL de extracto de acetona se adicionaron 7.9 mL de agua desionizada y 0.5 mL del reactivo de Folin y Ciocalteu (2 N), la mezcla se agitó vigorosamente y se agregaron 1.5 mL de solución de carbonato de sodio (20 %); posteriormente se dejó reposar por 2 h en oscuridad; después las muestras se leyeron a 760 nm en un espectrofotómetro. Por medio de una curva patrón de ácido tánico, los resultados se reportaron en mg de ácido tánico expresado en peso fresco (mg ATE·kg⁻¹ PF).

Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se determinó de acuerdo al método ABTS (2,2-azinobis [3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico]) (Ozgen, Reese, Tulio, Scheerens, & Miller, 2006). Una solución de ABTS (7mM) con persulfato de potasio (2.45 mM) se mantuvo en oscuridad durante 24 h a temperatura ambiente; posteriormente la solución se diluyó con buffer fosfato (0.1 M, pH 7.4) hasta obtener un valor en absorbancia de 0.700 nm ± 0.02 en espectrofotómetro (GENESYS™10S UV) calibrado a 734 nm.

El ensayo de las muestras se realizó con 2.9 mL de solución de ABTS y 0.1 mL de extracto etanólico de polvo de acetona (0.05 g de polvo de acetona en 5 mL de etanol, homogeneizados con 24 h de reposo), después de 2 h, la lectura se realizó a 734 nm. La cuantificación se hizo mediante curva de calibración con ácido ascórbico, los valores se reportaron en mg de actividad antioxidante equivalente a vitamina C por cada g de muestra expresado en peso fresco (mg AAEVC·g⁻¹ PF).

Actividad enzimática de superóxido dismutasa (número Enzyme Commission [por sus siglas en inglés EC] 1.15.1.1, SOD)

La extracción de la SOD se realizó a partir de 0.05 g de polvo de acetona, al cual se le adicionaron 5 mL de

units per ml of superoxide dismutase in the solution (Stauffer, 1989).

Enzyme activity of catalase (EC number 1.11.1.6, CAT)

CAT was extracted from 0.05 g of acetone powder and then homogenized with 5 mL of Tris-HCl (0.1 M, pH 8.5) containing 1 % polyvinylpyrrolidone (PVP). The mixture was centrifuged at 12,000 x g for 40 min at 4 °C, and the supernatant was retained. Catalase activity was determined using the method described by Blackwell, Murray, and Lea (1990), for which, in a quartz cell, 3 mL of Tris-HCl buffer (10 mM, pH 8.5) and 0.1 mL of 88 % H_2O_2 were placed. The reaction was initiated by adding 0.1 mL of the supernatant. Finally, the change in absorbance of the samples at 240 nm was observed, by recording readings at 20, 60 and 180 s. The enzyme activity was reported as units of enzyme activity per mg of protein ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ P}$), where a U is equal to the decomposition of $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ of H_2O_2 .

Enzyme activity of peroxidase (EC number 1.11.1.7, POD)

POD was extracted from 0.05 g of acetone powder that was homogenized for 10 s, with 5 mL of Tris-HCl (0.1 M, pH 7.1) with 1 % PVP; the mixture was centrifuged at 12,000 x g at 4 °C for 40 min, and the supernatant was saved. For this test, the Flurkey and Jen method (1978) was applied; 2.45 mL of Tris-HCl buffer (0.1 M, pH 7.1), 0.25 mL of guaiacol (0.1 M), 0.1 mL of H_2O_2 at 0.25 % and 0.2 mL of supernatant were mixed. In this mixture, with a total volume of 3 mL, the change in absorbance was determined at 470 nm and sample readings were made at 30, 120 and 180 s. The enzyme activity was reported as units of enzyme activity per mg of protein ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ P}$), where U is equal to the formation of $1\ \mu\text{mol}$ of tetraguaiacol per minute.

Enzyme activity of polyphenol oxidase (EC number 1.14.18.1, PFO)

PFO was extracted with the same procedure used with peroxidase. Polyphenol oxidase enzyme activity was assessed by the method proposed by Laminkanra (1995); 3 mL of catechol (60 mM) dissolved in Tris-HCl buffer (0.1 M, pH 7.1) and 0.2 mL of supernatant were used. With this mixture, the change in absorbance of the samples at 420 nm was evaluated, by recording readings at 20, 60 and 120 s. The enzyme activity was reported as units of enzyme activity per mg of protein ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ P}$), where U is equal to the formation of $1\ \mu\text{mol}$ of o-benzoquinone per minute.

The protein extracted from the plant, with which the activity of SOD, CAT, POD and POF was reported, was determined by the method described by Bradford (1976), for which 0.05 g of acetone powder were homogenized for

buffer Tris-HCl (0.1 M, pH 7.8) y se homogeneizaron por 20 s; se centrifugó a 12,000 x g a 4 °C por 30 min y se almacenó el sobrenadante. Para el ensayo enzimático se empleó la metodología propuesta por Beyer y Fridovich (1987). Se mezclaron 27 mL de buffer fosfatos (0.05 M, pH 7.8), que contenía 0.1 mM de EDTA (pH 7.8), 1.5 mL de L-metionina ($30\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 1 mL de nitro blue tetrazolium ($1.41\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y 0.75 mL de Triton X-100 al 1 %. A 3 mL de esta mezcla de reacción se adicionaron 0.5 mL del sobrenadante y 0.03 mL de riboflavina ($4.4\ \text{mg}\cdot 100\ \text{mL}^{-1}$); la mezcla se agitó e iluminó por siete minutos con luz fluorescente, y posteriormente las muestras se leyeron en absorbancia a 560 nm. La actividad enzimática se reportó como unidad de actividad enzimática por cada mg de proteína ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ P}$), donde una U de superóxido dismutasa es igual a la cantidad de sobrenadante que foto-inhibe el 50 % de la formación de nitro blue tetrazolium formazan (Giannopolities & Ries, 1977).

El incremento en absorbancia debido a la formación de nitro blue tetrazolium formazan por unidad de tiempo equivale a la velocidad de reacción, y la absorbancia en ausencia o en presencia de varias cantidades de superóxido dismutasa se utilizó para determinar el número de unidades por mL de superóxido dismutasa en la solución (Stauffer, 1989).

Actividad enzimática de catalasa (número EC 1.11.1.6, CAT)

La CAT se extrajo a partir de 0.05 g de polvo de acetona, éste se homogeneizó con 5 mL de Tris-HCl (0.1 M, pH 8.5) que contenía 1 % de polivinilpirrolidona (PVP). La mezcla se centrifugó a 12,000 x g por 40 min a 4 °C, y se conservó el sobrenadante. La actividad de catalasa se determinó por el método descrito por Blackwell, Murray, y Lea (1990) para lo cual, en una celda de cuarzo, se colocaron 3 mL de amortiguador Tris-HCl (10 mM, pH 8.5) y 0.1 mL de H_2O_2 al 88 %. La reacción se inició al adicionar 0.1 mL del sobrenadante. Por último, se observó el cambio en absorbancia de las muestras a 240 nm, al registrar lecturas en 20, 60 y 180 s. La actividad enzimática se reportó como unidad de actividad enzimática por cada mg de proteína ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ P}$), donde una U es igual a la descomposición de $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ de H_2O_2 .

Actividad enzimática de peroxidasa (número EC 1.11.1.7, POD)

La POD se extrajo a partir de 0.05 g de polvo de acetona que se homogeneizaron por 10 s, con 5 mL de Tris-HCl (0.1 M, pH 7.1) con 1 % de PVP, la mezcla se centrifugó a 12,000 x g a 4 °C por 40 min, y se guardó el sobrenadante. Para esta prueba se aplicó el método de Flurkey y Jen (1978). Se mezclaron 2.45 mL de amortiguador Tris-HCl (0.1 M, pH 7.1), 0.25 mL de guayacol (0.1 M), 0.1 mL de

10 s with 5 mL of Tris-HCl (0.1 M, pH 7.1), which had 1 % PVP. This was centrifuged at $12,000 \times g$ for 40 min at 4 °C. Then 0.2 mL of the supernatant was taken and 5 mL of coomassie blue solution were added to it. It was stirred and after 12 min the absorbance at 595 nm was recorded. Quantification was done using a calibration curve with bovine albumin.

Statistical analysis

In each of the seven samplings, analysis of variance and Tukey's test ($P \leq 0.05$) were performed using Statistical Analysis System, ver. 9.0 software (SAS, 2002).

Results and discussion

Total phenolic concentration

In relation to total phenolic content, it was observed that at 3, 6 and 15 days of storage, the treatments at 0 and 6 °C showed statistically ($P \leq 0.05$) similar values ranging from 4.2 to 4.4 mg TAE·kg⁻¹ FW; however, the latter was higher than the control value of TAE 4.1 mg·kg⁻¹ FW, which presented the lowest content of phenols in sage shoots (Table 1). This behavior may be associated with increased antioxidant capacity, since phenols in conjunction with enzymes such as superoxide dismutase and catalase are the first line of defense against oxidative stress induced by low temperatures, keeping the integrity of the cell membrane stable (González, Wang, & Buta, 2011). On the other hand, at 9 and 12 das the three evaluated temperatures were statistically ($P \leq 0.05$) different, with the highest amount of phenols occurring at 6 °C, with values of between 4.45 and 4.47 mg TAE·kg⁻¹ FW. These results are similar to those reported by Martínez-Damián, Cruz-Álvarez, Colinas-León, Rodríguez-Pérez, and Ramírez-Ramírez (2013), in mint (*Mentha x piperita* L.) stored for 15 days, where total phenolic content was greater at 6 and 10 °C, compared to the control. In this sense, Kevers, Falkowski, Tabart, Defraigne, Dommes, and Pincemail (2007) indicate that the stability of phenolic compounds depends on factors such as the refrigeration temperature, relative humidity and oxygen availability; however, products such as tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot.), table grapes (*Vitis vinifera*) and broccoli (*Brassica oleracea italica*) have showed a slight increase in phenolic compounds during the first days of storage. At 18 and 21 das, the highest values statistically ($P \leq 0.05$) for total phenolic content were obtained from plants stored at 6 °C. This behavior was probably because the storage period affected the total concentration of phenols, which under these conditions had an intermediate oxidation state with greater radical-scavenging activity, which promoted the enzymatic oxidation (Kirca & Arslan, 2008).

H₂O₂ al 0.25 % y 0.2 mL del sobrenadante. En esta mezcla, con un volumen total de 3 mL, se determinó el cambio de absorbancia a 470 nm y las lecturas de las muestras se realizaron a los 30, 120 y 180 s. La actividad enzimática se reportó como unidad de actividad enzimática por cada mg de proteína (U·mg⁻¹ P), donde una U es igual a la formación de 1 µmol de tetraguayacol por minuto.

Actividad enzimática de polifenoloxidasas (número EC 1.14.18.1, PFO)

La PFO se extrajo con el mismo procedimiento utilizado en la peroxidasa. La actividad enzimática de la polifenoloxidasas se evaluó mediante el método propuesto por Laminkanra (1995). Se emplearon 3 mL de catecol (60 mM) disuelto en Buffer Tris-HCl (0.1 M, pH 7.1) y 0.2 mL del sobrenadante, con esta mezcla se evaluó el cambio de absorbancia de las muestras a 420 nm, al registrar lecturas en 20, 60 y 120 s. La actividad enzimática se reportó como unidad de actividad enzimática por cada mg de proteína (U·mg⁻¹ P), donde una U es igual a la formación de 1 µmol de o-benzoquinona por minuto.

La proteína extraída de la planta, con la cual se reportó la actividad de cada enzima SOD, CAT, POD y POF, se determinó por el método de Bradford (1976), para lo cual, se homogeneizaron durante 10 s, 0.05 g de polvo de acetona con 5 mL de Tris-HCl (0.1 M, pH 7.1) el cual tenía 1 % de PVP. Ésta se centrifugó a $12,000 \times g$ por 40 min a 4 °C. Se tomaron 0.2 mL del sobrenadante y se le adicionaron 5 mL de solución coomassie blue, se agitó y después de 12 min se registró la absorbancia a 595 nm. La cuantificación se hizo mediante una curva de calibración con albúmina de bovino.

Análisis estadístico

En cada uno de los siete muestreos se realizaron análisis de varianza y comparaciones múltiples de medias de Tukey ($P \leq 0.05$), mediante el paquete *Statistical Analysis System*, ver. 9.0 (SAS, 2002).

Resultados y discusión

Concentración total de fenoles totales

En lo que se refiere al contenido de fenoles totales, se observó que en 3, 6 y 15 días de almacenamiento, los tratamientos a 0 y 6 °C mostraron valores estadísticamente ($P \leq 0.05$) similares de 4.2 a 4.4 mg ATE·kg⁻¹ PF; sin embargo, este último fue superior al testigo 4.1 mg ATE·kg⁻¹ PF, que presentó el menor contenido de fenoles en brotes de salvia (Cuadro 1). Este comportamiento se puede asociar con el incremento de la capacidad antioxidante, debido a que los fenoles en conjunto con las enzimas como superóxido dismutasa y

Antioxidant capacity

Between 3 to 9 das the highest antioxidant capacity in sage terminal buds was observed at 23 °C. From 12 das the lowest values were reported under the 0 °C condition (Table 1). In this regard it has been noted that antioxidant capacity and total phenolic content increase when products are handled at high temperatures, results observed by Kevers et al. (2007) in asparagus (*Asparagus officinalis* L.), spinach (*Spinacia oleracea*) and celery (*Apium graveolens*), stored at 20 °C for 22, 19 and 8 days, respectively. By contrast, other fruits and green leafy vegetables when stored at ± 4 °C such as flamboyant (*Delonix regia*), curry plant (*Helichrysum thianschanicum*) leaves and katuk (*Sauropus androgynus*) (Mathiventhan & Sivakanesan, 2013), or at ± 5 °C like lettuce (*Lactuca sativa*), and at 10-12 °C in the case of cucumber (*Cucumis sativus*) and tomato (*Physalis ixocarpa* Brot.) (Kevers et al., 2007), where phenol and antioxidant activity levels remained low because the low temperatures slow the metabolic processes of plants (Mathiventhan & Sivakanesan, 2013).

Later, at 15 das, statistical differences ($P \leq 0.05$) among the three temperatures used were presented; at 23 °C, antioxidant capacity was higher compared with 0 and 6 °C. Finally at 18 and 21 days, in storage at 6 °C the highest AC values were observed. In these last two assessment dates, the control plants did not have adequate quality to be evaluated. Patthamakanokporn, Puwastien, Nitithamyong, and Sirichakwal (2008) stated that antioxidant capacity depends on total phenolic content; however, antioxidant activity is not limited to phenolic compounds and can be affected by the presence of other antioxidant secondary metabolites such as volatile oils, carotenoids and vitamins (Javanmardi et al., 2003), a situation that agrees with this work at 0 and 6 °C between 6 and 12 das.

Enzyme activity of superoxide dismutase

In plants, external factors such as temperature, humidity, light, pathogens and injury induce oxidative stress due to an imbalance in the production of reactive oxygen species. Detoxification of reactive oxygen species in plants depends on the enzyme superoxide dismutase (Huang, Xia, Hu, Lu, and Wang, 2007). This study found that at 12 and 15 das with 0 °C, higher superoxide dismutase activity occurred than at 23 °C ($P \leq 0.05$); at 6 and 9 das, this activity was the same at 0 and 6 °C, and higher ($P \leq 0.05$) than that at 23 °C. At 3, 18 and 21 das, SOD activity was statistically equal at all storage temperature levels (Table 1).

Subsequently, at 12 and 15 das, the highest enzyme activity of SOD was obtained from samples stored under refrigeration, a situation that prevailed until the last sampling where the highest activity occurred

catalasa, constituyen la primera línea de defensa contra el estrés oxidativo inducido por las bajas temperaturas, manteniendo estable la integridad de la membrana celular (González, Wang, & Buta, 2011). Por otra parte, en 9 y 12 dda las tres temperaturas evaluadas fueron estadísticamente ($P \leq 0.05$) diferentes, observándose la mayor cantidad de fenoles en 6 °C, con valores de entre 4.45 y 4.47 mg ATE·kg⁻¹ PF. Estos resultados son semejantes a los reportados por Martínez-Damián, Cruz-Álvarez, Colinas-León, Rodríguez-Pérez, y Ramírez-Ramírez (2013), en menta (*Mentha x piperita* L.) almacenada durante 15 días, en donde el contenido de fenoles totales fue superior en 6 y 10 °C, con respecto al testigo. En este sentido, Kevers, Falkowski, Tabart, Defraigne, Dommès, y Pincemail (2007) indican que la estabilidad de los compuestos fenólicos depende de factores como la temperatura de refrigeración, la humedad relativa y la disposición de oxígeno; sin embargo, en productos como el tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.), la uva de mesa (*Vitis vinífera*) y el brócoli (*Brassica oleracea italica*) se ha presentado un ligero aumento de los compuestos fenólicos durante los primeros días de almacenamiento. A los 18 y 21 dda, los valores estadísticamente ($P \leq 0.05$) más altos en el contenido de fenoles totales se obtuvieron de plantas almacenadas en 6 °C. Este comportamiento probablemente fue debió a que el periodo de almacenamiento afectó la concentración total de fenoles, que en estas condiciones presentaron un estado de oxidación intermedio con mayor actividad captadora de radicales, lo cual promovió la oxidación enzimática (Kirca & Arslan, 2008).

Capacidad antioxidante

Entre 3 y 9 dda la mayor capacidad antioxidante de brotes terminales de salvia se observó en 23 °C. A partir de los 12 dda los valores más bajos se reportaron en la condición de 0 °C (Cuadro 1). Al respecto se ha señalado que la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales aumenta cuando los productos son manejados en altas temperaturas, resultados observados por Kevers et al. (2007) en espárrago (*Asparagus officinalis* L.), espinaca (*Spinacia oleracea*) y apio (*Apium graveolens*), almacenados en 20 °C durante 22, 19 y 8 días, respectivamente. En contraste, otros frutos y vegetales de hoja verde cuando se almacenan en ± 4 °C como el flamboyán (*Delonix regia*), hojas de curry (*Helichrysum thianschanicum*) y mani cai (*Sauropus androgynus*) (Mathiventhan & Sivakanesan, 2013), o en ± 5 °C como la lechuga (*Lactuca sativa*), y en 10 a 12 °C en el caso de pepino (*Cucumis sativus*) y tomate (*Physalis ixocarpa* Brot.) (Kevers et al., 2007), donde los niveles de fenoles y actividad antioxidante se mantuvieron bajos debido a que las bajas temperaturas retardan los procesos metabólicos de las plantas (Mathiventhan & Sivakanesan, 2013).

Posteriormente, en 15 dda se presentaron diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) entre las tres temperaturas

Table 1. Content of total phenols and antioxidant capacity (TP and AC), and activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) and polyphenol oxidase (PFO) in sage shoots stored at 0, 6 and 23 °C for 21 days.

Cuadro 1. Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante (FT y CA), y actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POD) y polifenoloxidasas (PFO) en brotes de salvia almacenada en 0, 6 y 23 °C durante 21 días.

Storage temperature (°C)/ Temperatura de almacenamiento (°C)	TP ^y (mg TAE·kg ⁻¹ FW)/ FT ^y (mg ATE·kg ⁻¹ PF)	AC (mg VCEAC·g ⁻¹ FW)/ CA (mg AAECV·g ⁻¹ PF)	SOD ^y (U·mg ⁻¹ P)	CAT (U·mg ⁻¹ P)	POD (U·mg ⁻¹ P)	PFO (U·mg ⁻¹ P)
0 days of storage/0 días de almacenamiento						
	4.52*	53.75	5.4*	13.6	27.3*	15.4
3 days of storage/3 días de almacenamiento						
0	4.26a	49.68b	6.0a	14.1a	39.0az	13.7b
6	4.24a	50.62b	5.3b	13.9a	30.3b	14.3b
23	4.17b	63.74a	5.2b	13.2a	19.6c	21.3a
HSD/DMSH	0.2	6.7	0.9	1.7	8.1	3.4
6 days of storage/6 días de almacenamiento						
0	4.30a	61.49b	6.0a	14.2a	28.5ab	19.8b
6	4.28a	65.13b	5.9a	12.6a	23.0b	10.9c
23	4.19b	68.74a	5.6a	9.4b	32.8a	24.8a
HSD/DMSH	0.2	4.6	0.8	1.5	6.9	4.5
9 days of storage/9 días de almacenamiento						
0	4.28b	63.36b	3.8a	14.0a	25.2b	20.6b
6	4.47a	67.42b	3.2b	14.0a	16.8c	13.1c
23	4.15c	74.26a	3.4b	10.4b	34.9a	27.9a
HSD/DMSH	0.3	5.5	0.7	1.7	6.9	4.8
12 days of storage/12 días de almacenamiento						
0	4.37b	73.98b	4.0a	13.4a	33.1b	18.9b
6	4.45a	82.19a	3.9a	11.3b	34.4b	27.1a
23	4.12c	80.06a	3.3b	9.0c	40.0a	26.3a
HSD/DMSH	0.3	4.2	0.7	1.5	6.3	3.9
15 days of storage/15 días de almacenamiento						
0	4.39a	59.88c	5.6a	11.5a	33.2b	13.4c
6	4.40a	78.24b	5.7a	9.8b	34.3b	24.3b
23	4.09b	88.57a	4.2b	9.9b	39.9a	28.5a
HSD/DMSH	0.3	5.2	0.8	1.4	5.0	2.9
18 days of storage/18 días de almacenamiento						
0	4.41b	60.62b	5.5a	8.9a	46.9a	16.7a
6	4.43a	72.16a	5.0b	9.6a	35.9b	20.7a
23	-	-	-	-	-	-
HSD/DMSH	0.2	4.9	0.7	1.3	7.2	4.2
21 days of storage/21 días de almacenamiento						
0	4.46b	53.42b	5.8a	11.8a	76.2a	17.3b
6	5.07a	62.68a	5.3b	13.9a	40.4b	20.7a
23	-	-	-	-	-	-
HSD/DMSH	0.2	4.6	0.8	2.1	5.4	2.9

*Treatments had no effect; the mean is only reported as a reference. *Means with the same letter within columns and storage periods are not statistically different (Tukey, $P \leq 0.05$). HSD: honest significant difference, ^yTP: total phenols, AC: antioxidant capacity, ^ySOD: superoxide dismutase, CAT: catalase, ^yPOD: peroxidase and PFO: polyphenol oxidase.

*No hay efecto de tratamientos, solo se reporta la media como referencia. *Medias con la misma letra dentro de columnas y dentro de períodos de almacenamiento, no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$). DMSH: diferencia mínima significativa honesta, ^yTP: fenoles totales, CA: capacidad antioxidante, ^ySOD: superóxido dismutasa, CAT: catalasa, ^yPOD: peroxidasa y PFO: polifenoloxidasas.

in leaves refrigerated at 0 °C. This can occur because low temperatures confer protection against possible damage to the cell membrane. This is consistent with Cuadra-Crespo and del Amor (2010) and Oliveira, Rufino, Moura, Cavalcanti, Alves, and Miranda (2011), who in evaluating the activity of SOD in sweet peppers (*Capsicum annuum* var. *Annuum*) and acerola (*Malpighia emarginata*), stored at low temperatures and high relative humidity, observed an increase in its activity without damage to their appearance. These results are also consistent with those reported by Martínez-Damián et al. (2013), who stored mint for 15 days and found that at 6 and 10 °C the activity of superoxide dismutase was higher ($P \leq 0.05$) (with values between 26.2 and 20.7 U·mg⁻¹ P, respectively), compared with mint kept at 20 °C (17.89 U·mg⁻¹ P).

With regard to these results, plant resistance to low temperatures is associated with the joint activity of the enzymes superoxide dismutase and catalase, more than to other physiological factors (Polata, Wiliniska, Bryjak, & Polakovic, 2009), since they are the first line of cellular defense against reactive oxygen species (Ferreira-Silva, Voigt, Silva, Maia, Aragão, & Silveira, 2012). On the other hand, the effect of low-temperature storage is associated with a significant increase in superoxide dismutase activity and decreased senescence, so if this enzyme is active, it may slow the damage caused by plant aging (Balois-Morales, Colinas-León, Peña-Valdivia, Chávez-Franco, & Alia-Tejcal, 2008).

Enzyme activity of catalase

Catalase activity (Table 2) showed no differences ($\alpha = 0.05$) at 3 das, suggesting the stability of the enzyme at the beginning of the experiment. Subsequently and until 15 das, the recorded values of the refrigerated plants (0 and 6 °C) were higher ($P \leq 0.05$) than those of the control (23 °C), where conservation at 0 °C was greater, particularly at 15 and 18 das, since in the last evaluations the refrigerated leaves had the same behavior. This increase in catalase activity probably occurred because this enzyme is involved in the defense mechanism against cold stress (Polata et al., 2009).

These results are consistent with those of Duarte-Baquero, Castro-Rivera, and Narváez-Cuenca (2005), who by storing yellow pitaya (*Acanthocereus pitajaya*) observed an increase in catalase activity at the lowest storage temperature tested (1,300 U·mg⁻¹ P), unlike what was reported by Balois-Morales et al. (2008) in pithaya (*Hylocereus undatus*) fruit, where catalase activity showed no association with temperature or cold storage time; moreover, inhibition of catalase activity was partially or completely reversed with storage at 22 ± 1 °C. Also, Oliveira et al. (2011) observed in acerola that catalase activity was minimal, regardless

empleadas; en 23 °C la capacidad antioxidante fue mayor en comparación con 0 y 6 °C. Finalmente en 18 y 21 días, en el almacenamiento a 6 °C se observaron los valores más altos de CA. En estas dos últimas fechas de evaluación las plantas testigo no presentaron la calidad adecuada para ser evaluadas. Patthamakanokporn, Puwastien, Nitithamyong, y Sirichakwal (2008) mencionaron que la capacidad antioxidante depende del contenido de fenoles totales, no obstante, la actividad antioxidante no está limitada a los compuestos fenólicos y puede ser afectada por la presencia de otros metabolitos secundarios antioxidantes, como aceites volátiles, carotenoides y vitaminas (Javanmardi et al., 2003) situación que concuerda con este trabajo en 0 y 6 °C entre los 6 y 12 dda.

Actividad enzimática de superóxido dismutasa

En las plantas, los factores externos como la temperatura, humedad, luz, patógenos y lesiones, inducen estrés oxidativo debido a un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno. Para que las plantas se desintoxiquen de las especies reactivas de oxígeno dependen de la enzima superóxido dismutasa (Huang, Xia, Hu, Lu, & Wang, 2007). En este trabajo se encontró que en 12 y 15 dda con 0 °C se observó mayor actividad de superóxido dismutasa con respecto a 23 °C ($P \leq 0.05$); en 6 y 9 dda esta actividad fue igual bajo 0 y 6 °C, y superior ($P \leq 0.05$) a la de 23 °C. En 3, 18 y 21 dda la actividad de SOD fue estadísticamente igual en los niveles de temperatura de conservación (Cuadro 1).

Posteriormente, en 12 y 15 dda, la mayor actividad enzimática de SOD se obtuvo de las muestras conservadas en refrigeración, situación que prevaleció hasta el último muestreo donde la mayor actividad se presentó en hojas refrigeradas en 0 °C. Esto puede ocurrir debido a que las bajas temperaturas confieren protección contra un posible daño de la membrana celular. Esto concuerda con Cuadra-Crespo y del Amor (2010) y Oliveira, Rufino, Moura, Cavalcanti, Alves, y Miranda (2011), quienes al evaluar la actividad de la SOD en pimientos verdes (*Capsicum annuum* var. *Annuum*) y acerola (*Malpighia emarginata*), almacenados en bajas temperaturas y alta humedad relativa, observaron un incremento en su actividad sin que se presentaran daños en la apariencia. Estos resultados también coinciden con los reportados por Martínez-Damián et al. (2013) quienes al almacenar menta durante 15 días, encontraron que a 6 y 10 °C la actividad de la superóxido dismutasa fue superior ($P \leq 0.05$) (con valores entre 26.2 y 20.7 U·mg⁻¹ P, respectivamente), comparada con la que se mantuvo en 20 °C (17.89 U·mg⁻¹ P).

Con respecto a estos resultados, la resistencia de las plantas a temperaturas bajas se encuentra asociada a la actividad conjunta de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa, más que a otros factores fisiológicos (Polata,

of storage temperature (with values between 0.7 and 0.9 $\mu\text{molH}_2\text{O}_2\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}\text{P}$).

This indicates that catalase behavior depends on the species, physiological harvest time and storage time, among other factors. The upward trend in catalase at 21 das, compared to 15 das, suggests that in senescent plants the natural production of free radicals in aging tissue promotes an antioxidant response by increasing catalase activity (Duarte-Baquero et al., 2005).

Enzyme activity of peroxidase

At 3 das, there were statistical differences ($P \leq 0.05$) among the three treatments assayed (Table 3), with the highest peroxidase activity at 0 °C (39.0 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$). These results are consistent with those of Martínez-Damián et al. (2013), who found that in mint stored for 15 days that peroxidase activity was higher at 10 °C (306.29 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$) than at 20 °C (162.50 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$). The increase in peroxidase at low temperatures is considered a consequence of the system's ability to delay senescence, since it is responsible for catalyzing the decomposition of hydrogen peroxide (Balouchi, Peyvast, Ghasemnezhad, & Saadatian, 2011).

From 6 to 15 das, sage shoots stored at 23 °C had the highest peroxidase activity ($P \leq 0.05$), increases that may be associated with the generation of oxidative stress caused by the exposure of plant leaves to unfavorable temperature conditions, so a greater release of peroxidase can be generated in the cytoplasm, which increases its activity (Able, Wong, Prasad, & Ohare, 2005).

In terms of 18 to 21 das, POD activity at 0 °C was higher ($P \leq 0.05$) than at 6 °C; there was also an increase from the beginning of storage. These results agree with those of Balouchi et al. (2011), who by storing broccoli florets for 40 days observed that in the last days of evaluation the low temperature (0 °C) resulted in a significant increase in POD activity (with values ranging between 5.4 and 7.2 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$).

Enzyme activity of polyphenol oxidase

In this study, at 3 das at 23 °C the highest polyphenol oxidase activity (21.3 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\text{P}$) (Table 3) was observed, compared to the treatments at 0 and 6 °C, which had statistically similar activity. At 12 das, similar behavior was presented, although 6 and 23 °C (with values of 27.1 and 26.3 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\text{P}$, respectively) were different ($P \leq 0.05$) at 0 °C (18.9 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\text{P}$). In this regard, Hassanpour, Khavari-Nejad, Nikman, Najafi, and Razavi (2012) note that polyphenol oxidase is only located in plastids and is released to the cytosol due to damage or the senescence process that is related to plant respiration and which accelerates with high temperatures, generating degradation products

Wiliniska, Bryjak, & Polakovic, 2009), ya que constituyen la primera línea de defensa celular en contra de las especies reactivas de oxígeno (Ferreira-Silva, Voigt, Silva, Maia, Aragão, & Silveira, 2012). Por otra parte, el efecto del almacenamiento en bajas temperaturas se asocia al incremento significativo de la actividad de la superóxido dismutasa y a la disminución del proceso de senescencia, por lo que, si esta enzima se encuentra activa, es posible que puedan retardarse los daños causados por el envejecimiento de las plantas (Balois-Morales, Colinas-León, Peña-Valdivia, Chávez-Franco, & Alia-Tejecal, 2008).

Actividad enzimática de catalasa

La actividad de la catalasa (Cuadro 1) no presentó diferencias ($\alpha = 0.05$) en 3 dda, esto sugiere estabilidad de la enzima al inicio del experimento. Posteriormente y hasta 15 dda, los valores registrados de plantas refrigeradas (0 y 6 °C) fueron mayores ($P \leq 0.05$) a las del testigo (23 °C), donde la conservación en 0 °C fue la mayor, particularmente en 15 y 18 dda, ya que en las últimas evaluaciones las hojas refrigeradas tuvieron el mismo comportamiento. Este incremento de catalasa probablemente ocurrió porque dicha enzima participa en el mecanismo de defensa contra del estrés por frío (Polata et al., 2009).

Estos resultados coinciden con Duarte-Baquero, Castro-Rivera, y Narváez-Cuenca (2005) quienes al almacenar pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*) observaron un incremento de la actividad de la catalasa en la más baja temperatura de almacenamiento probada (1,300 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\text{P}$), a diferencia de lo reportado por Balois-Morales et al. (2008) en frutos de pithaya (*Hylocereus undatus*), donde la actividad de la catalasa no mostró asociación con la temperatura o tiempo de almacenamiento con frío; además, la inhibición de la actividad de la catalasa fue revertida parcial o totalmente con el almacenamiento en 22 ± 1 °C. Asimismo, Oliveira et al. (2011) observaron en acerola que la actividad de la catalasa fue mínima, independientemente de las temperaturas de almacenamiento (con valores entre 0.7 y 0.9 $\mu\text{molH}_2\text{O}_2\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}\text{P}$).

Lo anterior indica que el comportamiento de la catalasa depende de la especie, momento fisiológico de cosecha y tiempo de almacenamiento, entre otros factores. La tendencia del incremento de la catalasa en 21 dda, con respecto a 15 dda sugiere que en plantas senescentes la producción natural de radicales libres en tejido que envejece, promueve una respuesta antioxidante, mediante el incremento de la actividad de catalasa (Duarte-Baquero et al., 2005).

Actividad enzimática de peroxidasa

En 3 dda se presentaron diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) entre los tres tratamientos ensayados (Cuadro 1),

which increase the concentration of substrates causing dark stains on the leaves (de Almeida, Durigan, Mattiu, Alves, & O'hare, 2006).

The results at 6, 9 and 15 das indicated that the highest polyphenol oxidase activity was obtained in sage stored at 23 °C, an effect similar to that described by Martínez-Damián et al. (2013), who report that polyphenol oxidase activity increases rapidly with high storage temperatures, so there may be a direct association between the enzyme and increased temperature.

At 18 das, a decrease in this enzyme occurred due to the effect of the low temperature, which was significant ($P \leq 0.05$) at 21 das, where storage at 0 °C had the lowest polyphenol oxidase activity. This result is consistent with that of López-Blancas, Martínez-Damián, Colinas-León, Bautista-Bañuelos, Martínez-Solís, and Rodríguez-Pérez (2014), who by storing basil at 10 °C observed that polyphenol oxidase activity decreased after a period of 16 storage days, with values ranging from 31.0 to 15.3 U·mg⁻¹ P. In this sense, when plant tissues are stressed by factors such as cold, there are changes in the respiratory rate, accumulation of phenolic compounds and variations in polyphenol oxidase activity, which increase as a defense against the cold.

Conclusions

Cooling sage decreased total phenolic content and antioxidant capacity, compared to the control; however, the activity of the enzymes superoxide dismutase and catalase increased. In most of the evaluated times (3, 6, 12 and 15 das), the activity of the enzymes peroxide and polyphenol oxidase was lower at low temperatures (0 and 6 °C), compared to the control (23 °C). Sage storage at 0 °C reduced the activity of enzymes linked to oxidative processes, in most of the storage times studied.

End of English version

References / Referencias

- Alia-Tejagal, I., Colinas-León, M. T., Martínez-Damián, M. T., & Soto-Hernández, M. R. (2005). Daños por frío en zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn) II: Cambios en fenoles totales y actividad enzimática. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 28, 25-32. Obtenido de <http://www.chapingo.mx/revistas/revistas/articulos/doc/rchshVIII219.pdf>
- Able, A. J., Wong, L. S., Prasad, A., & Ohare, T. J. (2005). The physiology of senescence in detached pak choy leaves (*Brassica rapa* var. *chinensis*) during storage at different
- la mayor actividad de la peroxidasa a 0 °C (39.0 U·g⁻¹ PF). Estos resultados coinciden con Martínez-Damián et al. (2013) quienes encontraron que en menta almacenada por 15 días, la actividad de la peroxidasa fue mayor en 10 °C (306.29 U·g⁻¹ PF) que en 20 °C (162.50 U·g⁻¹ PF). El incremento de la peroxidasa en bajas temperaturas es considerado una consecuencia de la capacidad del sistema para retrasar la senescencia, ya que se encarga de catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno (Balouchi, Peyvast, Ghasemnezhad, & Saadatian, 2011).
- A partir de 6 y hasta 15 dda, los brotes de salvia almacenados en 23 °C presentaron la mayor actividad de la peroxidasa ($P \leq 0.05$), incrementos que pueden estar asociados a la generación de estrés oxidativo provocado por la exposición de las hojas de los vegetales a condiciones no favorables de temperatura, por lo que se puede generar mayor liberación de peroxidasa en el citoplasma, con lo que se incrementa su actividad (Able, Wong, Prasad, & Ohare, 2005).
- En cuanto a 18 y 21 dda la actividad de la POD en 0 °C fue superior ($P \leq 0.05$) con respecto a 6 °C; asimismo se tuvo un incremento con respecto al inicio del almacenamiento. Estos resultados coinciden con Balouchi et al. (2011) quienes al almacenar floretes de brócoli por 40 días, observaron que en los últimos días de evaluación, la baja temperatura (0 °C) produjo un aumento significativo en la actividad de la enzima (con valores que oscilaron entre 5.4 y 7.2 U·g⁻¹ PF).

Actividad enzimática de polifenoloxidasas

En este trabajo se observó que en 3 dda en 23 °C, mostró la mayor actividad de la polifenol oxidasa (21.3 U·mg⁻¹ P) (Cuadro 1), en comparación con los tratamientos a 0 y 6 °C, los cuales tuvieron actividad estadísticamente similar. En 12 dda se presentó comportamiento similar, aunque 6 y 23 °C (con valores de 27.1 y 26.3 U·mg⁻¹ P, respectivamente), fueron diferentes ($P \leq 0.05$) a 0 °C (18.9 U·mg⁻¹ P). Al respecto, Hassanpour, Khavari-Nejad, Nikman, Najafi, y Razavi (2012) mencionan que la polifenoloxidasas se encuentra localizada exclusivamente en plastidios y es liberada al citosol como consecuencia de daños o del proceso de senescencia que está relacionado con la respiración de la planta y que se acelera con las altas temperaturas, generando productos de degradación, que aumentan la concentración de sustratos provocando coloraciones oscuras en las hojas (de Almeida, Durigan, Mattiu, Alves, & O'hare, 2006).

Los resultados en 6, 9 y 15 dda indicaron que la mayor actividad de la polifenoloxidasas fue obtenida en la salvia almacenada en 23 °C; efecto similar al descrito por Martínez-Damián et al. (2013) quienes indican que con altas temperaturas de almacenamiento la actividad

- temperatures. *Postharvest Biology and Technology*, 35, 271-278. doi: 10.1016/j.postharvbio.2004.10.004
- Aquino, B. E. N., & Mercado, S. E. (2004). Effects of polyphenol oxidase and peroxidase activity, phenolics and lignin content on the browning of cut jicama. *Postharvest Biol. Technology*, 33, 275-283. doi: 10.1016/j.postharvbio.2004.03.009
- Ayala, Z. J. F., Wang, Y. S., Wang, Y. C., & González-Aguilar, G. A. (2004). Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. *Lebensm.-Wiss. u.-Technologie*, 37, 687-695. doi:10.1016/j.lwt.2004.03.002
- Balois-Morales, R., Colinas- León, M. T., Peña-Valdivia, C. B., Chávez-Franco, S. H., & Alia-Tejagal, I. (2008). Sistema enzimático antisenescencia catalasa-superóxido dismutasa de frutas de pitahaya (*Hylocereus undatus*) almacenados en frío. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 14, 295-299. Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/609/60914309.pdf>
- Balouchi, Z., Peyvast, G. A., Ghasemnezhad, M., & Saadatian, M. (2011). Changes of antioxidant compounds of broccoli (*Brassica oleracea* lvar. *italica*) during storage at low and high temperatures. *South west J Hortic Biol Environ*, 2, 193-212. Obtenido de <http://anucraiova.3x.ro/swjhbe/index.html>
- Bailey-Serres, J., & Mittler, R. (2006). The Roles of Reactive Oxygen Species in Plant Cells. *Plant Physiology*, 141, 308-311. doi: 10.1104/pp.104.900191
- Beyer, F. W., & Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 161, 559-566. doi: 10.1016/0003-2697(87)90489-1
- Bichra, M., El-Modafar, C., El-Abbassi, A., Bouamama, H., & Benkhalti, F. (2013). Antioxidant activities and phenolic profile of six Moroccan selected herbs. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science*, 2, 2320-2338. Obtenido de http://www.jmbfs.org/wp-content/uploads/2013/01/jmbfs_0248_bichra.pdf
- Blackwell, R. D., Murray, A. J. S., & Lea, P. J. (1990). Enzymes of photorespiratory carbon pathway. In J. P. Lea. (Ed.), *Methods in plant biochemistry* (pp. 129-144). London: Academic Press.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Connor, A. M., Luby, J. J., Hancock, J. F., Berkheimer, S., & Hanson, E. J. (2002). Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold temperature storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 893-898. doi: 10.1021/jf011212y
- Cuadra-Crespo, P., & del Amor, M. F. (2010). Effects of postharvest treatments on fruit quality of sweet pepper at low temperature. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 2716-2722. doi: 10.1002/jsfa.4147
- de Almeida, T., Durigan, J. F., Mattiu, B. H., Alves, R., & O'hare, T. J. (2006). Cultivar affects browning susceptibility of la polifenoloxidasas se incrementa rápidamente, por lo que puede existir una asociación directa entre la enzima y el aumento de la temperatura.
- En 18 dda se presentó una disminución de esta enzima por efecto de la baja temperatura, la cual fue significativa ($P \leq 0.05$) en 21 dda, donde el almacenamiento a 0 °C tuvo la menor actividad de la enzima. Este resultado coincide con López-Blancas, Martínez-Damián, Colinas-León, Bautista-Bañuelos, Martínez-Solís, y Rodríguez-Pérez (2014) quienes al almacenar albahaca a 10 °C observaron que la actividad de la polifenoloxidasas disminuyó después de un periodo de 16 días de almacenamiento con valores que oscilaron entre 31.0 a 15.3 U·mg⁻¹ P. En este sentido, cuando los tejidos vegetales son estresados por factores como el frío, ocurren cambios en la intensidad respiratoria, acumulación de compuestos fenólicos y variaciones en la actividad de la polifenoloxidasas, que se incrementan como defensa ante el frío.
- ### Conclusiones
- La refrigeración de salvia disminuyó el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante, con respecto al testigo, no obstante, aumentó la actividad enzimática de la superóxido dismutasa y de la catalasa. En la mayor parte de los momentos evaluados (3, 6, 12 y 15 dda) la actividad de la enzima peroxidasa y polifenoloxidasas fue menor en las temperaturas bajas (0 y 6 °C) respecto al testigo (23 °C). El almacenamiento de salvia a 0 °C redujo, la actividad de enzimas vinculadas a los procesos oxidativos, en la mayor parte de los momentos de almacenamiento estudiados.
- ### Fin de la versión en español
-
- freshly cut star fruit slices. *Sci. Agric. Piracicaba, Brazil*, 63, 1-4. doi: 10.1590/S0103-90162006000100001
- Duarte-Baquero, L. E., Castro-Rivera, J. A., & Narváez-Cuenca, C. E. (2005). Catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasas en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*): maduración y senescencia. *Acta Biológica Colombiana*, 10, 49-59. Obtenido de <http://www.bdigital.unal.edu.co/29135/1/27131-95158-1-PB.pdf>
- Erdemoglu, N., Turan, N. N., Caköç, I., Sener, B., & Aydin, A. (2006). Antioxidant activities of some Lamiaceae plant extracts. *Phytotherapy Research*, 20, 9-13. doi: 10.1002/ptr.1816
- Ferreira-Silva, S. L., Voigt, E. L., Silva, E. N., Maia, J. M., Aragão, T. C. R., & Silveira, J. A. G. (2012). Partial oxidative protection by enzymatic and non-enzymatic components in cashew leaves under high salinity. *Biologia Plantarum*, 56(1), 172-176. Obtenido de <http://www.ueb.asuch.cas.cz/bp/bp.htm>

- Flurkey, W. H., & Jen, J. (1978). Peroxidase and polyphenoloxidase activities in developing peaches. *Journal of Food Science*, 43, 1828-1831. doi: 10.1111/j.1365-2621.1978.tb07424.x
- Giannopolities, C. N., & Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases. *Plant Physiology*, 59, 309-314. Obtenido de <http://www.plantphysiol.org/content/59/2/309.full.pdf>
- González, G. A., Wang, C. Y., & Buta, J. G. (2011). Maintaining quality of fresh-cut mangoes using antibrowning agents and modified atmosphere packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4204-4208.
- Hassanpour, H., Khavari-Nejad, N. A., Nikman, V., Najafi, F., & Razavi, K. (2012). Effects of penconazole and water deficit stress on physiological and antioxidative responses in pennyroyal (*Mentha pulgium* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 34, 1537-1549. doi: 10.1007/s11738-012-0952-8
- Huang, R., Xia, R., Hu, L., Lu, Y., & Wang, M. (2007). Antioxidant activity and oxygen-scavenging system in orange pulp during fruit ripening and maturation. *Scientia Horticulture*, 11, 166-172. doi: 10.1016/j.scienta.2007.03.010
- Javanmardi, J., Stushnoff, C., Lockeb, E., & Vivancob, J. M. (2003). Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry*, 83, 547-550. doi: 10.1016/S0308-8146(03)00151-1
- Kevers, C., Falkowski, M., Tabart, J., Defraigne, J. O., Dommes, J., & Pincemail, J. (2007). Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruits and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8596-603. doi: 10.1021/jf071736j
- Kirca, A., & Arslan, E. (2008). Antioxidant capacity and total phenolic content of selected plants from Turkey. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 2038-2046. doi: 10.1111/j.1365-2621.2008.01818.x
- Laminkanra, O. (1995). Enzymatic browning of muscadine grape products. In C. L. Lee, & J. R. Whitaker (Eds.), *Enzymatic browning and its prevention* (pp. 166-177). ACS. USA. Washington DC.
- López-Blancas, E., Martínez-Damián, M. T., Colinas-León, M. T., Bautista-Boñuelos, C., Martínez-Solís, J., & Rodríguez-Pérez, J. E. (2014). Actividad antioxidante y enzimática de albahaca 'nufar' (*Ocimum basilicum* L.) almacenada en refrigeración. *Agronomía Mesoamericana*, 25, 255-265. doi: 10.15517/am.v25i2.15428
- Martínez-Damián, M. T., Cruz-Álvarez, O., Colinas-León, M. T. B., Rodríguez-Pérez, J. E., & Ramírez-Ramírez, S. P. (2013). Actividad enzimática y capacidad antioxidante en menta (*Mentha piperita* L.) almacenada bajo refrigeración. *Agronomía Mesoamericana*, 24, 57-69. Obtenido de http://www.mag.go.cr/rev_mesov24n01_057.pdf
- Mathiventhan, U., & Sivakanesan, R. (2013). Total phenolic content and total antioxidant activity of sixteen commonly consumed green leafy vegetables stored under different conditions. *European International Journal of Science and Technology*, 2, 123-132. Obtenido de http://www.cekinfo.org.uk/images/frontImages/Vol_2_No_8/10.pdf
- Melero, R. F., Moré, E., & Cristóbal, R. (2009). *Cultivo de plantas aromáticas, medicinales y condimentarias en Cataluña*. Centro Tecnológico Forestal de Cataluña, España.
- Nickavar, B., Alinaghi, A., & Kamalinejad, M. (2008). Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* species. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 7, 203-209. Obtenido de <http://en.journals.sid.ir/ViewPaper.aspx?ID=121839>
- Oliveira, S. L., Rufino, M. S., Moura, M. H. F., Cavalcanti, C. R. F., Alves, E. R., & Miranda, R. A. M. (2011). The influence of processing and long-term storage on the antioxidant metabolism of acerola (*Malpighia emarginata*) purée. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23, 151-160. doi: 10.1590/S1677-04202011000200007
- Oueslati, S., Karray-Bourauoui, N., Attia, H., Rabhi, M., Ksouri, R., & Lachal, M. (2010). Physiological and antioxidant responses of *Mentha pulgium* (Pennyroyal) to salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32, 289-296. doi: 10.1007/s11738-009-0406-0
- Ozgen, M., Reese, N. R., Tulio, Jr. Z. A., Scheerens, C. J., & Miller, R. A. (2006). Modified 2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 151-1157. doi: 10.1021/jf051960d
- Patthamakanokporn, O., Puwastien, P., Nitithamyong, A., & Sirichakwal, P. P. (2008). Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 241-248. doi: 10.1016/j.jfca.2007.10.002
- Pérez, T. G., Vargas, O. I. A., Díaz, P. J. C., & Téllez, M. M. A. (1999). Actividad de polifenoloxidasas y peroxidasa en frutos de mamey sapote (*Pouteria sapota*). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 1, 120-125.
- Pizzale, L., Bortolomeazzi, R., Vichi, S., Beregger, E., & Lanfranco, C. S. (2005). Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. indurcedens*) extracts related to their phenolic compound content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1645-1651. doi: 10.1002/jsfa.1240
- Polata, H., Wiliniska, A., Bryjak, J., & Polakovic, M. (2009). Thermal inactivation kinetics of vegetable peroxidases. *Journal of Food Engineering*, 91, 387-391. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2008.09.017
- Quirós-Sauceda, A. E., Palafox, H., Robles-Sánchez, R. M., & González-Aguilar, G. A. (2011). Phenolic compounds and dietary fiber interaction: antioxidant capacity and bioavailability. *BIOTecnia*, 13, 3-11. Obtenido de <http://www.biotecnia.uson.mx/revistas/articulos/18-BIO-11-DPA-08.pdf>
- Rodríguez, J. L., Valdés, O., & Alemán, A. (2006). Evaluación de la actividad antioxidante de cinco hierbas aromáticas. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 16, 30-36.
- Rodríguez-Vaquero, M. J., Tomassini-Serravalle, L. R., Manca-DeNadra, M. C., & Strasser de Saad, A. M. (2010). Antioxidant capacity and antibacterial activity

- of phenolic compounds from Argentinean herbs infusions. *Food Control*, 21, 779-785. doi: 10.1016/j.foodcont.2009.10.017
- Sala, J. M., & Lafuente, M. T. (2000). Catalasa enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruits to chilling. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 81-89.
- Statistical Analysis System (SAS Institute). (2002). SAS/STAT 9.1 user's guide. Cary, NC, USA: Autor. Obtenido de <https://support.sas.com/documentation/cdl/en/statugintroduction/61750/PDF/default/statugintroduction.pdf>
- Stauffer, C. E. (1989). *Enzyme assays for food scientists*. Van Nostrand Reinhold. USA.
- Waterman, P. G., & Mole, S. (1994). *Analysis of phenolic plant metabolites*. Oxford, UK. Blackwell Scientific Publications.
- Yanishlieva, N. V., Marinova, E., & Pokorny, J. (2006). Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal Lipids Science Technology*, 108, 776-79. doi: 10.1002/ejlt.200600127