



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

**“FERTILIZACIÓN ORGÁNICA E INORGÁNICA EN
LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DE ACEITES
ESENCIALES EN MANZANILLA, MENTA Y
TOMILLO”**

CECILIA ROCÍO JUÁREZ ROSETE

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS


MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO


2010

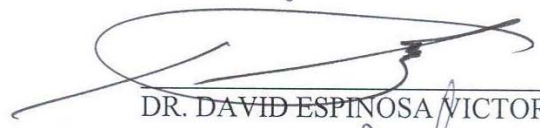
La presente tesis titulada: **Fertilización orgánica e inorgánica en la producción y calidad de aceites esenciales en manzanilla, menta y tomillo**, realizada por la alumna: **Cecilia Rocío Juárez Rosete**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

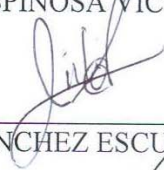
**DOCTORA EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA**

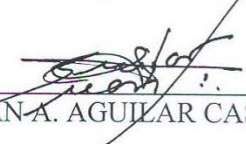
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: 
DRA. MA. DE LAS NIEVES RODRÍGUEZ MENDOZA

ASESOR: 
DRA. LIBIA I. TREJO TELLEZ

ASESOR: 
DR. DAVID ESPINOSA VICTORIA

ASESOR: 
DR. JULIO SÁNCHEZ ESCUDERO

ASESOR: 
DR. JUAN A. AGUILAR CASTILLO

Montecillo, Texcoco, México, 24 de Mayo de 2010

FERTILIZACIÓN ORGÁNICA E INORGÁNICA EN LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DE ACEITES ESENCIALES EN MANZANILLA, MENTA Y TOMILLO

Cecilia Rocío Juárez Rosete, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2010

Dentro de los factores agronómicos que tienen un efecto en el incremento de la productividad de los cultivos y que maximizan su potencial durante su desarrollo, la fertilización es uno de los más importantes. En plantas aromáticas y medicinales se ha demostrado que influye en el crecimiento, eleva el rendimiento de biomasa y juega un papel crucial en las características fitoquímicas de estas. Los objetivos generales de esta investigación fueron evaluar el efecto de la fertilización orgánica e inorgánica sobre el crecimiento y sobre las características cualitativas y cuantitativas de aceites esenciales en manzanilla (*Chamomilla recutita* L.), menta (*Mentha x piperita* L.) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.) cultivadas bajo condiciones de invernadero; y evaluar el efecto de la aplicación de sustancias húmicas y el contenido de humedad del sustrato en la acumulación de constituyentes activos de tomillo. Esta investigación se divide en dos etapas, una realizada en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México y la segunda fue realizada en la Universidad de Massachusetts, Campus Amherst, Estados Unidos de América. En la primera etapa se estableció un experimento en Montecillo, durante el ciclo primavera-verano 2007, en el cual se evaluaron tres plantas aromáticas: manzanilla, menta y tomillo bajo las siguientes condiciones de fertilización: Orgánica 1: (Nutripro Forte[®] al 1% más un riego con aspersiones foliares cada 15 días con Aminofit Xtra[®] (NPF[®] + AX[®]) y Orgánica 2: riego con Humathed 50060[®] (AH) al 1%), e Inorgánica (SS: Solución Steiner al 75%) y tres fechas de corte 60, 90 120 ddt. Los resultados más sobresalientes de este estudio indican que la fertilización inorgánica incrementa el rendimiento de biomasa en las tres especies evaluadas y la edad de la planta es un factor determinante. En lo que se refiere a los aceites esenciales el rendimiento total de aceite esencial es mayor en las plantas cultivadas bajo manejo inorgánico en las especies evaluadas. En manzanilla se obtuvo mayor contenido de α -(-)bisabolol bajo el tratamiento Orgánica 2. En tomillo los contenidos de timol y carvacrol aumentan al usar el tratamiento SS. Para menta, no se encontraron diferencias significativas por efecto de los tratamientos evaluados. En la segunda etapa, se estableció un experimento durante invierno 2009, se evaluaron tres contenidos de humedad del sustrato (20, 40 y 60 %) y 4 dosis de sustancias húmicas (HumiSolve USA[®] y TM-USA[®]) a 100, 200, 300, 400 m gL⁻¹. Los resultados indican que el contenido de humedad en el sustrato y la dosis de sustancias húmicas aplicadas afecta la cantidad de flavonoides, antioxidantes y compuestos fenólicos. Las sustancias húmicas modifican la concentración de timol, carvacrol y linalool.

Palabras clave: fertilización, rendimiento, plantas aromáticas, compuestos bioactivos.

ORGANIC AND INORGANIC FERTILIZATION IN PRODUCTION AND QUALITY OF ESSENTIAL OILS IN CHAMOMILE, PEPPERMINT AND THYME

Cecilia Rocío Juárez Rosete, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2010

Among agronomic factor that have an effect to increasing crop productivity, maximize their potential during their development, fertilization is one of the most important. In aromatic and medicinal plants has been show to influence growth, increases yield of biomass, and play a crucial role in the characteristics of these phytochemicals. The general objectives of this research were to evaluate the effect of organic and inorganic fertilization on growth, on the qualitative and quantitative characteristics of essential oils in chamomile (*Chamomilla recutita* L.), peppermint (*Mentha x piperita* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) grown under greenhouse conditions. The effect of application of humic substances, and growing media moisture was evaluate as accumulation of active constituents of thyme. This research is divided into two stages; the first was developed at Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Mexico. The second was realized at the University of Massachussets, Campus Amherst, USA. In the first stage an experiment was established in Montecillo, during the 2007 spring-summer season, which was evaluated three herbs: chamomile, peppermint and thyme under the following conditions of fertilization: Organic 1: (Nutripro Forte[®] 1% plus a foliar spray and irrigation every 15 days Aminofit Xtra[®] (NPF[®] + AX[®]) and Organic 2: a Humathed 50060[®] (AH) 1% irrigation), and inorganic (SS: Steiner Solution 75%) and three cutting dates 60, 90 120 dat. The main results of this study indicate that inorganic fertilizer increases the yield of biomass in all three species tested and the age of the plant is a factor that determines this effect. In regards to essential oils total yield of essential oil is higher in plants grown under inorganic management. On Chamomile was obtained a higher content of α (-) bisabolol under the Organic treatment 2. The thymol and carvacrol contents were increased when using the SS treatment in thyme. To peppermint, no significant difference was developed in effect among the treatments. In the second stage, an experiment was established during winter season 2009, were analyzed substrate moisture content (20, 40 and 60%) and 6 doses of humic substances (HumiSolve USA[®] and TM-USA[®]) at 100, 200, 300, 400 mgL⁻¹. The results indicate that the moisture content in the substrate join the applied doses of humic substances affect the amount of antioxidants, total phenol and flavonoides contents. Humic substances modified the concentration of thymol, carvacrol and linalool.

Key words: fertilization, yield, herbs, bioactive compounds

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento otorgado para realizar mis Estudios de Postgrado y Estancia de Investigación.

Al Colegio de Postgraduados por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Doctorado.

A la Universidad de Massachusetts (UMASS), Campus Amherst por otorgarme la oportunidad de realizar mi Estancia de Investigación en las instalaciones del Department of Plant, Soil and Insect Sciences.

A las Doctoras María de las Nieves Rodríguez Mendoza y Libia Iris Trejo-Téllez y a los Doctores David Espinosa Victoria, Julio Sánchez Escudero y Juan A. Aguilar Castillo por sus consejos, sugerencias y apoyo en la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Marcos Soto Hernández por su amistad y valioso apoyo en los análisis fitoquímicos.

Al Ph. D. Lyle E. Craker, por su amistad y apoyo para realizar mi estancia de investigación en UMASS.

A todas las personas que de manera directa o indirecta hicieron posible la realización de esta tesis.

DEDICATORIA

A la memoria de mi abuelo Benito Juárez J.

A mi esposo Juan Aguilar por el apoyo incondicional para lograr esta meta.

A mi hija Naomi todo mi amor.

A mis padres Eloina Rosete T. y Manuel Juárez M.

A toda la familia Juárez Rosete, a ellos mi respeto, admiración y agradecimiento.

A la familia Aguilar Castillo por el apoyo brindado.

A todos mis amigos y compañeros del Colegio de Postgraduados por los momentos compartidos.

A Jun Pill Baek y Abd El Raheim Donia por compartir conmigo su amistad y conocimientos en UMASS.

A todas las personas que me brindaron su amistad en Amherst, MA.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1. Planteamiento del problema.....	1
2. Objetivos.....	3
2.1. Objetivo general.....	3
2.1.1. Objetivos particulares.....	3
3. Hipótesis.....	3
3.1. Hipótesis general.....	3
3.1.1. Hipótesis particulares.....	3
4. Revisión de literatura.....	4
4.1. Uso de las plantas aromáticas.....	4
4.2. Métodos y técnicas de análisis en aceites esenciales.....	6
4.3. Constituyentes químicos activos.....	9
4.4. Factores que afectan la composición de aceites volátiles.....	10
4.4.1. Genéticos.....	10
4.4.2. Fenología y tipo de órgano.....	11
4.4.3. Condiciones ambientales.....	11
4.4.4. Métodos de extracción y almacenamiento.....	13
5. Literatura citada.....	14
CAPITULO I. PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ACEITES ESENCIALES EN MANZANILLA.....	19
Resumen.....	19
Abstract.....	20
1.1. Introducción.....	21
1.2. Materiales y métodos.....	23
1.3. Resultados y discusión.....	25
1.4. Conclusiones.....	35
1.5. Literatura citada.....	35
CAPITULO II. FUENTES DE FERTILIZACIÓN, PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ACEITES ESENCIALES EN MENTA.....	39
Resumen.....	39
Abstract.....	40
2.1. Introducción.....	40
2.1. Materiales y métodos.....	41
2.3. Resultados y discusión.....	43
2.4. Conclusiones.....	49
2.5. Literatura citada.....	50

CAPITULO III. FERTILIZACIÓN ORGANICA E INORGÁNICA EN LA PRODUCCION DE BIOMASA Y ACEITES ESENCIALES EN TOMILLO.....	53
Resumen.....	54
Abstract.....	55
3.1. Introducción.....	55
3.2. Materiales y métodos.....	56
3.3. Resultados y discusión.....	59
3.4. Conclusiones.....	66
3.5. Literatura citada.....	66
CAPITULO IV. HUMIC SUBSTANCES AND MOISTURE CONTENT ON THE BIOMASS PRODUCTION AND BIOACTIVE CONSTITUENTS OF <i>Thymus vulgaris</i>	70
Abstract.....	70
Resumen.....	71
4.1. Introduction.....	72
4.2. Materials and methods.....	73
4.3. Results and discussion.....	76
4.4. Conclusions.....	85
4.5. References.....	86
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES.....	89
1. Discusión general.....	89
2. Conclusiones generales.....	93
ANEXO 1. Cromatograma de manzanilla.....	95
ANEXO 2. Cromatograma de menta.....	96
ANEXO 3. Cromatograma de tomillo.....	97

LISTA DE CUADROS

INTODUCCIÓN GENERAL

Cuadro 1. Principales plantas aromaticas demandas en el comercio mundial por su uso en la industria alimentaria, cosmetica y farmaceutica.	5
---	---

CAPITULO I

Cuadro 1. Número de flores por planta y diametro de flores evaluadas en plantas de.....	27
Cuadro 2. Analisis de varianza para las variables morfologicas en	28
Cuadro 3. Valores medios de las variables evaluadas en plantas de manzanilla.....	29
Cuadro 4. Analisis de varianza para el rendimiento total de aceite esencial en manzanilla.....	33
Cuadro 5. Efecto de la fertilización y la etapa de corte sobre el rendimiento de aceite esencial ..	34

CAPITULO II

Cuadro 1. Análisis de varianza para las variables morfologicas medidas durante el desarrollo ...	44
Cuadro 2. Variables evaluadas en plantas de menta (<i>Mentha x piperita</i> L.)	45
Cuadro 3. Analisis de varianza para el rendimiento total de aceite esencial en menta.....	48

CAPITULO III

Cuadro 1. Análisis de varianza para las variables morfologicas.	59
Cuadro 2. Valores medios de las variables evaluadas en plantas de tomillo (<i>Thymus</i>	61
Cuadro 3. Valores medios de las variables evaluadas en plantas de tomillo (<i>Thymus</i>	62
Cuadro 4. Analisis de varianza para el rendimiento total de aceite esencial en tomillo.....	64
Cuadro 5. Efecto de la fertilizacion y los días a la cosecha sobre el rendimiento	65

CAPITULO IV.

Table 1. Analysis of variance for morphological varaibles evaluated at 60 days.....	77
Table 2. Effecto of moisture content and humic substances levels on height, fresh	78
Table 3. Analysis of variance for essential oil yield in <i>Thymus vulgaris</i> L.....	79
Table 4. Essential oil yield in <i>Thymus vulgaris</i>	80
Table 5. Analysis of variance for the components of essential oil in <i>Thymus vulgaris</i> L.	81
Table 6. Effect of wet content and humic substances levels on components of <i>Thymus</i>	82
Table 7. Analysis of variance for the effect of moisture percent and humic	83
Table 8. Effect of wet content and humic substances levels on antioxidant activity index.....	84

LISTA DE FIGURAS

INTODUCCI3N GENERAL

- Figura 1. rutas independientes en la biosintesis de terpenos (Başer y Demirci, 2007)..... 8
Figura 2. Sitios de biosintesis de terpenos en plantas superiores y sus productos 9

CAPITULO I

- Figura 1. Numero de flores por efecto de la fertilización organica e inorganica en plantas de 26
Figura 2. Extracción nutrimental en plantas de manzanilla..... 31
Figura 3. extracción nutrimental en plantas de manzanilla por efecto de la epoca de corte..... 32

CAPITULO II

- Figura 1. Extracción nutrimental mg. parte aerea de macronutrientos y micronutrientos 46
Figura 2. Extracción nutrimental mg. parte aerea de macronutrientos y
micronutrientos.....47

CAPITULO III.

- Figura 1. Extracción nutrimental en plantas de tomillo por efecto de la nutrición..... 62
Figura 2. Extracción nutrimental en plantas de tomillo por efecto de la edad de la planta. 63

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Planteamiento del problema

El uso de las plantas aromáticas y medicinales (PAMs) son parte de nuestra historia y costumbres. Actualmente las PAMs son de creciente interés para los recolectores, productores, industrias transformadoras, instituciones públicas y/o privadas y consumidores (Azizi *et al.*, 2007). Este interés se debe a las características aromáticas, terapéuticas y de conservación (Sangwan *et al.*, 2001), así como a su uso en nutracéuticos, fitoterapia, aromaterapia, etc. Por otra parte, se han teniendo nuevas aplicaciones en alimentos, la industria farmacéutica, la ganadería, en el control de plagas agrícolas y en la fitorremediación de suelos. Aunado a estas características se debe sumar la creciente demanda en la obtención de materia prima de calidad y productos de origen orgánico.

En el ámbito nacional existe la comercialización de plantas medicinales y aromáticas endémicas que por tradición funciona en mercados locales y que pueden ser de gran importancia económica en el ámbito internacional por la variabilidad de sus principios activos. En términos de superficie dedicada a la producción de plantas aromáticas no hay datos actualizados y de acuerdo a la información disponible, en el año 2005 se tuvieron 30 016.49 has dedicadas al cultivo orgánico de hierbas. Los Estados de Morelos, Baja California Sur, Estado de México, Oaxaca, Puebla y Tlaxcala son los principales productores de hierbas aromáticas de exportación, algunas de ellas bajo certificación orgánica (Pérez, 2009). En estos Estados se pueden encontrar grandes empresas productoras de hierbas finas aromáticas que son exportadas para el sector de servicios culinarios (AGRINAFTA, PLANTAMEX, ESPECIAMA, etc.) y organizaciones como la Red Mexicana de Plantas Medicinales y Aromáticas (REDMEXPLAM, 2009) que

fomentan proyectos comunitarios a pequeña escala, así como empresas que elaboran extractos fluidos y secos para el comercio nacional e internacional (REDSA, 2009).

Actualmente, entre las PAMs que forman parte del grupo de productos no tradicionales en México y que presentan alta demanda son: albahaca, árnica, jamaica, eucalipto, manzanilla, menta, orégano, romero, sábila y valeriana. Éstas tienen una participación del 6.1 % en el valor total de la producción que está destinada tanto al mercado nacional como al internacional, siendo los principales destinos los países de la Unión Europea, Estados Unidos de América, Canadá y Japón (Zamorano y Ríos, 2004), que concentran cerca del 60 % de la producción mundial, debido a la tendencia hacia productos de conveniencia, saludables, seguros y exóticos (Bancomext *et al.*, 2006a). Estas preferencias en la población los convierten en productos con un nicho de mercado rentable y en expansión. Sin embargo, cada mercado establece sus propias regulaciones y estándares, tanto para el producto como para el envase y etiquetado, en caso de requerirse, situación que exige el seguimiento de buenas prácticas tanto en el cultivo y la recolección, como en la transformación y manufactura, y la más importante, es la exigencia con relación a la transparencia del origen de las materias primas hasta el producto final (Bancomext *et al.*, 2006b), lo que crea la necesidad de implementar prácticas de producción que garanticen calidad y seguridad para el consumidor.

En México, los trabajos de investigación con fertilización orgánica e inorgánica en la producción de hierbas aromáticas y su efecto en el contenido de aceites esenciales son escasos. En tanto, que los países que más reportan trabajos sobre producción convencional, hidropónica y orgánica y caracterización de componentes son los países Europeos, del Medio Oriente, Estados Unidos de Norte América, Argentina, y Brasil. Por lo anterior, se plantea la presente investigación bajo el supuesto de que la fuente de fertilización orgánica incrementa el

rendimiento de biomasa, mejorando la cantidad y composición de los compuestos aromáticos en manzanilla, menta y tomillo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la fertilización orgánica e inorgánica sobre el crecimiento y las características cualitativas y cuantitativas de aceites esenciales en manzanilla, menta y tomillo.

2.1.1. Objetivos particulares

1. Evaluar el rendimiento (producción de biomasa) de manzanilla, menta y tomillo en función de la fertilización.
2. Identificar las diferencias cuantitativas y cualitativas de los aceites esenciales de manzanilla, menta y tomillo fertilizadas orgánica e inorgánicamente.

3. Hipótesis

3.1. Hipótesis general

Las diferencias en crecimiento, y en características cualitativas y cuantitativas de los aceites esenciales en manzanilla, menta y tomillo varían en relación con la fertilización orgánica e inorgánica.

3.1.1. Hipótesis particulares

1. El rendimiento en peso fresco de las plantas aromáticas aumenta con la fertilización orgánica.
2. La fertilización orgánica incrementa el contenido de aceites esenciales como α -(-)bisabolol en manzanilla, mentol en menta y timol y carvacrol en tomillo.

4. Revisión de literatura

4.1. Uso de plantas aromáticas

El empleo de las PAMs con cualidades especiales, como remedio para combatir todo tipo de enfermedades se remonta a tiempos prehistóricos; sin duda comenzó con la continua experimentación de vegetales diversos, que de acuerdo con sus características únicas ofrecían agradables aromas y sabores en los alimentos, alivio del dolor y cura de enfermedades (Craker, 2007). Es hasta el siglo XIX que las plantas y algunos productos de origen animal y mineral fueron los únicos medicamentos empleados por el hombre, siendo hoy en día la única fuente terapéutica utilizada en numerosas zonas del mundo (Masarovičová y Král'ová 2007).

En México se han identificado más de 5000 especies que tienen aplicaciones curativas. No obstante que muchos de los usos estén restringidos en regiones marginadas forman parte de la tradición y cultura popular (Rodríguez y Gómez, 1996). Debido a su actividad terapéutica han sido utilizadas en la medicina tradicional, y actualmente los principios activos son utilizados como fuente de medicamentos, colorantes, conservadores, cosméticos y nutraceuticos, entre otros (Bourgand *et al.*, 2001).

Cabe destacar que los principales sectores industriales que utilizan plantas aromáticas y medicinales son: el medicinal y herbolario, alimentario y perfumero-cosmético (Heywood, 1999). En el sector medicinal y herbolario se encuentran las industrias de farmacia y fitoterapia, que utilizan las plantas secas y sus extractos o los principios activos aislados para la fabricación de medicamentos. Siendo, Alemania y Francia los principales consumidores de materia prima para la elaboración de fitofármacos (Bancomext *et al.*, 2006b).

Sin embargo, la herbolaria constituye un amplio campo de conocimientos y prácticas en las que el conjunto heterogéneo de personas recurre a las hierbas para tratar padecimientos de muy

diversa índole (Cases, 2007). En tanto que en la industria agroalimentaria se están usando con más frecuencia condimentos de origen natural como saborizantes, colorantes y conservadores debido a su actividad antioxidante (Tomaino *et al.*, 2004), antibacterial (Burt, 2004) y antifúngica (Ertük, 2006), las cuales son atribuidas a los constituyentes volátiles como fenoles, ácidos fenólicos, entre otros.

En el Cuadro 1, se presentan algunas de las especies aromáticas en el comercio mundial que por la composición de sus aceites esenciales son más cotizadas.

Cuadro 1. Principales plantas aromáticas demandas en el mercado mundial, por su uso en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica.

Nombre común	Nombre científico	Principales componentes del aceite esencial
Albahaca	<i>Ocimum basilicum</i>	Cavicol, linalool
Geranio	<i>Pelargonium graveolens</i>	Geraniol, L-citronelol
Lavanda	<i>Lavandula officinalis</i>	Geraniol, linalool y sus esteres
Manzanilla	<i>Matricaria chamomilla</i>	Azuleno, chamazuleno, α -(-)bisabolol,
Mejorana	<i>Origanum majorana</i>	Terpenon-4-ol, pineno
Menta	<i>Mentha x piperita L.</i>	Mentona, mentol, isomentona, carvona
Salvia	<i>Salvia officinalis</i>	Camfor, tujona
Tarragón	<i>Artemisia dracuncullos</i>	Metil cavicol
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	Timol, carvacrol
Vetiver	<i>Veiteveria zinzoides</i>	Vetiverol
Zacate limón	<i>Cymbopogon flexuosus</i>	Citral, geraniol, citronelol, limoneno

Fuente: Sangwan *et al.*, (2001).

Además de las aplicaciones antes señaladas, las plantas aromáticas tienen otras propiedades, por ejemplo, los aceites esenciales de *Origanum majorana*, *Salvia officinalis*, *Lavandula officinalis*, *Mentha spp.* y *Rosmarinus officinalis* han sido usados como insecticidas eficientes

para controlar plagas agrícolas como *Thrips tabaci* (Koschier y Sedi, 2003). En tanto que *Tanacetum vulgare*, *Artemisia absinthium* y *Ocimum basilicum* son la materia prima de los repelentes de insectos de origen vegetal que utilizan aceites esenciales (Başer, 1999). O bien, otras PAMs han sido utilizadas para remover sustancias peligrosas en ambientes contaminados, tecnología conocida como fitorremediación (Masarovičová y Král'ová 2007).

4.2. Métodos y técnicas de análisis en aceites esenciales

Para conocer la cantidad y calidad de los aceites esenciales se han desarrollado métodos de extracción como técnicas cromatográficas. Los métodos de extracción más comunes son la destilación por arrastre de vapor, la hidrodestilación y extracción con destilación simultánea (Bayramoglu *et al.*, 2008; Lemberkovicks *et al.*, 2003). En lo que se refiere a técnicas de análisis cromatográfico se tiene a la cromatografía de capa fina (CCF), que es una técnica muy sensible y económica y es utilizada en la caracterización preliminar de los aceites esenciales (Pyka *et al.*, 2005). Otras técnicas especiales para el análisis de aceites esenciales son la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y olfatometría (CG-EM-O). Existen otras técnicas menos habituales como la cromatografía de gases multidimensional (MDGC) y la del acoplamiento directo de cromatografía de líquidos y cromatografía de gases (LC-GC) que permiten el fraccionamiento selectivo de distintos grupos de compuestos sin recurrir a la preparación de muestras (Herraiz, 2007). Estas técnicas permiten tener un perfil detallado de los componentes de los aceites esenciales; así como la cantidad de cada uno de sus componentes volátiles (Goodner *et al.*, 2006).

4.3. Constituyentes químicos activos

Las propiedades medicinales y aromáticas asociadas con las PAMs resultan de constituyentes químicos que se encuentran en el tejido vegetal y son conocidos por jugar un papel importante en la adaptación de las plantas a su ambiente (Bourgaud *et al.*, 2001), debido a que actúan como sustancias de protección para la planta, al evitar el ataque de algunos insectos y otros animales. Estos constituyentes químicos derivan del metabolismo secundario y son clasificados de acuerdo con su ruta biosintética. Las dos rutas principales son la del ácido shikímico y la del ácido mevalónico. Los alcaloides, antraquinonas, glicósidos cardiacos, cumarinas, flavonoides, iridoides, esteroides, fenilpropanoides y terpenos son los constituyentes asociados con las plantas medicinales y aromáticas (Dewick, 2002). Estos componentes están formados principalmente por carbono, hidrógeno y oxígeno y algunos contienen nitrógeno y azufre.

La estructura molecular, grupos funcionales y estereoquímica son los factores que determinan las propiedades químicas de una molécula y su bioactividad. Los aceites esenciales pertenecen al grupo de los terpenos y están implicados en las relaciones ecológicas de las plantas que los producen, ya que debido a sus propiedades organolépticas atraen insectos y a otros animales que favorecen la polinización (Gershenzon y Croteau, 1991; Bakkali *et al.*, 2008). Los aceites esenciales son mezclas volátiles de diferentes sustancias orgánicas liposolubles (Sangwan *et al.*, 2001), formadas por unidades de 5 C llamadas isoprenos y se dividen en dos clases: monoterpenos (C_{10}) y sesquiterpenos (C_{15}) e incluyen a otros grupos funcionales como alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres. Muchos de estos compuestos se acumulan en estructuras vegetales específicas tales como ductos, cavidades secretoras y tricomas glandulares (Gershenzon y Croteau, 1991), las cuales pueden estar distribuidas en hojas, tallos y raíces (Sangwan *et al.*, 2001). Estas características permiten su fácil extracción por procesos simples

de destilación (Carrubba y Catalano, 2009). De acuerdo con Başer y Demirci (2007) existen dos rutas metabólicas independientes para la síntesis de terpenos: la del mevalonato y la del fosfato deoxixilulosa. En la Figura 1 se muestra como el isoprenildifosfato (IPP) y el dimetilalildifosfato (DMAPP) precursores de la biosíntesis de terpenos, pueden provenir de dos rutas independientes. La que corresponde a las plantas superiores y algunas algas es la ruta del mevalonato que a partir del AcetilCoA y a través de la vía del ácido mevalónico (MVA) son sintetizados. La segunda ruta corresponde a la ruta fosfato deoxixilulosa y es propia de bacterias y organismos fototróficos (Başer y Demirci, 2007).

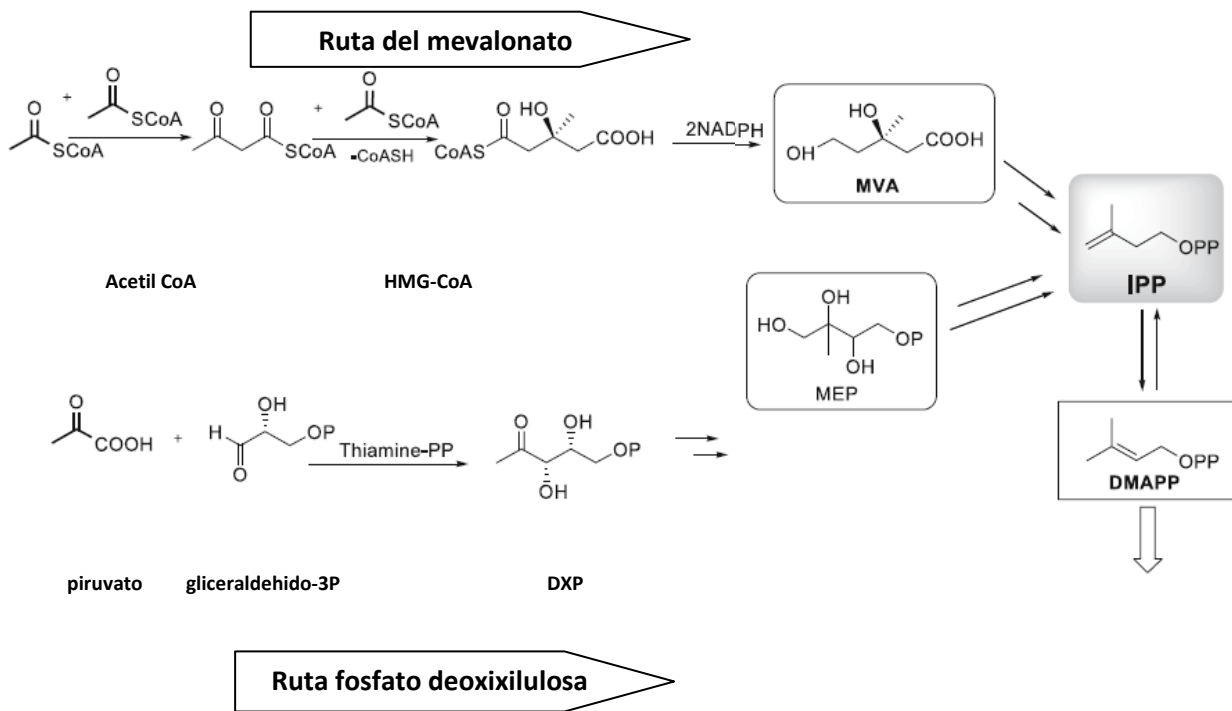


Figura 1. Rutas independientes en la biosíntesis de terpenos (Başer y Demirci, 2007).

En la Figura 2 se destaca como el citoplasma y la mitocondria son las estructuras de secreción de terpenos en las plantas superiores. La biosíntesis inicia a partir de Acetil Co A y entra a la vía del mevalonato formando IPP y DMAPP en donde se forman las unidades de isopreno (C₅) que son los precursores del geranilpirofosfato (GPP), dando origen a los monoterpenos (C₁₀), los cuales por procesos de condensación puede llegar a convertirse en farnesilpirofosfato (FPP) para formar sesquiterpenos (C₁₅). De esta forma se puede continuar con la ruta de biosíntesis para formar otros terpenos de más de 20 C que dan origen a resinas, esteroides, saponinas y carotenos (Mann, 1987).

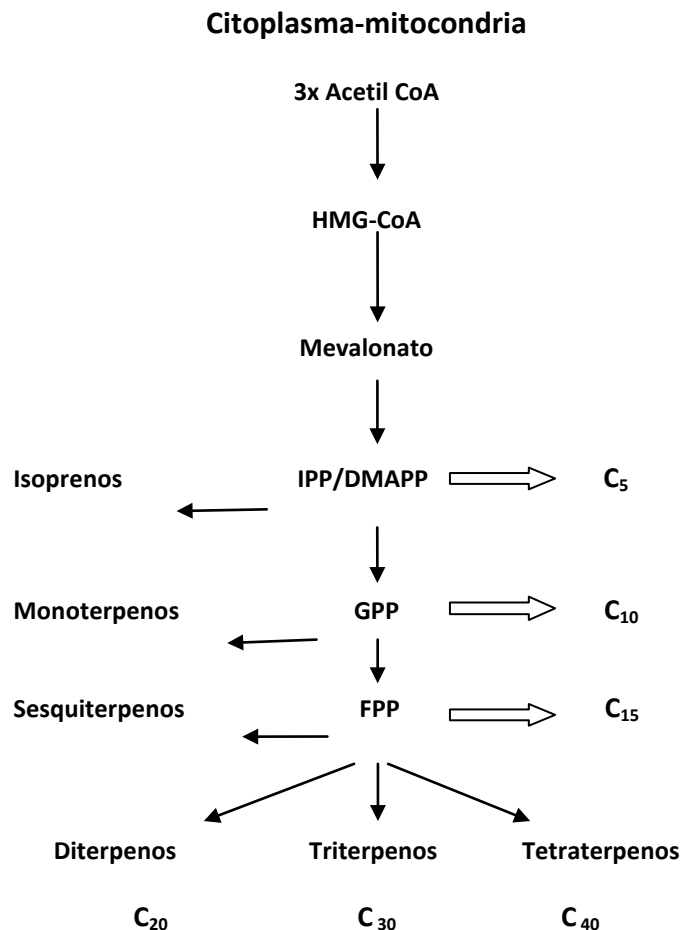


Figura 2. Sitos de biosíntesis de terpenos en plantas superiores y sus productos (Başer y Demirci 2007).

4.4. Factores que afectan la composición de aceites volátiles

La producción y composición de los aceites esenciales no dependen exclusivamente de los mecanismos biosintéticos. La variabilidad química puede ser atribuida a factores genéticos y ambientales, así como su interacción y también a los métodos de extracción y almacenamiento.

4.4.1. Genéticos

La variación genética de las especies regula la composición de los aceites esenciales (Sangwan *et al.*, 2001; Tétényi, 2002) y otros metabolitos de importancia fitoquímica como son compuestos fenólicos y flavonoides. Por otra parte, Keskitalo *et al.*, (2001) señalaron que la variación genética es un factor ligado al origen geográfico, y en un estudio realizado en *Tanacetum vulgare* L. encontraron gran variabilidad en la composición de los componentes volátiles y los no volátiles, indicando que la composición de terpenos resulta de la activación de enzimas específicas relacionadas con los patrones de variación. Por lo tanto, recomiendan que la asociación entre los principales componentes químicos y morfológicos deben ser considerados en la selección de poblaciones que pueden ser usadas para mejoramiento y estudios bioquímicos, donde son de gran utilidad los marcadores genéticos, moleculares y bioquímicos para identificar y clasificar cultivares (Solouki *et al.*, 2008). Por otra parte, Šalamon (2007) indica que la variación en la composición es alta entre especies silvestres y cultivadas.

4.4.2. Fenología y tipo de órgano

El estado de desarrollo y tipo de órgano vegetativo como: flores, hojas, tallos, corteza, madera, frutos completos, pericarpio, semillas o raíces puede ser determinante en la composición y acumulación de compuestos volátiles (Kaloustian *et al.* 2005; Figueiredo *et al.*, 2008). Las cuales a su vez dependen del tipo de estructuras de secreción que sintetizan, almacenan y liberan al ambiente los componentes volátiles. Estas estructuras se encuentran distribuidas en toda la planta

y son muy variadas (Sangwan *et al.*, 2001). Se dividen en estructuras externas, como tricomas y osmóforos que se localizan en plantas de las familias *Asteraceae*, *Cannabaceae*, *Geraniaceae*, *Lamiaceae*, *Rutaceae*, *Solanaceae*, *Verbenaceae*, *Orchidaceae*; y estructuras internas como idioblastos, cavidades, ductos y canales, las cuales pueden ser encontradas en plantas de las familias: *Araceae*, *Lauraceae*, *Magnoliaceae*, *Piperaceae*, *Leguminosae*, *Mirtaceae*, *Rutaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Pinaceae*, entre otras (Figueiredo *et al.*, 2008). De ahí que un estudio realizado en *Artemisia annua* se observaron cambios en la composición de aceite esencial cuando se analizó el producto proveniente de hojas, pétalos y tallos, obteniendo 86, 77 y 63 componentes, respectivamente (Goel *et al.*, 2007). Esta tendencia de variación ha sido observada en otras especies aromáticas como *Ocimum basilicum* (Chalchat y Özcan, 2008).

Por otro lado, se ha comprobado que los periodos de floración dependen de la estación en algunas especies aromáticas ya que afectan de manera significativa la composición de los aceites esenciales, siendo la fecha de cosecha determinante para obtener mayores rendimientos y alta calidad (Kaloustian *et al.*, 2005). Estas variaciones estacionales, afectan el fotoperiodo y en consecuencia la biosíntesis de monoterpenos, haciendo de la fecha de siembra y plantación un factor importante (Ramesh y Singh, 2008), ya que pueden causar variaciones en la duración de la fase de desarrollo, en la producción de biomasa, en el rendimiento y composición del aceite esencial (Jordán *et al.*, 2006).

4.4.3. Condiciones ambientales

Las variables climáticas como temperatura, luminosidad, frecuencia de lluvias y evaporación en los diferentes estados de desarrollo tienen un efecto significativo en la producción de biomasa y en consecuencia en la cantidad de aceites esenciales (Ramesh y Singh, 2008). En lo que se refiere a los regímenes térmicos, a temperaturas elevadas (> 45 °C) la planta sufre desequilibrios

en el metabolismo primario ocasionando pérdida de fotoasimilados, inhibición del crecimiento y pérdida de reservas (Azcón y Talón, 2000) que en consecuencia disminuyen a los precursores del metabolismo secundario y la producción de aceites esenciales. También se ha observado que durante los meses de baja temperatura hay una disminución en la producción de componentes volátiles (Figuerido *et al.*, 2008). Por tanto, existe una relación estrecha entre la fotosíntesis (Sangwan *et al.*, 2001) y la fotorrespiración (Misra *et al.*, 2006), en la síntesis de aceites esenciales, por lo que se espera que las variaciones en la duración del día y la intensidad luminosa afecten su producción. En términos generales, las plantas que crecen bajo buena iluminación muestran un aumento en el rendimiento de aceites esenciales que las cultivadas bajo sombra. Esta función ha sido demostrada por Wang y Lincoln (2004), quienes al evaluar el efecto directo de la intensidad luminosa artificial en la producción de monoterpenos en pino, obtuvieron mayor crecimiento y densidad de tricomas glandulares que en plantas tratadas con baja intensidad luminosa, las cuales presentaron una reducción en la fotosíntesis y la reserva de carbono, así como la formación de tricomas glandulares. Los efectos conjuntos de las condiciones climáticas y edáficas han sido observados por Maffei *et al.* (1994) quienes al comparar la composición de aceites esenciales de *Achillea* colectadas en distintas regiones de Asia y la Unión Europea determinaron que existe una clara diferenciación en la composición química debida al origen geográfico, por modificación fenotípica. Por otro lado las condiciones edáficas y de fertilidad pueden limitar el crecimiento y acumulación de biomasa y en consecuencia afectar el potencial de rendimiento económico. Al respecto, Amzallag *et al.* (2005) en un experimento desarrollado en Israel observaron que las variaciones en la composición del aceite esencial de *Origanum dayi* P. fueron influidas por el contenido de micronutrientes, el contenido de sodio y la textura del suelo. Estas variaciones han sido reportadas en otras especies

(Omer, 2000; Boira y Blanquer, 1998). La fertilización como factor agronómico juega un papel importante ya que mejora la nutrición de los cultivos e incrementa la producción de biomasa. En regiones con condiciones de sequía, la frecuencia de lluvia y el riego se constituyen como factores limitantes del rendimiento y composición de aceites esenciales (Khazaie *et al.*, 2008), debido a que se inducen cambios fisiológicos y metabólicos en las plantas cultivadas (Sangwan *et al.*, 2001). No obstante para plantas como *Lippia graveolens* B. la cantidad de humedad que recibe durante su ciclo de cultivo no afecta la composición de aceites esenciales (Turgut y Silva, 2005).

4.4.4. Métodos de extracción y almacenamiento

El método de extracción de aceites esenciales influye en su composición, debido a que muchas veces la temperatura y el agua de extracción no son monitoreadas y pueden causar modificación por hidrólisis o isomerización de ésteres (Arabhosseini *et al.*, 2007; Bayramoglu *et al.*, 2008) y otro tipo de reacciones. Durante el proceso de separación se pueden perder fracciones que deterioran la calidad del aceite. En experimentos en los que se ha comparado la eficiencia de extracción entre destilación por arrastre de vapor y extracción supercrítica con CO₂ se ha encontrado que en estas los aceites son más ricos en monoterpenos y sesquiterpenos que los obtenidos bajo destilación simple (Lemberkovics *et al.*, 2003). La vida de anaquel del producto es muy variable, ya que depende del origen del aceite esencial y de los niveles de producción y demanda.

Debido al auge que tienen los productos de origen natural y al desarrollo de las industrias que demandan PAMs como materia prima las convierte en cultivos no tradicionales en expansión y se tiene la necesidad de crear esquemas de producción que garanticen que el producto sea

homogéneo y libre de contaminantes. Al mismo tiempo se debe evitar la explotación de especies que estén en peligro de extinción por la sobrecosección. El manejo de la fertilización mineral u orgánica y su uso bajo condiciones de invernadero, es uno de tantos factores que pueden ser utilizados con la finalidad de incrementar el rendimiento y la calidad de los aceites esenciales. Por lo tanto, en la presente investigación se discute el efecto de la fertilización orgánica e inorgánica en manzanilla, menta y tomillo, los resultados se presentan en cuatro capítulos. Los primeros tres corresponden al trabajo desarrollado en el Colegio de Postgraduados en México y el cuarto corresponde a la investigación realizada como parte del programa de estancia en la Universidad de Massachusetts, en los Estados Unidos de América.

5. Literatura citada

AGRINAFTA. 2009. El arte de las finas hierbas. Disponible en línea en <http://www.agrinafta.com> (revisado 24 de noviembre de 2009).

Amzallag G. N., O. Larkov, M. Ben Hur and N. Dudai. 2005. Soil microvariations as a source of variability in the wild: The case of secondary metabolism in *Origanum dayi* Post. *Journal of chemical Ecology* 31(6):1235-1255.

Arabhosseini A., W. Huisman, A. van Boxtel and J. Müller. 2007. Long term effects of drying conditions on the essential oil and color of tarragon leaves during storage. *Journal of Food Engineering*. 79:561-566.

Azcón-Bieto J. y M. Talón. 2000. *Fundamentos de fisiología vegetal*. Editorial McGraw Hill Interamericana. Madrid, España. 522 p.

Azizi M., R. Bos, H. J. Woerdenbag and O. Kayser. 2007. A comparative study of four chamomile cultivars cultivated in Iran. *Acta Horticulturae* 749:93-96.

Bakkali F., S. averbeck, D. Averbeck and M. Idaomar. 2008. Biological effects of essential oils: A review. *Food and Chemical Toxicology* 46 (2):446-475.

Bancomext, CEMUE/PAIPYME. 2006a. *Productos vegetales naturales de uso en cosméticos e higiene personal (nutracéuticos)*. Disponible en línea en www.cemue.com.mx (Revisado el 24 de noviembre de 2009).

Bancomext, CEMUE/PAIPYME 2006b. *Mercado Europeo para fitofármacos*. Disponible en línea en www.cemue.com.mx (Revisado el 26 de noviembre de 2009).

- Bayramoglu B., S. Sahin y G. Sumnu. 2008. Solvent-free microwave extraction of essential oil from oregano. *Journal of Food Engineering* 88:535-540.
- Başer H. K. C. 1999. Industrial utilization of aromatic and medicinal plants. *Acta Horticulturae* 503:177-192.
- Başer H. K. C. y F. Demirci. 2007. Chemistry of essential oils. *In: Flavours and fragrances*. Bergeer R. G. (Ed.) Springer. Berlin 648 pp.
- Boira H. y A. Balnquer. 1998. Environmental factors affecting chemical variability of essential oils in *Thymus piperella* L. *Biochemical Systematics and Ecology* 26:811-822.
- Bourgau F., A. Gravot, S. Milesi, e. Gontier 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161:839-851.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. A review. *International Journal of Food Microbiology* 94:223-253.
- Cases C. M. A. 2007. Las plantas aromáticas y medicinales. Descripción de las especies fundamentales. Principios activos. *In: Jornadas Técnicas dedicadas a las plantas aromáticas y medicinales*. Brihuega, España. 99 pp
- Carrubba A. C. Catalano. 2009. Essential oil crops for sustainable agriculture. A review. *In: Climate change intercropping pest control and beneficial microorganisms*. E. Lichfouse (Ed.) Springer Netherlands. Vol 2. 483 pp.
- Chalchat J. C. y M. M. Özcan. 2008. Comparative essential oil composition of flowers, leaves and stems of basil (*Ocimum basilicum* L.) used as herb. *Food Chemistry* 110(2):501-503.
- Craker L. E. 2007. Medicinal and aromatic plants: future opportunities. *In: Issues in new crops and new uses*. J. Janick y A. Whipkey (eds.). ASHS Press. Alexandria VA.
- Dewick P. M. 2002. *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*. Second edition. Wiley & Sons. Great Britain. 507 pp.
- Ertük Ö. 2006. Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. *Biologia Bratislava* 61(3):275-278.
- Figueiredo A. C., J. G. Barroso, L. G. Pedro and J. J. C. Scheffer. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*. 23: 213-226.
- Gershenzon J. and R. Croteau. 1991. Terpenoids. *In: Herbivores: their interactions with secondary metabolites*. G. A. Rosenthal y M. R. Berenbaun (Eds.) Academic Press Inc. United States of America. 457 pp.
- Goel D., V. Singh, M. Ali, G. R. Mallavarupu y S. Kumar. 2007. Essential oils of petal, leaf and stem of the antimalarial plant *Artemisia annua*. *Journal of Natural Medicines* 61:187-191.

- Goodner K. L., K. Mahattanatawee, A. Ploto, J. A. Sotomayor and M. J. Jordán. 2006. Aromatic profiles of *Thymus hyemalis* and Spanish *T. vulgaris* essential oils by GC-MS/GC-O. *Industrial Crops and Products* 24:264-268.
- Heywood V. 1999. Medicinal and aromatic plants as global resources. *Acta Horticulturae* 500:21-29.
- Herraiz C. M. 2007. Nuevas perspectivas en la investigación y desarrollo de las plantas aromáticas y medicinales. *In: Jornadas Técnicas dedicadas a las plantas aromáticas y medicinales*. Brihuega, España. 99 pp.
- Jordán M. J., R. M. Martínez, K. L. Goodner, E. A. Balwin and J. A. Sotomayor. 2006. Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oil composition. *Industrial Crops and Products*. 24:253-263.
- Kaloustian, J., Abou L. , Mikail C., Amiot M. J and Portugal H.. 2005. Southern French thyme oils: chromatographic study of chemotype. *J. Sci. Food Agr.* 85(14): 2437-2444.
- Keskitalo M. E. Pehu and J. E. Simon. 2001. Variation in volatile compounds from tansy (*Tanacetum vulgare* L). related to genetic and morphological differences of genotypes. *Biochemical systematic and Ecology* 29:267-285.
- Khazaie H. R., F. Nadjafi, and M. Bannayan. 2008. Effect of irrigation frequency and planting density on herbage biomass and oil production of thyme (*Thymus vulgaris*) and hyssop (*Hyssopus officinalis*). *Industrial Crops and Products* 27(3):315-321.
- Koschier E. H. y K. A. Sedy. 2003. Labiate essential oils affecting host selection and acceptance of *Thrips tabaci* lindeman. *Crop Protection* 22:929-934.
- Lemberkovics E., A. Kéry, A. Kakasy y B. Simándi. 2003. Effect of extraction methods on the composition of essential oils. *Acta Horticulturae*. 597:49-55.
- Maffei M., M. Mucciarelli and S. Scannerini. 1994. Essential oils from *Achillea* species of different geographic origin. *Biochemical systematic and Ecology*. 22(7):679-687.
- Mann J. 1987. Secondary metabolism. Second edition. Oxford Science Publications. Great Britain. 374 pp.
- Masarovičová E. and K. Král'ová. 2007. Medicinal plants: Past, Nowadays, Future. *Acta Horticulturae* 749:19-27.
- Misra A., S. Dwivedi, A. K. Srivastava, D. K. Tewari, A. Khan and R. Kumar. 2006. Low iron stress nutrition for evaluation of Fe-efficient genotype physiology, photosynthesis, and essential monoterpene oil(s) yield of *Ocimum sanctum*. *Photosynthetica* 44 (3):474-477.
- Omer E. A. 2000. Response of wild Egyptian oregano to nitrogen fertilization in sandy soil. *Journal of Plant Nutrition* 22:103-114.
- Pérez C. R. 2009. Frutas y hortalizas orgánicas de la red de mercados y tianguis orgánicos de México. *Estudio del Sial*. *Claridades Agropecuarias* 194:35-45.

Pika A., D. Gurak, K. Bober, W. Klimczok and G. Janikowska. 2005. Influence of the mobile and stationary phases on the separation of selected essential oil components and aroma substances investigated by TLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 28:2525-2537.

Ramesh K. and V. Singh. 2008. Effect of planting date on growth, development, aerial biomass partitioning and essential oil productivity of wild marigold (*Tegetes minuta*) in mid hills of Indian western Himalaya. *Industrial Crops and Products* 27:380-384.

REDMEXPLAM 2009. Red Mexicana de Plantas Aromáticas y Medicinales.

REDSA. 2009. Rosa Elena Dueñas: Extractos y Fluidos. Disponible en línea en <http://www.redsa.com.mx>. (Revisado el 28 de noviembre de 2009)

Rodríguez C. J. M. y A. Gómez C. 1996. Plantas mexicanas al mundo. *In: Plantas que curan. Guía México Desconocido*. 29: 19-51.

Šalamon I. 2007. Effect of the internal and external factors on yield and qualitative-quantitative characteristics of chamomile essential oils. *Acta Horticulturae* 749: 45-64.

Sangwan N. S., A. H. A. Farooqi, F. Shabih and R. S. Sangwan. 2001. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*. 34:3-21.

Solouki M., H. Mehdikhani, H. Zeinali and A. A. Emamjomeh. 2008. Study of genetic diversity in chamomile (*Matricaria chamomilla*) based on morphological traits and molecular markers. *Scientia Horticulturae* 117:281-287.

Tétényi P. 2002. Chemical variation (Chemodifferentiation) in medicinal and aromatic plants. *Acta Horticulturae* 576:15-23.

Tomaino A., F. Cimino, V. Zimbalatti, V. Venuti, V. Sulfaro, A. De Pascale and A. Saija. 2004. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chemistry* 89:549-554.

Turgut D. N. and R. Silva V. 2005. Effect of water stress on thymol and carvacrol concentrations in Mexican oregano grown under controlled conditions. *Journal of Applied Horticulture* 7(1):20-22.

Wang M. and D. E. Lincoln. 2004. Effects of light intensity and artificial wounding on monoterpenes production in *Myrica cerifera* from two different ecological habitats. *Canadian Journal of Botany*. 82:1501-1508.

Zamorano U. J. y H. Ríos S (2004) Importancia y perspectiva de los productos no tradicionales. *Claridades Agropecuarias* 132: 3-19.

CAPITULO I. FUENTES DE FERTILIZACION EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ACEITES ESENCIALES DE MANZANILLA

FERTILIZING SOURCES ON THE BIOMASS AND ESSENTIAL OILS PRODUCTION OF CHAMOMILE

Resumen

En este estudio se analizó la influencia de la fertilización orgánica e inorgánica en manzanilla sobre variables morfológicas, nutrimentales y fitoquímicas. El experimento se estableció en el ciclo primavera-verano 2007 en un invernadero del Colegio de Postgraduados, ubicado en Montecillo, México. Se utilizó una variedad comercial de manzanilla y se evaluaron dos factores: la fuente de fertilización (FF) y los días a la cosecha (DC). Se comparó el suministro de ácidos húmicos (FF-I), de un fertilizante de origen orgánico con aminoácidos biosintéticos (FF-II) y la solución Steiner al 75% de concentración (FF-III), como fuentes de fertilización orgánicas e inorgánica respectivamente. Las cosechas se hicieron a los 87, 97 y 108 DDT (días después del trasplante). El manejo de los tratamientos fue bajo un diseño en bloques completos al azar con cinco repeticiones y arreglo factorial 3^2 . Se determinó el número, peso y diámetro de flores por tratamiento a partir de los 30 DDT para conocer el patrón de producción. La altura, el peso en fresco y en seco de la parte aérea y raíz; la extracción nutrimental y el rendimiento total de aceites esenciales y sus componentes fueron determinados en cada cosecha. Los aceites esenciales se obtuvieron por destilación simple, sus componentes fueron caracterizados en cromatografía de capa fina (CCF). El componente principal fue cuantificado en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Los resultados mostraron que la fuente de

[Enviado a la Revista Fitotecnia Mexicana](#)

fertilización inorgánica favorece el rendimiento y diámetro de flores, la altura de planta, el rendimiento de biomasa, así como la extracción de nutrimentos. El rendimiento total de aceites esenciales depende del rendimiento de flores frescas por tratamiento. En tanto que la cantidad de α - (-) bisabolol se incrementó por la aplicación de ácidos húmicos.

Palabras clave: *Matricaria recutita* (L.), *fertilización, rendimiento, flores, aceite esencial*

Abstract

In this study was analyzed the influence of organic and inorganic fertilization of chamomile on morphological, nutrimental and photochemical variables. The experiment was conducted in Spring-summer season 2007, in a greenhouse from Colegio de Postgraduados, Montecillo, Mexico. A commercial variety of chamomile was used and two factors were evaluated the source of fertilization (SF) and days to harvest (DH). The supply of humic acids (SF-I), an organic fertilizer with biosynthetic aminoacids (SF-II) and the Steiner solution at a concentration at 75 % (SF-III) were compared as sources of organic and inorganic fertilization respectively. Harvests were made at 87, 97 and 108 DAT (days after transplant). Management of treatments was under a randomized complete block design with five replicates and a factorial arrangement 3^2 . The number, weight and diameter of flowers per treatment were recorded after 30 DAT to know the production pattern. Height, fresh and dry weight of aerial parts and roots, nutrimental extraction and the total yield of essential oils with their components were recorded in each harvest. Essential oils were obtained by simple distillation; the components were characterized on thin layer chromatography (TLC). The main component was quantified in gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The results showed that the source of inorganic fertilizer positively influenced the yield and flower diameter, plant height, biomass production,

and the nutrients extraction. Total yield of essential oils depends on the yield of fresh flowers from treatment. While the amount of α -(-) bisabolol was increased with humic acid application.

Keywords: *Matricaria recutita* (L.), fertilization, yield, flowers, essential oil.

1.1 Introducción

La demanda de plantas aromáticas y medicinales ha aumentado durante los últimos años, debido a las propiedades de sus principios activos (Meneses-Reyes *et al.*, 2008), y porque proporcionan beneficios medioambientales (Zheljazkov *et al.*, 2008), socioculturales (Hamilton 2004; Rodríguez-Fragoso *et al.*, 2008) y económicos (Sangwan *et al.*, 2001). De acuerdo a lo reportado por Masarovičová y Král'ová (2007), éstas constituyen un amplio campo de aplicación en la industria alimentaria (40 %), farmacéutica (30 %) y perfumero-cosmética (30 %). La manzanilla es una de las plantas aromático-medicinales más importantes en el comercio mundial debido a sus múltiples aplicaciones en fármacos y en la industria cosmética (Franke y Schielcher, 2007). Forma parte de las más antiguas plantas medicinales usadas en medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades, por sus propiedades en tratamientos antiinflamatorios, antiespasmódicos, antisépticos, antibacteriales y antifúngicos (World Health Organization, 1999; D'Andrea, 2002).

En México esta planta se encuentra en la categoría de hierba aromática de exportación bajo producción orgánica (Bojorquez, 2006), es una planta herbácea de la familia *Asteraceae* (Šalamon, 2007), que en condiciones silvestres alcanza una altura de entre 10 y 15 cm (World Health Organization, 1999) y cultivada alcanza hasta 60 cm de altura (Muñoz, 2000). La parte útil son las cabezas florales frescas o secas (Franke y Schilcher, 2007) las cuales contienen diferentes clases de constituyentes activos que incluyen aceites esenciales (Sangwan *et al.*,

2001), flavonoides (Meneses-Reyes *et al.*, 2008), además, las hojas contienen cumarinas (Kováčik *et al.*, 2006). Las plantas contienen 0.24-1.9% de aceites esenciales, de los cuales el α (-)-bisabolol y camazuleno (Solouki *et al.*, 2008) son los más abundantes y se sintetizan en las flores.

Dentro de los factores agronómicos que afectan las características cuantitativas y cualitativas de las plantas aromáticas, la fertilización juega un papel determinante ya que influye en el crecimiento y en el incremento de biomasa (Nagdhi Badi *et al.*, 2004). La mayoría de los estudios sobre nutrición en plantas aromáticas y medicinales son específicos en fertilización mineral (Figueira, 1996; Nikolova *et al.*, 1999), poniendo especial énfasis en minerales como el nitrógeno (Zeljzkov *et al.*, 2009), fósforo (Zhu *et al.*, 2008) y potasio (Pavlovic *et al.*, 2006) para elevar la producción de biomasa, así como el contenido y composición de metabolitos secundarios de interés económico.

Por otra parte, los estudios realizados en nutrición orgánica han sido enfocados a evaluar diferentes cantidades de composta para incrementar la producción de biomasa seca (Scheffer *et al.*, 1993), o favorecer el crecimiento vegetal y rendimiento de aceites esenciales (Mohamed y Abdum, 2004) y también se han utilizado coberturas vegetales con el mismo fin (Fontana *et al.*, 2006). En manzanilla se ha comparado la fertilización mineral y orgánica en el rendimiento de flores, contenido y composición de aceites esenciales, pero sus función no fueron significativa (Corrêa *et al.*, 1999), resultados similares fueron observados en *Coriandrum sativum* L. (Carrubba y Ascolillo, 2009). Por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue comparar la producción flores, de biomasa, la extracción nutrimental, así como el rendimiento y calidad de aceite esencial de manzanilla en función de la edad de la planta y fuente nutrimental del cultivo.

1.2. Materiales y métodos

La investigación se desarrollo en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo ubicado en Montecillo, Estado de México (19°29' LN y 98° 53' LO , a una altitud de 2 250 m. en un invernadero tipo túnel, la temperatura máxima registrada durante el periodo de cultivo fue de 40 °C y la temperatura mínima fue de 10 °C durante el ciclo primavera-verano 2007. La manzanilla fue sembrada en recipientes de poliestireno de 200 cavidades (dos semillas por cavidad). El riego se hizo con agua corriente y se mantuvieron en condiciones de invernadero. En las plántulas destinadas a fertilización orgánica se hicieron aplicaciones foliares con miel de abeja al 2% cada cinco días hasta el trasplante. Para las plántulas destinadas a fertilización inorgánica se aplicó solución Steiner a una concentración de 25% cada cinco días hasta el trasplante (Steiner, 1984), que se realizó 30 días después de la emergencia, en bolsas de polietileno negro de 20 X 20 cm; para la fertilización orgánica el sustrato utilizado fue una mezcla de suelo, composta y agrolita con relación 50:30:20 (v:v:v) cuyas características físico-químicas fueron las siguientes: densidad aparente D_{ap} 0.436 g.cm³; M.O. 20 %; pH 6.88; Nt: 0.59 %; P: 263.64 mg kg⁻¹; K: 11.12 cmol₍₊₎kg⁻¹; Ca: 5.08 cmol₍₊₎kg⁻¹; Mg: 4.44 cmol₍₊₎kg⁻¹; Na: 2.16 cmol₍₊₎kg⁻¹. Para la fertilización inorgánica se utilizó tezontle rojo con granulometría de 0.3 a 0.7 cm con las siguientes características físicas: D_{ap} de 0.8, D_r de 2.60; la capacidad de aireación de 23.3 % de volumen; capacidad de retención de humedad de 47.8% y espacio poroso de 70.7 % volumen.

Se utilizó un diseño en bloques completos al azar con cinco repeticiones (16 plantas por repetición), con arreglo factorial 3². Se utilizaron tres fuentes de fertilización (FF): 1) Fuente de fertilización I (ácidos húmicos al 1% aplicados con en el agua de riego) 2) Fuente de fertilización II (fertilizante de origen orgánico al 1% y aminoácidos biosintéticos) y 3) Fuente de Fertilización III (solución nutritiva Steiner al 75 % de concentración). Se hicieron tres cosechas

a los 87, 97 y 108 días después del trasplante (DDT). Se registró el rendimiento de flores (número, peso y diámetro) el cual fue registrado cada tercer día a partir de los 60 DDT, durante todo el periodo de cultivo. En tanto que en cada cosecha se midió el diámetro de tallo con un vernier digital en 4 tallos registrándose el promedio como dato. El peso en fresco de la parte aérea (PFPA) y raíz (PFR) se registró al pesar cuatro plantas y su raíz por separado. El peso en seco de la parte aérea (PSPA) y de la raíz (PSR) se determinó al secar las plantas y su raíz por separado en un horno a 70° C, durante 72 h.

La cantidad de nitrógeno total se determinó con el método Micro-Kjendahl. Los nutrimentos P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn y B fueron extraídos de acuerdo con Alcántar y Sandoval (1999). La extracción de los aceites esenciales se realizó con la técnica de destilación simple por arrastre de vapor, utilizando 50 g de flores frescas, de donde se colectó 150 mL del destilado, al cual se le hicieron tres extracciones con 50 mL de diclorometano (Cl_2CH_2) cada una. En un embudo de separación se obtuvo la fase orgánica (Cl_2CH_2), la cual fue secada con Na_2SO_4 , el disolvente se recuperó usando un rotaevaporador y el rendimiento de aceite esencial se logró por diferencias de peso. Los aceites fueron almacenados en frascos tipo vial de 5 mL y se conservaron en refrigeración hasta su análisis. La caracterización de los componentes se hizo por cromatografía de capa fina (CCF), utilizando placas de 20 X 20 de sílica gel 60 F₂₅₄ con base de aluminio, preparadas de acuerdo a lo indicado por Wagner y Bladt (1996). El análisis cuantitativo se realizó con un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) usando un equipo Hewlett Packard 5973 con una columna capilar HP5MS 5% fenil metil siloxano, 30mX250 μm X0.25 μm . Bajo las siguientes condiciones de operación: la temperatura inicial fue de 60 °C por 2 min aumentando 4 °C min⁻¹; la temperatura final fue de 250 °C, el puerto de inyección se encontraba a 250 °C, el flujo del gas helio fue de 1.5 mL min⁻¹; el cuadrupolo se

mantuvo a 230 °C y el voltaje a 1388 mv. La identificación y cuantificación correspondió a los tiempos e índices de retención que fueron confirmados con un estándar externo de α (-)-bisabolol (RT: 13.16 min). Los resultados se analizaron con el sistema de análisis estadístico SAS (1999) mediante un análisis de varianza y se aplicó la prueba de Tukey (0.05) para la comparación de medias.

1.3. Resultados y discusión

Las plántulas emergieron a los 10 días después de la siembra, durante la etapa de almacigo presentaron un desarrollo lento y poca altura, tanto para las condiciones orgánicas como en las inorgánicas. Sin embargo, desarrollaron yemas florales, que fueron eliminadas conforme aparecían para permitir el desarrollo vegetativo de la planta, ésta práctica se mantuvo durante 30 días después del trasplante, después de este periodo se permitió que las yemas crecieran y florecieran para realizar el primer corte de flores. Durante todo el ciclo del cultivo se realizaron cortes de flores cada tercer día, con la finalidad de mantener la producción de estas (rendimiento económico) y evitar la senescencia de las mismas en la planta (Doni *et al.*, 1999).

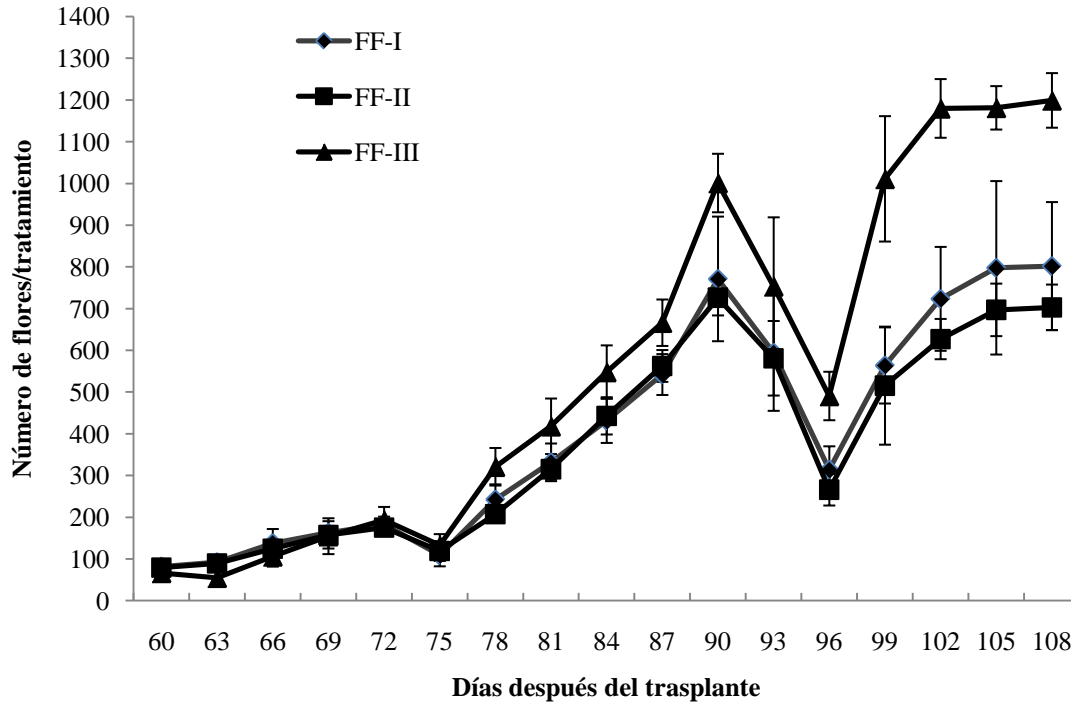


Figura 1. Número de flores por efecto de la fuente de fertilización en plantas de manzanilla (*Matricaria recutita*). FF-I: Fuente de fertilización I (ácidos húmicos), FF-II: Fuente de fertilización II (fertilizante orgánico y aminoácidos biosintéticos); FF-III: Fuente de Fertilización III (Solución Steiner 75 %).

En la Figura 1 se presentan las diferencias en el número de flores entre los diferentes tratamientos. Destacando que en el tratamiento inorgánico (FF-III) a los 78 DDT incrementó un 33% su producción con respecto a los tratamientos orgánicos (FF-I y FF-II), esta tendencia se mantuvo hasta los 90 DDT. A partir de esta fecha, la producción de flores presenta una tendencia negativa durante 6 días para los tres tratamientos evaluados. A los 99 DDT se eleva la productividad en los tres tratamientos y se visualiza un aumento de 40 % para el tratamiento inorgánico, tendencia que se mantiene hasta el último corte (108 DDT). El NF, pudo estar influenciado por la concentración de iones de N, K o Ca que incrementaron el rendimiento de las

inflorescencias por planta (Nikolova *et al.* 1999), favoreciendo a las que se encontraban bajo fertilización inorgánica.

Cuadro 1. Número de flores por planta y diámetro de flores evaluadas en plantas de manzanilla por efecto de la fuente de fertilización (FF) y por los días después del trasplante (DDT). Colegio de Postgraduados, 2007.

	Número de flores por planta	Peso de flores.planta ⁻¹ (g)	Diámetro de flor (mm)
FF			
FF-I [†]	73.23b	5.33b	10.78b
FF-II ^{††}	65.18b	4.84b	10.64b
FF-III [¶]	107.29a	9.66a	11.22a
DDT			
87	31.67b	3.13b	12.80a
98	35.68b	3.22b	11.48b
108	178.40a	13.51a	7.38c

FF-I[†]: Fuente de fertilización I (ácidos húmicos), FF-II^{††}: Fuente de fertilización II (fertilizante orgánico y aminoácidos biosintéticos); FF-III[¶]: Fuente de Fertilización III (Solución Steiner 75 %). Medias con letras iguales dentro de columnas, no son diferentes estadísticamente (Tukey, 0.05).

El peso de flores (PF) parece estar en función del número de flores por tratamiento (Cuadro 1). Al comparar los resultados de Mohammad *et al.*, (2009) a los 90 DDT (117.1 flores planta⁻¹), con los de esta investigación a los 98 DDT (35.68 flores planta⁻¹) se observa una diferencia de 41.78 % en el número de flores cosechadas, este efecto se puede atribuir al origen genético de la semilla utilizada y a las condiciones del cultivo. Con respecto al diámetro de flores (DF), éste fue

mayor en el tratamiento inorgánico con 11.22 mm y a los 87 DDT con 12.80 mm, estos diámetros fueron menores a los reportados por D'Andrea (2002) quien obtuvo flores de 13.7 a 19.9 mm.

El efecto de los días a la cosecha y la fuente de fertilización fue altamente significativo ($p \leq 0.05$) para las variables altura, peso en fresco y en seco de parte aérea. La interacción días a la cosecha y fuente de fertilización mostró efecto significativo para todas las variables evaluadas, excepto para el peso en fresco de la parte aérea que fue altamente significativo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Análisis de varianza para las variables morfológicas en manzanilla, medidas durante el ciclo de cultivo. Colegio de Postgraduados, 2007.

Fuente de variación	GL ^ξ	AP ^{ξξ}	PFPA ^φ	PFR ^{φφ}	DT ^{†††}	PSPA ^{¶¶¶}	PSR ^{ξξξ}
DDT [†]	2	**	**	*	*	**	*
FF ^{††}	2	**	**	*	*	*	**
DDT X FF [¶]	4	*	**	*	*	*	*
CME ^{¶¶}		5.33	87.08	79.73	1.76	15.18	3.359

†DDT: días después del trasplante; ††FF: fuente de fertilización; ††¶FF X DDT: interacción fuente de fertilización por días a la cosecha; ¶¶CME: cuadrado medio del error; ξGL: grados de libertad; ** altamente significativo; * significativo ($p \leq 0.05$); ns: no significativo; AP^{ξξ}: altura de planta; φPFPA: biomasa fresca de parte aérea; φφPFR: biomasa fresca de raíz; †††DT: diámetro de tallo; ¶¶¶PSPA: biomasa seca de parte aérea; ξξξPSR: biomasa seca de raíz.

En el Cuadro 3 se observa que las variables altura de planta, longitud de raíz, peso en fresco y en seco de la parte aérea fueron influenciadas significativamente por los días a la cosecha ($p \leq 0.05$) obteniendo los valores máximos a los 98 DDT; estos resultados pueden deberse a las condiciones de temperatura, luminosidad y humedad relativa dentro del invernadero que favorecieron la acumulación de fotoasimilados (Azcón y Talón, 2000) y a que la planta estaba en su punto óptimo de producción.

Cuadro 3. Valores medios de las variables evaluadas en plantas de manzanilla por efecto de la fuente de fertilización (FF) y los días después del trasplante (DDT). Colegio de Postgraduados 2007.

	AP ^{¶¶}	PFPA ^ξ	PFR ^{ξξ}	DT ^φ	PSPA ^{φφ}	PSR [†]
	(cm)	(g planta ⁻¹)	(g planta ⁻¹)	(mm)	(g planta ⁻¹)	(g planta ⁻¹)
FF						
FF-I [†]	42.67b	74.90b	41.84a	5.18b	15.05b	10.76a
FF-II ^{††}	41.76b	73.57b	42.06a	5.56ab	14.38b	10.48a
FF-III ^{¶¶}	52.79a	160.74a	41.61a	6.60a	29.90a	10.35a
DDT						
87	43.10b	90.47b	42.72b	5.48a	17.44b	9.14b
98	49.70a	107.87a	38.43b	6.42a	18.45a	8.23b
108	44.43b	110.92a	44.35a	5.44a	19.44a	13.25a

FF-I[†]: Fuente de fertilización I (ácidos húmicos), FF-II^{††}: Fuente de fertilización II (fertilizante orgánico y aminoácidos biosintéticos); FF-III^{¶¶}: Fuente de Fertilización III (Solución Steiner 75 %). ^{¶¶}AP: altura de planta; ^ξPFPA: peso fresco de parte aérea; ^{ξξ}PFR: peso fresco de raíz; ^φDT: diámetro de tallo; ^{φφ}PSPA: peso seco de parte aérea; [†]PSR: peso seco de raíz. Medias con letras iguales dentro de columnas, no son diferentes estadísticamente (Tukey, 0.05).

La mayor altura de planta (49.70cm.planta⁻¹) se registró a los 98 DDT, esta altura de planta es menor a la reportada por Mohammad *et al.* (2009), quienes tuvieron una altura máxima de 77.1 cm planta⁻¹ a los 90 DDT, en plantas cultivadas en campo abierto, lo que indica que las condiciones ambientales tienen influencia en la variación de las características morfológicas de la especie (Solouki *et al.*, 2008). Al considerar únicamente a la parte aérea de la planta como biomasa fresca total se tuvo diferencia altamente significativa, desde los 98 a los 108 DDT. Con respecto al peso en fresco y en seco de raíz, los resultados a los 108 DDT son diferentes

estadísticamente a los obtenidos en los muestreos previos. Estas variaciones, estuvieron influenciadas por el número de riegos y por el sustrato, debido a que en los sustratos orgánicos los riegos se realizaban cada 3 o 4 días y en el sustrato inorgánico el riego era diario, esta práctica fue determinada en función de la porosidad y en la capacidad de retención de humedad del sustrato.

En la Figura 2, se visualiza que la mayor extracción de macronutrientes y micronutrientes en manzanilla expresados en mg planta^{-1} se encontró en el tratamiento inorgánico, con respecto a los tratamientos orgánicos, esto debido a las condiciones de cultivo que favorecieron mayor abastecimiento de nutrientes y a la porosidad del sustrato, factor que aumento el tasa de absorción, la distribución a los sitios funcionales y la movilidad dentro de la planta (Alcántar y Sandoval 1999), promoviendo un crecimiento vigoroso. Sin embargo para el caso del fósforo la extracción nutrimental no tuvo efecto significativo ($p \leq 0.05$), esto se debe a que tanto en solución nutritiva como en la composta se contaba con cantidades de P iguales o mayores a 1 mol m^{-3} y a que este elemento es requerido para la formación de moléculas de isoprenildifosfato (IPP) y dimetilalildifosfato (DMAPP) que son los precursores de las unidades de isopreno de los terpenos (Başer y Demirci, 2004). Se obtuvo la misma respuesta para Cu y Zn, en el caso de este ultimo, participa en la asimilación de carbono y acumulación de sacáridos por lo que ha sido asociado con la biosíntesis de aceites esenciales (Misra *et al.*, 2006). Los tratamientos de fertilización orgánica son muy similares en su comportamiento de extracción de los nutrientes evaluados.

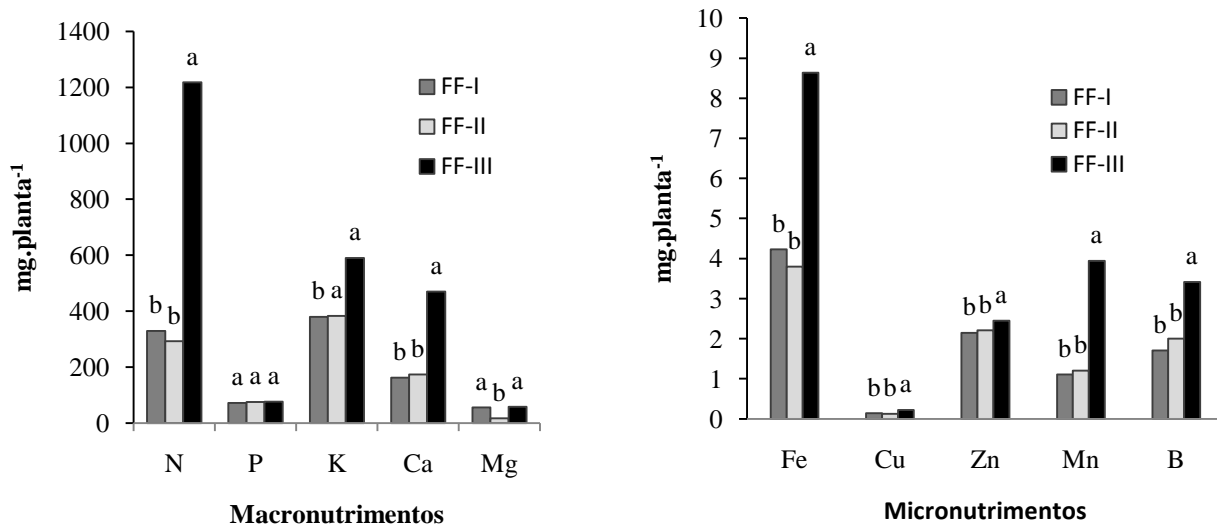


Figura 2. Extracción de macronutrientes y micronutrientes en plantas de manzanilla por efecto de la fuente de fertilización. FF-I: Fuente de fertilización I, FF-II: Fuente de fertilización II; FF-III: Fuente de Fertilización III. Letras iguales entre barras para cada factor, no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$).

Por efecto de la época de corte (Figura 3) se tuvieron diferencias altamente significativas para N, Fe y B a los 98 DDT, periodo en el cual la productividad de flores vuelve a incrementarse (ver Fig. 1). Con respecto a P y K, éstos se encuentran en mayor proporción a los 87 DDT, en el caso particular del P esto pudo deberse a una respuesta de adaptación de las raíces en la adquisición de P, lo que causó una disminución en la formación de órganos reproductivos (flores) (Marschner, 1995). Un comportamiento parecido fue observado por Kováčik *et al.* (2006) bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno, aumentando significativamente la biomasa de raíz para aumentar la eficiencia de asimilación del medio, permitiendo la traslocación de fotoasimilados de los tallos a la raíz y disminuyendo la cantidad de flores. La extracción de Ca y Mg fue mayor a los 108 ddt, en el caso de la acumulación de Cu, Zn, y Mn, no se tuvieron

diferencias estadísticas significativas entre fechas de corte ($p \leq 0.05$) en cuanto a la extracción en mg.planta^{-1} por efecto de los DDT.

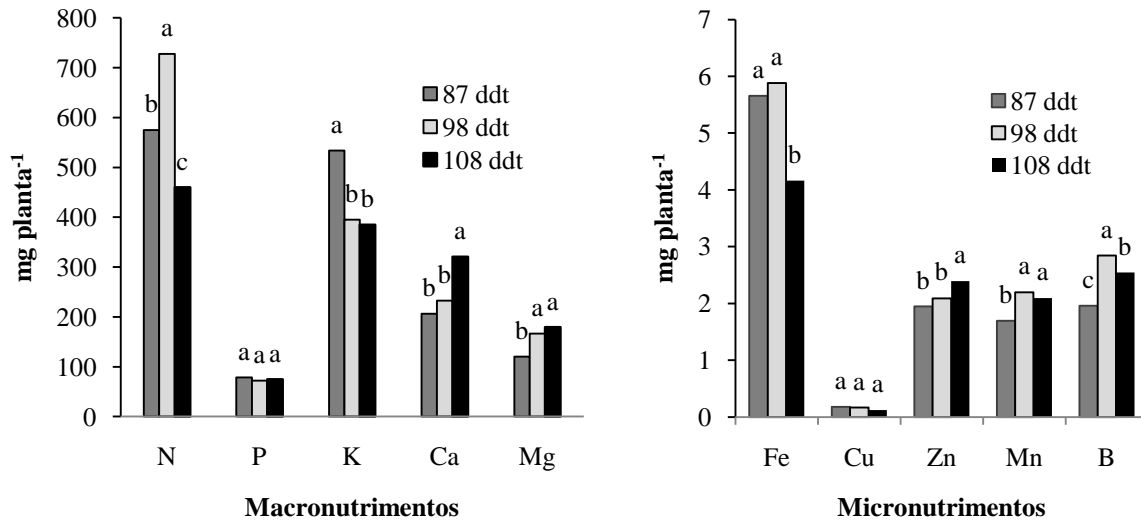


Figura 3. Extracción de macronutrientes y micronutrientes en plantas de manzanilla por efecto de la época de corte. (ddt: días después del trasplante). Medias con letras iguales entre barras para cada factor, no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$).

La caracterización química de los aceites esenciales permitió reconocer al óxido de bisabolol A/B (Rf: 0.20 y color violeta); bisabolol (Rf: 0.32 y color violeta) y al azuleno (Rf: 0.94 con color violeta) estos valores y colores corresponden a lo reportado por Wagner y Bladt (1996) para aceite esencial de manzanilla (Anexo 1). El total de aceite no fue modificado por la edad de la planta y/o la fuente de fertilización. En tanto que el α -(-) bisabolol presentó diferencias altamente significativas ($p \leq 0.05$) por efecto de la edad de la planta y la fuente de fertilización, siendo significativa la interacción de estos factores (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis de varianza para el rendimiento total de aceite esencial en manzanilla y α -(-) bisabolol. Colegio de Postgraduados, 2007.

Fuente de variación	GL [†]	Rendimiento de aceite esencial (g)	Rendimiento de α -(-) bisabolol en el AE ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
DC ^{††}	2	*	**
FF [¶]	2	*	**
DC X FF ^{¶¶}	4	*	*
CME ^ξ		0.00001	12.84

[†]GL: Grados de libertad, ^{††}DC: días a la cosecha; [¶]FF: fuente de fertilización; ^{¶¶}FF X DC: interacción fuente de fertilización por días a la cosecha; ^ξCME: cuadrado medio del error; ** altamente significativo; * significativo ($p \leq 0.05$); ns: no significativo.

El rendimiento de aceites esenciales en mg g^{-1} no fue afectado por efecto de fertilización y de la época de cosecha, aún cuando otros autores mencionan que el rendimiento de aceite tiende a disminuir en la última cosecha (Azizi *et al.*, 2007). Los resultados de los análisis realizados en el cromatógrafo de gases indican que el contenido de α -(-) bisabolol en el aceite esencial fue mayor en el tratamiento de ácidos húmicos y a los 98 DDT, este efecto puede atribuirse a la interacción de las sustancias húmicas con los procesos metabólicos de las plantas (Eyheraguibel *et al.*, 2008), y a que la molécula de este componente es menos volátil (Šalamon, 2007) factor que posiblemente favoreció su acumulación en las flores. La menor concentración se obtuvo en el tratamiento inorgánico (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto de la fertilización y la etapa de corte sobre el rendimiento de aceite esencial (mg g⁻¹) en manzanilla. Colegio de Postgraduados, 2007.

	Rendimiento AE		Contenido de α -(-) bisabolol
	(mg g ⁻¹)	mg planta ⁻¹	en el AE (μ g mL ⁻¹)
FF [†]			
FF-1 ^{††}	0.0184 a	0.0980b	1.182a
FF-II [‡]	0.0168 a	0.0813b	0.935b
FF-III [§]	0.0139 a	0.1342a	0.584c
DC			
87	0.0173 a	0.0541b	0.89b
98	0.0176 a	0.0566b	1.37a
108	0.0142 a	0.1918a	0.43c

[†]FF: Fuente de fertilización; ^{††}FF-I: Fuente de fertilización I (ácidos húmicos), [‡]FF-II: Fuente de fertilización II (fertilizante orgánico y aminoácidos biosintéticos); [§]FF-III: Fuente de Fertilización III (Solución Steiner 75 %). [§]DDT: Días después del trasplante. Medias con letras iguales dentro de columnas, no son diferentes estadísticamente (Tukey, 0.05).

Este efecto también pudo ser influenciado por el estado de desarrollo de las flores, al respecto D'Andrea (2002) y Šalamon (2007), indican que hay una conexión en la acumulación de productos secundarios y los cambios ontogénicos de las cabezas florales. Sin embargo, debe señalarse que el rendimiento total de aceites esenciales y sus componentes dependerán del rendimiento de flores frescas, en este caso resulta significativo para el tratamiento inorgánico.

1.4. Conclusiones

El rendimiento de flores (número, peso y diámetro) es altamente influenciado por la edad de la planta y la fuente de fertilización suministrada. El peso de flores está en función del número de flores planta⁻¹ y su producción depende del manejo del cultivo. El rendimiento de biomasa fresca y seca fue favorecido bajo el suministro inorgánico de nutrimentos, incrementando la extracción de estos con respecto a los tratamientos orgánicos. El rendimiento de aceite esencial no fue afectado por la fuente de fertilización, ni por los días a la cosecha. El contenido de α -(-)-bisabolol fue mayor en el tratamiento con ácidos húmicos y a los 98 DDT.

1.5. Literatura citada

Alcántar G. G. y Sandoval V. M. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal. Guía de muestreo, preparación, análisis e interpretación. Publicación especial 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Chapingo, México. 155 p.

Azcon-Bieto J. y M. Talón. 2000. Fundamentos de fisiología vegetal. Editorial McGraw Hill Interamericana, Madrid, España 522 p.

Azizi M., R. Bos, H. J. Woerdenbag and O. Kayser. 2007. A comparative study of four chamomile cultivars cultivated in Iran. *Acta Horticulturae* 749:93-96.

Başer H. K. C. y F. Demirci. 2007. Chemistry of essential oils. *In: Flavours and fragrances*. Bergeer R. G. (Ed.) Springer. Berlin 648 pp.

Bojorquez F. 2006. Tendencias orgánicas. *Productores de Hortalizas*, 1: 82-84.

Carrubba A. and V. Ascolillo. 2009. Effects of organic and chemical N-fertilization on yield and morphological features in coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Acta Horticulturae* 826:35-42.

Corrêa Jr C., P. D. Castellane and J. Jorge Neto. 1999. Influence of organic and chemical fertilization on the yield flowers, contents and composition of essential oil of (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert). *Acta Horticulturae* 502:195-201.

D'Andrea L. 2002. Variation of morphology, yield and essential oils components in common chamomile (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert) cultivars grown in Southern Italy. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*. 9 (4): 359-365.

- Doni F. L., J. J. Crachineski, M. V. R. Milleo and C. Corrêa Jr. 1999. Evaluation of chamomile cultivars (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert) in different handlings of pruning. *Acta Horticulturae* 502:187-190.
- Eyheraguibel, B., J. Silvestre, P. Morard. 2008. Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. *Bioresource Tech.* 99: 4206-4212.
- Figueira G. M. 1996. Mineral nutrition, production and artemisin content in *Artemisia annua* L. *Acta Horticulturae* 426: 573-577.
- Fontana E., J. Hoerberechts and S. Nicola. 2006. Effect of mulching on medicinal and aromatic plants in organic farm guest houses. *Acta horticulturae* 723:405-410.
- Franke R. and H. Schilcher. 2007. Relevance and use of chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Acta Horticulturae* 749:29-44.
- Hamilton A. C. 2004. Medicinal plants conservation and livelihoods. *Biodiversity and conservation* 13:1477-1517.
- Kováčik J., M. Repčák and I. Kron. 2006. Nitrogen deficiency induced changes of free amino acids in coumarin contents in the leaves of *Matricaria chamomilla*. *Acta Physiologiae Plantarum*. 28 (2). 159-164.
- Masarovičová E. and K. Král'ová, 2007. Medicinal plants: past, nowadays, future. *Acta Horticulturae* 749:19-27.
- Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Second Edition. Academic Press. Great Britain. 889 p.
- Meneses-Reyes J. C., Soto-Hernández R. M., Espinosa-Solares T., y Ramírez-Guzmán M. E. 2008. Optimización del proceso de extracción de flavonoides de flor de Manzanilla (*Matricaria recutita* L.). *Agrociencia* 42:425-433.
- Misra A., S. Dwivedi, A. K. Srivastava, D. K. Tewari, A. Khan y R. Kumar. 2006. Low iron stress nutrition for evaluation of Fe-efficient genotype physiology, photosynthesis, and essential monoterpene oil(s) yield of *Ocimum sanctum*. *Photosynthetica* 44(3): 474-477.
- Mohammad R., S. Hamid, A. An, D. K. Norbert, and V. D. Patrick. 2009. Effects of planting date and seedling age on agro-morphological characteristics, essential oil content and composition of german chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) grown in Belgium. *Industrial Crops and Products*. 31:145-152.
- Mohamed, M. and A. A. Abdum. 2004. Growth and oil production of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill): effect of irrigation and organic fertilization. *Biol. Agric. Hortic.* 22 (1):31-39.
- Muñoz L. B. F. 2002. Plantas medicinales y aromáticas: Estudio, cultivo y procesado. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 365 p.

- Naghdi Badi H., D. Yazdani, S. M. Ali and F. Nazari. 2004. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products*.
- Nikolova A., K. Kozhuharova, V. D. Zheljazkov, and L. E. Craker. 1999. Mineral nutrition of chamomile (*Matricaria recutita* (L.) K. *Acta Horticulturae* 502:203-207.
- Pavlovič A., E. Masarovičová, K. Král'ová, and J. Kubova. 2006. Response of chamomile plants (*Matricaria recutita* L.) to cadmium treatment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 77(5):763-771.
- Rodríguez-Fragoso L., J. Reyes-Esparza, S. W. Burchiel, D. Herrera-Ruiz, and E. Torres. 2008. Risks and benefits of commonly used herbal medicines in Mexico. *Toxicology and applied pharmacology* 227:125-135.
- Šalamon I. 2007. Effect of the internal and external factors on yield and qualitative-quantitative characteristics of chamomile essential oils. *Acta Horticulturae* 749: 45-64.
- Sangwan N. S., A. H. A. Farooqi, F. Shabin and R. S. Sangwan. 2001. Regulation of essential oil production in plants. *Plant growth regulation* 34:3-21.
- SAS Institute. 1999. Statistical analysis system. Release 8.1. Cary NC. USA.
- Scheffer M. C., P. Ronzelli and H. S. Koehler. 1993. Influence of organic fertilization on the biomass, yield and composition of the essential oil of *Achillea millefolium* L. *Acta Horticulturae* 331:109-114.
- Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution. *Proceeding sixth international congress on soilless culture*. Wageningen, The Netherlands. pp. 633-650.
- Solouki M., Mehdikhani H., Zeinali H. and Emamjomeni. 2008. Study of genetic diversity in Chamomile (*Matricaria chamomilla*) based on morphological traits and molecular markers. *Scientia Horticulturae* (117): 281-287.
- World Health Organization. 1999. *Monographs on selected medicinal plants*. Volume 1. Geneva, Italy. 295 pp.
- Zheljzakov V. D., L. E. Craker, B. Xing, N. E. Nielsen and A. Wilcox. 2008. Aromatic plant production on metal contaminated soils. *Science of the Total Environment* 395:51-62.
- Zheljzakov V. D., V. Cerven, C. L. Cantrell, W. M. Ebelhar and T. Horgan. 2009. Effect of nitrogen, location and harvesting stage on peppermint productivity, oil content, and oil composition. *Hort Science* 44(5):1267-1270.
- Zhu Z., Z. Liang, R. Han and J. Dong. 2008. Growth and saikosaponin production of the medicinal herb *Bluperum chinese* D. C. under different levels of nitrogen and phosphorus. *Industrial Crops and Products*.
- Wagner H. and S. Bladt. 1996. *Plant drug analysis*. Springer Verlag. Berlin. 384 p.

CAPITULO II. FUENTES DE FERTILIZACIÓN, PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y

ACEITES ESENCIALES EN MENTA

FERTILIZING SOURCE, BIOMASS AND ESSENTIAL OILS PRODUCTION OF

PEPPERMINT

Resumen

En las plantas aromáticas, la fertilización juega un papel determinante en el rendimiento de biomasa y la composición de aceites volátiles, de ahí que para conocer la relación entre la fuente de fertilización, la producción de biomasa y calidad de aceites esenciales en menta (*Mentha x piperita* L.), se estableció un experimento bajo condiciones de invernadero en el ciclo primavera-verano del 2007, con una variedad comercial de menta. Se compararon dos fuentes de fertilización orgánica en las que se suministraron riegos con ácidos húmicos y un fertilizante de origen orgánico con aminoácidos biosintéticos, y como tratamiento inorgánico se utilizó la Solución Steiner al 75 % de concentración. Se hicieron tres muestreos a los 60, 90 y 120 días después del trasplante (ddt). Con un diseño de bloques completos al azar con cinco repeticiones y con arreglo factorial 3². En cada muestreo se registró la altura, el rendimiento fresco y seco de la planta y se hizo la comparación cualitativa y cuantitativa de aceites esenciales por cromatografía de capa fina (CCF) y cromatografía de gases-espectrofotometría de masas (CG-EM). Los resultados mostraron significancia estadística para la producción de biomasa la cual se incrementó con la nutrición inorgánica. El rendimiento de aceite esencial y la calidad del mismo son similares bajo fertilización orgánica como inorgánica.

Palabras clave: *Mentha x piperita* L., fertilización, rendimiento, aceites esenciales.

Abstract

In aromatic plants, the fertilization playing a role in the biomass yield and composition of volatile oils. An experiment was established under greenhouse conditions in the spring-summer season 2007, to understand the relationship between the source of fertilization and biomass production and quality of essential oils in peppermint. Two sources of organic fertilizer were compared: humic acids and a organic fertilizer and biosynthetic aminoacids. The Steiner solution at 75 % concentration was used as inorganic treatment. Three cuts were made at 60, 90 and 120 days after transplantation. A randomized complete block design was used with five replications and factorial arrangement 3². The height, stem diameter, fresh and dry yield were recorded. The qualitative and quantitative comparisons of essential oils were made by thin layer chromatography (TLC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The results showed statistical significance for the biomass production, that it increased with the inorganic nutrition. The essential oil yield and its quality are similar under organic and inorganic fertilization.

Keywords: *Mentha x piperita* L., fertilization, yield, essential oils.

2.1. Introducción

En México, las plantas medicinales y aromáticas forman parte del grupo de los productos no tradicionales más rentables. Su producción representa una alternativa viable y su demanda se incrementa progresivamente tanto a nivel nacional como internacional al dirigirse a nichos de mercado de alto poder adquisitivo (Zamorano y Ríos, 2004). La producción orgánica de plantas aromáticas y medicinales es incipiente a pesar de que están incluidas en la categoría de productos orgánicos de exportación (Bojorquez, 2006). Tradicionalmente, las plantas aromáticas y medicinales se obtenían de recolección (Craker, 1999), la cual se sigue practicando

para determinadas especies (Cases, 2007). La demanda ha aumentado y la recolección ya no es suficiente, por originar una sobreexplotación de las poblaciones silvestres (Zengin *et al.*, 2008) y sobreexplotación del recurso suelo, lo que demanda implementar otras formas de producción, como la agricultura protegida que considere la obtención de productos bien identificados y de alta calidad (Nakano *et al.*, 2003) sin poner en riesgo la salud del consumidor (Craker, 1999).

La menta (*Mentha x piperita* L.) es una hierba aromática perenne que pertenece a la familia *Lamiaceae*, se distribuye en regiones templadas y subtempladas (Arzani *et al.*, 2007). Es de importancia económica por la producción de hojas secas (usadas en té y condimentos) y la extracción de aceites esenciales. Estos aceites volátiles son usados en la industria de saborizantes, fragancias y farmacéutica (Dorman *et al.*, 2003) por sus propiedades antibacteriales, antioxidantes, analgésicas y antígenotóxicas (Yadegarinia *et al.*, 2006). Los principales factores que modifican la producción y calidad de aceites en el cultivo de la menta son el riego (Zheljazkov y Margina, 1996) y la aplicación de fertilizantes (Nagdhi Badi *et al.*, 2004).

Por la importancia económica que tienen los principios activos extraídos de la menta y su uso en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica el objetivo del presente trabajo fue comparar el origen de las fuentes de fertilización sobre la producción de biomasa, la cantidad y calidad de aceites esenciales en menta.

2.1. Materiales y métodos

Durante el ciclo primavera-verano 2007 se estableció el experimento en el Colegio de Postgraduados (19° 29' LN, 98° 53' LO, a 2 250 m). Se usó semilla comercial de menta que fue sembrada en recipientes de poliestireno (dos semillas por cavidad) utilizando turba para los

tratamientos orgánicos y tezontle rojo para el inorgánico (diámetro de partícula 0.2-0.3 cm). El riego se hizo diariamente con agua y se mantuvieron en un invernadero tipo túnel. A partir de la aparición de las primeras hojas verdaderas a las plántulas del tratamiento orgánico se les hicieron aplicaciones foliares con miel de abeja al 2 % cada cinco días hasta el trasplante. Las plántulas destinadas a fertilización inorgánica fueron regadas con agua corriente y cada cinco días se aplicó solución Steiner (Steiner, 1984) a una concentración de 25 % hasta el trasplante.

El trasplante se realizó 30 días después de la emergencia. Las plántulas se colocaron en bolsas de polietileno negro (20 X 20 cm); para la fertilización orgánica se usó una mezcla de suelo, composta y perlita en la proporción 50:30:20 (v:v:v) cuyas características físico-químicas fueron: Dap 0.436 g.cm³; M.O. 20 %; pH 6.88; Nt: 0.59 %; P: 263.64 mg kg⁻¹; K: 11.12 cmol₍₊₎kg⁻¹; Ca: 5.08 cmol₍₊₎kg⁻¹; Mg: 4.44 cmol₍₊₎kg⁻¹; Na: 2.16 cmol₍₊₎kg⁻¹. En el tratamiento fertilización inorgánica se utilizó tezontle rojo con granulometría de 0.3 a 0.7 cm con una Dap de 0.8, Dr de 2.60; la capacidad de aireación de 23.3 % de volumen; Capacidad de retención de humedad de 47.8% y espacio poroso de 70.7 % volumen.

El experimento se diseñó en bloques al azar con cinco repeticiones con arreglo factorial 3², la unidad experimental estuvo constituida por 16 plantas. Los factores fueron días a la cosecha (60, 90 y 120 ddt) y fuente de fertilización (Orgánica I: (riego con ácidos húmicos Humathed 050060[®] al 1 %), Orgánica II (riego con fertilizante líquido Nutripro Forte[®] al 1 % y aspersiones foliares con Aminofit Xtra[®] cada 15 días); inorgánica (solución nutritiva Steiner al 75 % [SS]).

En cada fecha de muestreo se evaluaron cuatro plantas por repetición, se registró el peso en fresco, la altura de planta y el diámetro de tallo. Las plantas fueron divididas en parte aérea y

raíz. Para medir el peso en seco, el material vegetal se secó en un horno a 70 ° C, durante 72 horas. Muestras representativas de los tratamientos fueron usadas para la determinación de nitrógeno total por el método micro-Kjeldahl. Para P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn y B se hizo una digestión diácida (HNO₃ y HClO₄) (Alcántar y Sandoval, 1999) y el análisis cuantitativo se realizó en un equipo de espectroscopia de emisión atómica y plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES VARIAN™) Modelo Liberty II. Con la concentración de nutrientes y el rendimiento de materia seca se calculó la extracción de cada nutriente.

Los aceites esenciales fueron extraídos a través de destilación simple por arrastre de vapor, almacenados en frascos tipo vial y conservados en refrigeración hasta su análisis. Mediante cromatografía de capa fina (CCF), de acuerdo a la metodología señalada por Wagner y Bladt (1996), se caracterizaron los componentes de los aceites esenciales. La identificación y cuantificación de los componentes se realizó por medio de los tiempos e índices de retención, utilizando Cromatografía de Gases (Hewlett Packard 5973 con una columna capilar 30mX250 HP5MS $\mu\text{m} \times 0.25\mu\text{m}$ de Fenil Metil Siloxano). El análisis de varianza y la comparación de medias fue mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$ %), utilizando el sistema de análisis estadístico SAS (1999).

2.3. Resultados y discusión

Las plántulas emergieron 16 días después de la siembra y en el almacigo se presentó mayor altura en las plántulas del tratamiento orgánico que en el inorgánico, posiblemente por efecto del sustrato utilizado. Una vez que se trasplantaron en las bolsas de polietileno negro ésta tendencia se modificó. En el Cuadro 1 se observa que la edad del cultivo y la fuente de fertilización tuvieron influencia altamente significativa y significativa ($p \leq 0.05$) en las variables evaluadas.

Cuadro 1. Análisis de varianza para las variables morfológicas medidas durante el ciclo de cultivo. Colegio de Postgraduados, 2007.

Fuente de variación	de GL ^α	AP ^{††}	PFPA ^{¶¶}	PFR ^{§§}	DT ^{ᵇᵇ}	PSPA ^{αα}	PSR ^{†††}
EC [†]	2	**	**	**	*	**	*
FF ^{¶¶}	2	**	*	*	**	*	*
EC X FF [§]	4	**	**	*	*	*	*
CME ^ᵇ		14.34	62.100	568.39	0.294	3.96	65.96

†EC: edad del cultivo; ¶¶FF: fuente de fertilización; §FF X EC: interacción fuente de fertilización por días a la cosecha; ᵇCME: cuadrado medio del error; αGL: grados de libertad; ** altamente significativo; * significativo ($p \leq .05$); ns: no significativo; ††AP: altura de planta; ¶¶PFPA: biomasa fresca de parte aérea; §§PFR: biomasa fresca de raíz; ᵇᵇDT: diámetro de tallo; ααPSPA: biomasa seca de parte aérea; †††PSR: biomasa seca de raíz.

La edad del cultivo fue un factor determinante en las variables altura, peso en fresco y en seco de parte aérea. A los 90 ddt se observa variación significativa en los valores medios (Cuadro 2), debido a que las plantas se encontraban en su etapa de máximo desarrollo. Las plantas cultivadas con solución inorgánica presentaron un aumento significativo en todas las variables evaluadas, al respecto, Mairapeytan *et al.* (1999) indican que posiblemente se debe a la fertilización. El peso en fresco de parte aérea aumentó 50% con respecto a los tratamientos orgánicos. Este valor fue atribuido al vigor de las plantas, ya que con el manejo de la solución Steiner se favoreció la formación de numerosos estolones que originaron mayor cantidad de tallos y hojas. Al respecto, Zheljzkov y Margina (1996), indican que los niveles nutrimentales tienen gran influencia en el crecimiento de las plantas (producción de biomasa), siendo los altos contenidos de nitrógeno los que incrementan el peso de las hojas, disminuyendo al mismo tiempo la cantidad de tricomas glandulares, así como la producción (Jeliazkova *et al.*, 1999) y la calidad del aceite esencial (Borlina *et al.*, 2001).

El último muestreo se hizo a los 120 ddt, contrario a lo esperado, el peso en fresco, el diámetro de tallo y el peso seco de la parte aérea disminuyeron (Cuadro 2), debido a que las plantas presentaron pérdida de hojas por efecto de senescencia. Esta tendencia coincide con lo reportado por Rohloff *et al.* (2005) quienes observaron una disminución en la producción de biomasa, debida a un efecto del desarrollo de la planta y a la edad de la misma. El peso en fresco y seco de la raíz se incrementó por la formación de rizomas.

Cuadro 2. Variables evaluadas en plantas de menta (*Menta x piperita* L.). Colegio de Postgraduados, 2007.

	AP [†] (cm)	PFPA ^{††} g.planta ⁻¹	PFR [¶] g.planta ⁻¹	DT ^{¶¶} (mm)	PSPA ^ξ g.planta ⁻¹	PSR ^{ξξ} g.planta ⁻¹
EC ^p						
60	43.29 b	78.86 b	99.79 c	3.18 a	11.25 b	16.01 c
90	43.08 b	91.61 a	161.41 b	3.07 a	18.60 a	30.56 b
120	50.38 a	88.02 a	297.77 a	2.83 a	17.02 a	59.52 a
FF ^{bp}						
Orgánica I	33.95 b	57.94 b	177.88 b	2.85 b	9.29 b	29.80 b
Orgánica II	34.50 b	48.44 b	161.04 b	2.54 b	9.97 b	34.69 ab
Inorgánica	48.29 a	142.12 a	220.05 a	3.70 a	27.63 a	41.59 a

Medias con letras iguales entre columnas por factor, no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). [†]AP: altura de planta; ^{††}PFPA: peso en fresco de parte aérea; [¶]PFR: peso en fresco de raíz; ^{¶¶}DT: diámetro de tallo; ^ξPSPA: peso en seco de parte aérea; ^{ξξ}PSR: peso en seco de raíz. ^pEC: Edad del cultivo; ^{bp}FF: Fuente de fertilización.

La extracción nutrimental en menta presentó diferencias significativas y altamente significativas para todos los elementos analizados, y la interacción muestreo por tratamiento

presentó diferencias en la concentración de N, K, Mg y B. En las plantas de menta, los niveles de acumulación para N^+ , P^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} fueron altos para el tratamiento inorgánico (Figura 1), esto se debió al suministro constante de nutrientes y a las características físicas del sustrato utilizado. En el caso de los tratamientos Fertilización Orgánica I y Orgánica II, los valores de extracción nutricional fueron menores, tal vez por la retención de humedad en el material orgánico, factor que afectó de manera negativa la absorción por la raíz, lo que explica la reducción en el rendimiento de biomasa en estos tratamientos (Cuadro 1). La tendencia de concentración fue similar para los micronutrientes (Figura 1), siendo mayores para Fe^+ , Mn^+ y Zn^+ y para el tratamiento inorgánico. Esta acumulación de micronutrientes, pudo estar en función de la frecuencia y cantidad de agua suministrada (Misra y Srivastava, 2000).

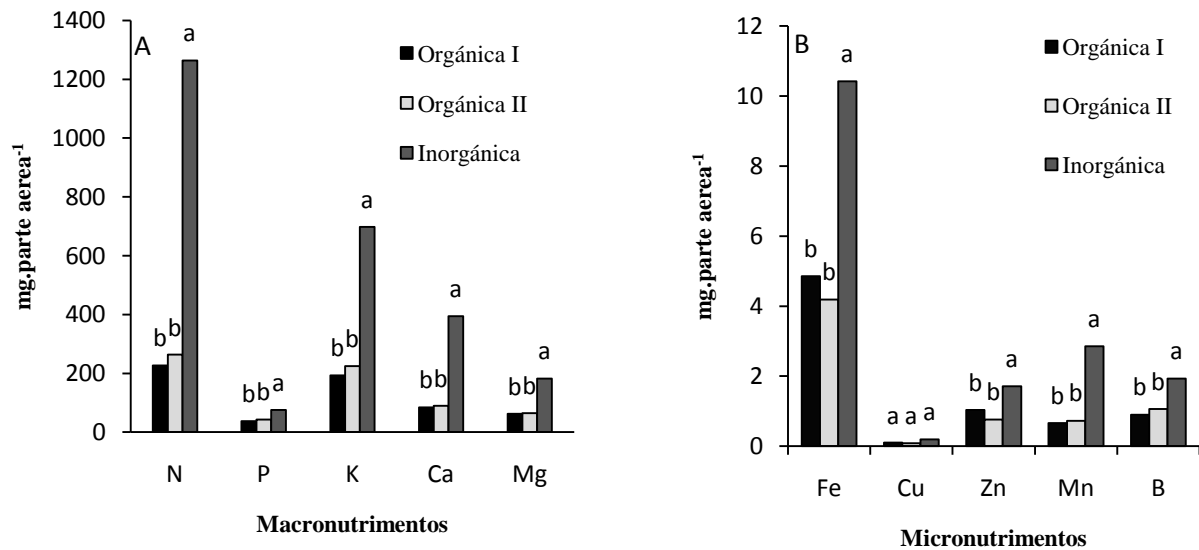


Figura 1. Extracción nutricional (mg parte aerea⁻¹) de (A) Macronutrientes y (B) Micronutrientes en plantas de menta por efecto de la fuente de fertilización. Barras con letras iguales para cada nutriente no son estadísticamente diferentes (Tukey 0.05).

En relación con la edad del cultivo (Figura 2), la extracción nutricional de N, K, Ca, Fe, Zn, y Mn fue mayor a los 90 ddt. Este resultado indica que la planta se encontraba en el estado

óptimo de crecimiento vegetativo con la mayor cantidad de biomasa fresca y seca. En la extracción nutrimental, únicamente el Mg se incrementa en función de la edad de la planta y siempre fue mayor en las plantas de tratamiento inorgánico. Los nutrientes que mantuvieron una tendencia de extracción similar durante todo el ciclo de cultivo fueron P, Cu, Zn y B, pero las diferencias no fueron significativas entre tratamientos. En el caso del P y el Zn, la tendencia de extracción, pudo deberse a que estos elementos son requeridos por las plantas para la formación de precursores de aceites esenciales (Baser y Demirci, 2007; Misra *et al.*, 2006). En este estudio se refuerza el conocimiento reportado por otros investigadores, quienes indican que la producción de biomasa se modifica por las condiciones agronómicas (McConkey *et al.* 2000), la época de cosecha, la etapa fenológica, la densidad de siembra (Chauhan *et al.*, 2009), la temperatura, humedad relativa y fotoperiodo (Figueiredo *et al.*, 2008).

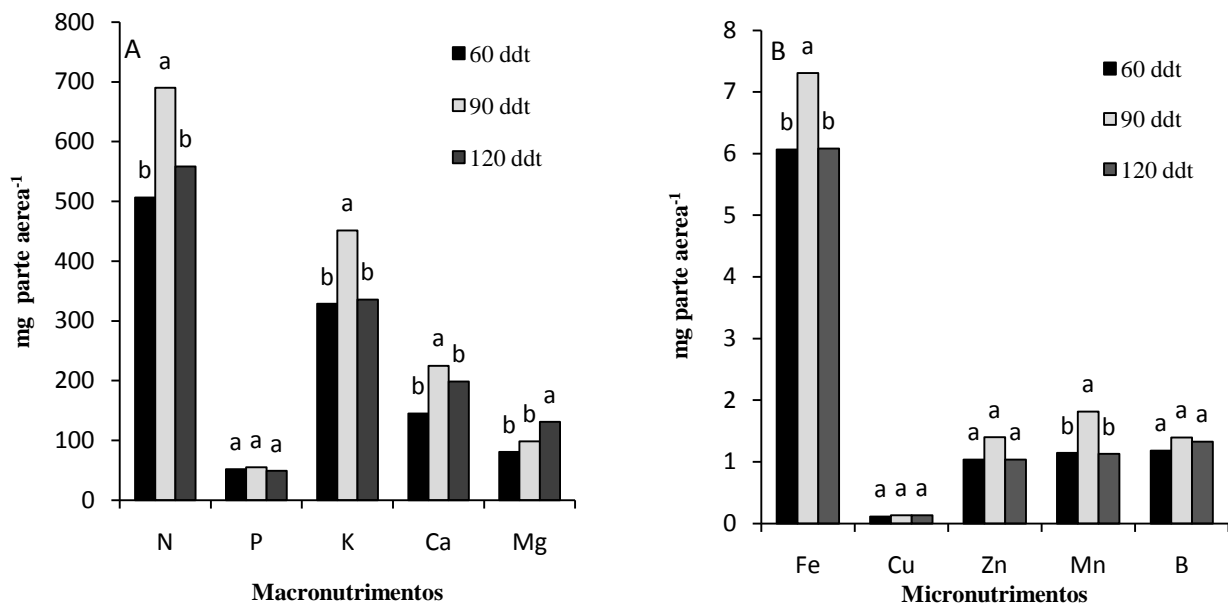


Figura 2. Extracción nutrimental ($\text{mg parte aerea}^{-1}$) de (A) macronutrientes y (B) micronutrientes en plantas de menta en función de la edad de la planta. Barras con letras iguales en cada nutriente no son estadísticamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$).

Aún cuando se ha reportado que el rendimiento de aceites esenciales, depende del incremento en área foliar y de tricomas glandulares (Jeliazkova *et al.*, 1999), en este estudio la cantidad de aceites esenciales en mg g^{-1} de menta no fue modificada por la fuente de fertilización o la edad de la planta, razón por la cual no se muestra el ANOVA. En el caso de la fertilización inorgánica, este efecto puede explicarse a que la planta requirió más gasto de energía para reducir la fuente nitrogenada de nitrato a amonio (Lamsfus *et al.*, 2003), limitando el contenido de carbohidratos solubles y de reserva que disminuyeron la síntesis de los precursores de los monoterpenos (Baser y Demirci, 2007). En el Cuadro 3 se muestra la comparación de medias entre tratamientos.

Cuadro 3. Efecto de la fertilización y la etapa de corte sobre el rendimiento de aceite esencial (mg g^{-1}) en *Mentha x piperita* L. Colegio de Postgraduados, 2007.

Fertilización	Rendimiento AE (mg g^{-1})	Edad de la planta (ddt [†])	Rendimiento AE (mg g^{-1})
Orgánica 1	0.00142 a	60	0.00140 a
Orgánica 2	0.00140 a	90	0.00138 a
Inorgánica	0.00138 a	120	0.00135 a

Medias con letras iguales entre columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). AE: Aceite esencial; [†]ddt: días después del trasplante.

Con la técnica de cromatografía de capa fina (CCF) se identificaron dos componentes bioactivos de color azul del aceite esencial de menta: mentol y cineol con valores de R_f de 0.29 y 0.45, respectivamente (Anexo 2); lo cual coincide con lo descrito por Wagner y Bladt (1996). El análisis de cromatografía de gases espectrometría de masas (CG-EM) detectó la presencia de otros componentes del aceite esencial los cuales fueron identificados en función del tiempo de retención (R_t) y de acuerdo con la biblioteca de espectros (NIST MS Search 2.0) fueron:

eucaliptol (Tr 6.44); eugenol (Tr 7.49); exo-2-hidroxicineol (Tr. 8.58); p-menth-1-en-ol (Tr 10.33); piperidina 1, 2, 6-trimetil (Tr 13.77); 2,5-ciclohexadieno-1 (Tr 15.65), pero se encontraban en cantidades traza (0.06 %) , y por tal motivo no fueron analizados estadísticamente. El análisis cromatográfico no detectó la presencia de mentol, a pesar de que se encontró por CCF. Esto pudo deberse a un efecto de evaporación o degradación del componente durante el manejo de muestras y a las condiciones de almacenamiento de las mismas, el cual puede ser atribuido a la naturaleza química del compuesto (alcohol de bajo peso molecular). También es posible que el contenido de mentol fue afectado por el factor fertilización, ya que Borlina *et al.* (2001), indican que los contenidos de nitrógeno disminuyen la calidad del aceite esencial, bajando la cantidad de mentol. Otro factor a considerar es la edad de la planta, debido a que Rohloff *et al.* (2005) señalan que el contenido de monoterpenos se incrementa con la edad de las hojas, pero puede ir disminuyendo cuando estas son mayores de tres semanas. En este estudio las hojas tenían 60, 90 y 120 días de edad, contados a partir del trasplante, lo cual explica porque la composición cualitativa del mismo difirió con lo reportado en otros estudios realizados en diferentes especies de menta (Misra y Srivastava 2000; Rohloff *et al.*, 2005) para rendimiento de mentol, quienes reportan rendimientos de 3.6 % y 40 %. Sin embargo, Zheljazkov *et al.* (2010), indican que se obtienen mayores rendimientos en el contenido y composición de aceites cuando las plantas comienzan a formar yemas florares y en floración.

2.4. Conclusiones

La fertilización inorgánica y la edad de la planta determinaron el rendimiento de biomasa siendo mayor a los 90 días después del trasplante. La fuente de fertilización y las condiciones de cultivo no modifican el rendimiento de aceite esencial. Las condiciones del cultivo manejadas en este experimento no tienen efecto significativo en la composición del aceite esencial de menta.

2.5. Literatura citada

Alcántar G. G., M. Sandoval V. 1999. Manual de Análisis Químico de Tejido Vegetal. Guía de muestreo, preparación, análisis e interpretación. Publicación especial 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Chapingo, México. 155 p.

Arzani A., H. Zeinadi and K. Razmjo. 2007. Iron and magnesium concentrations of mint accessions (*Mentha spp.*). *Plant Physiology and Biochemistry*. 45: 323-329.

Baser H. K. and F. Demirci. 2007. Chemistry of essential oils. *In: Flavours and fragrances*. Berger R. G. (Ed.) Springer. Berlin, 648 p.

Bojorquez F. 2006. Tendencias orgánicas. *Productores de Hortalizas* 1: 82-84

Borlina M. N., O. Alves B., M. Ortiz M. M., N. Prado G. and Q. A. Camargo C. 2001. Essential oil production and quality of *Mentha Arvensis* L. grown in nutrient solutions. *Acta Horticulturae*. 548:181-187.

Cases C. M. A. 2007. Las plantas aromáticas y medicinales. Descripción de las especies fundamentales y principios activos. *In: Jornadas Técnicas Dedicadas a las Plantas Aromáticas y Medicinales*. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Guadalajara, España 18-20 Enero. pp:11-18.

Chauhan R. S., M. K. Kaul, A. K. Shahi, A. Kumar, .G Ram and A. Tawa 2009. Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. accession [III(J)26] from North West Himalayan region India. *Industrial Crops and Products* 29:654-656.

Craker L. E. 1999. Trends in medicinal and aromatic plant production in the United States. *Acta Horticulturae* 502:71-75.

Figueiredo A. C., J. G. Barroso, L. G. Pedro and J. J. C. Scheffer. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 23:213-226.

Dorman H. J. D., M. Kosar, K. Kahlos, Y. Holm and R. Hiltunen. 2003. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 4563-4569

Jeliazkova E. A., V. D. Zheljzkov, L. E. Craker, B. Yankov and T. Georgieva. 1999. NPK fertilizer and yields of peppermint, *Mentha x piperita*. *Acta Horticulturae*. 502:231-237.

Lamsfus C., B. Lasa, P. M. Aparicio y T. I. Irigoyen. 2003. Aplicaciones ecofisiológicas y agronómicas de la nutrición nitrogenada. *In: la ecofisiología vegetal*. M. J. Reigosa, N. Pedrol y A. Sanchez (coordinadores). Thompson. pp.371-411.

Mairapeytan S. K., A. H. Tadevoisan, S. S. Alexanya, and B. T. Stepanyan. 1999. Optimization of the N:P:K ratio in the nutrient medium of some soilless aromatic and medicinal plants. *Acta Horticulturae* 502: 29-32.

- McConkey M. E., J. Gerhenson and R. B. Croteau. 2000. Developmental regulation of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiology* 122: 215-223.
- Misra A. and N. K. Srivastava. 2000. Influence of water stress on japanese mint. *Journal of Herb, Spices and Medicinal Plants* 7(1):51-58.
- Misra A., S. Dwivedi, A. K. Srivastava, D. K. Tewari, A. Khan y R. Kumar. 2006. Low iron stress nutrition for evaluation of Fe-efficient genotype physiology, photosynthesis and essential monoterpene oil(s) yield of *Ocimum sanctum*. *Photosynthetica* 44(3):474-477.
- Naghdi Badi H., D. Yazdani, A. S. Mohammad and F. Nazari. 2004. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products* 19:231-236.
- Nakano A., Y. Uehara and A. Yamauchi. 2003. Effect of organic and inorganic fertigation on yields, $\delta^{15}\text{N}$ values, and $\delta^{13}\text{C}$ values of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. Cv. Saturn). *Plant and Soil* 255:343-349.
- Rohloff J., S. Dragland, R. Mordal and T. H. Iversen. 2005. Effect of harvest time and drying method on biomass production, essential oil yield and quality of peppermint (*Mentha x piperita* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:4143-4148.
- SAS Institute. 1999. Statistical Analysis System. Release 8.1. Cary NC. USA.
- Steiner A. A. 1984. The universal nutrient solution. Proceeding sixth international congress on soilless culture. Wageningen, The Netherlands. pp. 633-650
- Wagner H. and S. Bladt. 1996. *Plant Drug Analysis*. Springer Verlag. Berlin. 384 p.
- Yadegarinia D., L. Gachkar, M. Bagher R., M. Taghizadeh, S. Alipoor A. and I. Rasooli. 2006. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry*. 67:1249-1255.
- Zamorano U. J. y H. Ríos S. 2004. Importancia y perspectiva de los productos no tradicionales. *Claridades Agropecuarias* 132:3-19.
- Zengin M., M. M. Özcan, Ü. Çetin and SGezgin. 2008. Mineral contents of some aromatic plants, their growth soils and infusions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88:581-589.
- Zheljazkov V. and A. Margina. 1996. Effect of increasing doses of fertilizer application on quantitative and qualitative characters of mint. *Acta Horticulturae*. 426:579-592.
- Zheljazkov V. D., C. L. Cantrell, T. Astatkie and M. W. Ebelhar. 2010. *Agronomy Journal*. 102:124-128.

CAPITULO III. FERTILIZACIÓN ORGÁNICA E INORGÁNICA EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ACEITES ESENCIALES EN TOMILLO

(Thymus vulgaris L.)

ORGANIC AND INORGANIC FERTILIZING FOR PRODUCTION OF THYME

(Thymus vulgaris L.) BIOMASS AND ESSENTIAL OILS

Resumen

En la producción de plantas aromáticas, la fertilización es uno de los factores que modifican el rendimiento de biomasa y la composición de metabolitos secundarios de importancia económica. El objetivo de este trabajo fue comparar la producción de biomasa y calidad de aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris L.*) en función de los días a cosecha (DC) y la fuente de fertilización (FF). El experimento se estableció en invernadero el ciclo primavera-verano del 2007, utilizando una variedad comercial de tomillo. El diseño experimental fue de bloques completos al azar con cinco repeticiones, con un arreglo factorial 3^2 . Los días a cosecha fueron 60, 90 y 120. La fertilización orgánica fue con aplicaciones de ácidos húmicos en el riego y agregando un fertilizante líquido combinado con aminoácidos biosintéticos y para la fertilización inorgánica se utilizó la solución Steiner al 75 %. Se evaluó la altura de planta, biomasa fresca y seca de la planta y diámetro de tallo principal. Se registro el rendimiento total de aceites esenciales, así como la concentración ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de timol y carvacrol. La comparación cualitativa y cuantitativa se realizó por cromatografía de capa fina (CCF) y de gases-espectrofotometría de masas (GC-MS) respectivamente. Los resultados mostraron que la fertilización inorgánica y los días a la cosecha influyeron positivamente ($p \leq 0.05$) en todos los caracteres morfológicos evaluados, pero no presentaron diferencias en el rendimiento total de aceite esencial. La fertilización inorgánica

incremento el contenido de timol y carvacrol a los 90 DC. En general el cultivo de tomillo respondió mejor a este tipo de fertilización que a los tratamientos orgánicos.

Palabras clave: Plantas aromáticas, agricultura protegida, *Thymus vulgaris* L.

Abstract

In aromatic plants, the fertilization is one factor that modified the biomass yield and secondary metabolites composition of economic importance. The goal of this work was compared the biomass production and essential oils quality of thyme (*Thymus vulgaris* L.) in function of harvest days (HD) and fertilization source (FS). A experiment was established in the spring-summer season 2007, with a commercial variety of thyme. A randomized complete block design with five replications was used and factorial arrangement 3². The days to harvest were 60, 90 and 120. Organic fertilization was humic acid applications in irrigation and adding a liquid fertilizer in combination with biosynthetic aminoacids, the Steiner solution was used at 75 % as inorganic treatment. Plant height, fresh and dry biomass of the plant, and main stem diameter were recorded. The qualitative and quantitative comparisons were performed by thin layer chromatography (TLC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) respectively. The results showed that inorganic fertilization and days to harvest have a positive influence ($p \leq 0.05$) in all morphological characters evaluated, but did not differ in total yield of essential oils. The inorganic fertilization increased the content of thymol and carvacrol at 90 HD. In general the cultivation of thyme responded better to this type of fertilizer that inorganic treatments.

Keywords: aromatic plants, protected agriculture, *Thymus vulgaris* L.

3.1. Introducción

Los consumidores demandan alta calidad y seguridad en los alimentos (Nakano *et al.*, 2003), lo que ha incrementado el interés por los cultivos orgánicos y el uso de productos naturales. De ahí la demanda y la importancia económica de las hierbas aromáticas (Masarovičová y Král'ová, 2007). Estas hierbas son cultivadas por producir sustancias activas como los aceites esenciales y otros componentes de importancia fitoquímica como flavonoides (Meneses-Reyes *et al.*, 2008), antioxidantes y compuestos fenólicos (Chizzola *et al.*, 2008), que poseen propiedades farmacéuticas (Craker, 1999); además tienen amplios usos como saborizantes, conservadores de los alimentos y ambientadores (Udagawa, 1995; Craker, 1999). Los factores que afectan la producción de biomasa y la acumulación de aceites volátiles en las especies aromática son: el genotipo y las condiciones agronómicas (McConkey *et al.*, 2000), ambientales y de variación geográfica (Figueiredo *et al.*, 2008), así como la época de cosecha, la edad de la planta y la densidad del cultivo (Kaloustian *et al.*, 2005).

En México, la producción orgánica de plantas aromáticas y medicinales es incipiente, a pesar de que están incluidas en la categoría de productos orgánicos de exportación, destacan la albahaca, árnica, manzanilla, menta, orégano, romero, sábila, valeriana, y damiana entre otras (Bojorquez, 2006). Tradicionalmente la oferta principal de las plantas aromáticas y medicinales había sido de recolección; sin embargo, la demanda de estas hierbas ha aumentado y como la recolección no es suficiente (Craker, 1999), es necesario desarrollar otros sistemas de producción como la agricultura protegida.

El tomillo (*Thymus vulgaris* L.) pertenece a la familia *Lamiaceae*, y es un arbusto enano perenne (Omidbaigi y Arjmandi, 2002) cuya parte útil son las hojas y tallos (Naghdi Badi *et al.*, 2004), de donde se extraen aceites esenciales. Estos aceites pueden ser usados en la industria

farmacéutica por sus propiedades medicinales y tienen gran demanda en la preparación de alimentos por sus aplicaciones culinarias y su uso en licores (Chizzola *et al.*, 2008). En agricultura la determinación de los componentes activos de un aceite esencial son necesarios para determinar parámetros de mejoramiento, cultivo y producción de plantas aromáticas (Ritcher y Schellenberg, 2007), ya que en algunas especies de *Thymus*, el timol y el carvacrol, representan del 38.6-74.7 % y del 3.6-33.9 % respectivamente (Nickabar *et al.*, 2005) del total de los componentes y en *Thymus vulgaris* se ha reportado que contiene entre 40.20 % de timol y 6.8 % de carvacrol (Golmakani y Rezaei, 2008).

La demanda nutrimental de las plantas varía con la etapa de crecimiento, los factores ambientales y los factores genéticos (Arzani *et al.*, 2007), por lo que la fertilización es un factor determinante en las características cuantitativas y cualitativas de las plantas aromáticas (Nagdhi Badi *et al.*, 2004). En estos cultivos la fertilización orgánica se ha evaluado con compostas (Scheffer *et al.*, 1993), y pollinaza, que ha aumentado el crecimiento vegetal, el rendimiento de frutos y porcentaje de aceite (Mohamed y Abdum, 2004); también en tomate, la aplicación de ácidos húmicos ha promovido el crecimiento y desarrollo de las plantas (Böhne y Hoang, 1997).

El objetivo del presente trabajo fue comparar la producción de biomasa, el rendimiento y cantidad de timol y carvacrol en aceite esencial de tomillo, en función de los días a la cosecha y la fuente de fertilización del cultivo.

3.2. Materiales y métodos

La investigación se realizó en un invernadero tipo túnel en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México ubicado a 19° 29' N y 98° 53' O y altitud de 2 250 m. Se utilizó semilla comercial de *Thymus vulgaris*. Para obtener plántulas destinadas a la fertilización

orgánica se usaron recipientes de poliestireno de 200 cavidades, turba como sustrato y se sembraron dos semillas por cavidad. El riego se hizo a diario y se mantuvieron en invernadero. A partir de la emergencia de las primeras hojas verdaderas se hicieron aplicaciones foliares con miel de abeja al 2 % cada cinco días (d) hasta el trasplante. Para las plántulas destinadas a fertilización inorgánica se prepararon los almácigos utilizando como sustrato tezontle (diámetro de partícula entre 0.2 y 0.3 cm). Una vez emergida la plántula se aplicó solución Steiner a una concentración de 25 % cada 5 d hasta el trasplante (Steiner, 1984), que se realizó 30 d después de la emergencia. Las plántulas se colocaron en bolsas de polietileno negro (20 X 20 cm); para la fertilización orgánica se usó una mezcla de suelo, composta y agrolita (50:30:20) con las características físico-químicas siguientes: densidad aparente de 0.436 g.cm^{-3} ; 20 % de materia orgánica; pH de 6.9; 0.59 % de N total; 264 mg.kg^{-1} de P; $11.12 \text{ cmol}_{(+)}\text{kg}^{-1}$ de K; $5.08 \text{ cmol}_{(+)}\text{kg}^{-1}$ de Ca; $4.44 \text{ cmol}_{(+)}\text{kg}^{-1}$ de Mg; $2.16 \text{ cmol}_{(+)}\text{kg}^{-1}$ de Na. En el tratamiento con fertilización inorgánica se usó tezontle rojo con granulometría de 0.3 a 0.7 cm.

Se utilizó un diseño de bloques al azar con cinco repeticiones, con arreglo factorial 3^2 de tratamientos; la unidad experimental fue de 16 plantas. Los factores fueron días a la cosecha: 60, 90 y 120, y fuentes de fertilización: Orgánica I (riego con ácidos húmicos de Humathed 50060[®] al 1 %) cada 8 d, Orgánica II (riego con un fertilizante líquido Nutripro Forte[®] de origen orgánico al 1 % cada 8 d y aspersiones foliares de Aminofit Xtra[®]) cada 15 d; e Inorgánica (solución nutritiva Steiner (SS) al 75 %).

En cada fecha de muestreo se evaluó la altura de planta (AP), la biomasa fresca de la parte aérea (BFPA) y raíz (BFR), en cada repetición se cortaron cuatro plantas, se lavaron y se separaron en parte aérea y raíz. También se midió el diámetro del tallo principal (DT) con un vernier digital, registrándose el promedio como dato. El material se secó en un horno a 70° C ,

durante 72 h para obtener la biomasa seca de la parte aérea (BSPA) y de la raíz (BSR). El análisis nutrimental fue realizado de acuerdo con lo señalado por Alcántar y Sandoval (1999). Con los resultados de concentración de nutrimentos y con el rendimiento de materia seca se calculó la extracción de nutrimentos.

Para la extracción de los aceites esenciales se utilizó la técnica de destilación simple por arrastre de vapor. De 50 g de material vegetal fresco se recolectaron 150 mL del destilado al cual se le hicieron tres extracciones con 50 mL de diclorometano cada una. En un embudo de separación se obtuvo la fase orgánica (Cl_2CH_2), para remover el agua de esta fase se usó sulfato de sodio anhidro; el disolvente se recuperó usando un rotaevaporador y el rendimiento de aceite esencial se obtuvo por diferencias de peso. Los aceites se almacenaron en frascos tipo vial de 5 mL y se conservaron en refrigeración hasta su análisis.

La caracterización de los componentes fue mediante el uso de cromatografía de capa fina usando placas de 20 X 20 cm de sílica gel 60 F₂₅₄ con base de aluminio, las cuales se preparan trazando la línea base y el frente del disolvente; se utilizaron 3 µL de aceite esencial por muestra. Las placas se introdujeron en una cámara de elusión que contenía una mezcla de tolueno:acetato de etilo (v:v, 93:7), fueron asperjadas con el revelador vainillina-ácido sulfúrico y se calentaron a 110 °C por 5 min para desarrollar color (Wagner y Bladt, 1996). El análisis cuantitativo se realizó mediante la técnica de CG-EM usando un equipo Hewlett Packard 5973 con una columna capilar HP5MS 5% Fenil Metil Siloxano de 30 mX 250 µm X 0.25 µm. La temperatura inicial fue 60 °C durante 2 min aumentando 4 °C min⁻¹; la temperatura final fue 250 °C por 1 min, el puerto de inyección se encontraba a 250 °C, el flujo del gas helio fue 1.5 mL.min⁻¹; el cuádrupolo se mantuvo a 230 °C y el voltaje a 1388 mV. La cuantificación de los componentes se realizó por medio de los tiempos de retención que fueron confirmados con estándares externos

de timol y carvacrol de Sigma Aldrich Co[®]. Las soluciones estándar que fueron inyectadas en forma manual al CG-EM fueron preparadas usando dos soluciones stock de las cuales se hicieron diluciones de 0.5, 1, 2, 5, 10 y 20 µg.mL⁻¹ para determinar aéreas bajo la curva y obtener el método lineal en el equipo, mediante el cual se calculó la concentración de timol y carvacrol de las muestras de forma automática. Se utilizó SAS (1999), para realizar el análisis de varianza y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

3.3. Resultados y discusión

La plántulas emergieron a los dos días de siembra, y se trasplantaron a los 30 d cuando tenían una altura promedio de 4.5 cm. Las plántulas no presentaron diferencias morfológicas por tratamiento. Una vez establecidas en las bolsas, el desarrollo vegetativo fue rápido. Los días a la cosecha y la fuente de fertilización (Cuadro 1) tuvieron influencia altamente significativa ($p \leq 0.05$) en el desarrollo de los caracteres morfológicos evaluados, excepto para el diámetro de tallo que fue significativo.

Cuadro 1. Análisis de varianza para las variables morfológicas medidas durante el ciclo de cultivo de tomillo (*Thymus vulgaris L.*).

Fuente de variación	de GL ^{GL}	AP ^{AP}	BFPA ^{BFPA}	BFR ^{BFR}	DT ^{DT}	BSPA ^{BSPA}	BSR ^{BSR}
DC ^{DC}	2	**	**	**	*	**	**
FF ^{FF}	2	**	**	**	*	**	**
DC X FF ^{DC X FF}	4	*	**	ns	ns	**	**
CME ^{CME}		3.13	84.10	153.88	0.59	11.98	24.38

[†]DC: días a la cosecha; [¶]FF: fuente de fertilización; [§]FF X DC: interacción fuente de fertilización por días a la cosecha; ^pCME: cuadrado medio del error; ^{GL}GL: grados de libertad; ** altamente significativo; * significativo ($p \leq .05$); ns: no significativo; ^{††}AP: altura de planta; ^{¶¶}BFPA: biomasa fresca de parte aérea; ^{§§}BFR: biomasa fresca de raíz; ^{pp}DT: diámetro de tallo; ^{xxx}BSPA: biomasa seca de parte aérea; ^{†††}BSR: biomasa seca de raíz.

A partir del trasplante y hasta los 60 DC, las plantas desarrollaron su tallo principal y algunas ramas laterales. De los 60 a los 90 DC el tallo principal alcanzó su altura máxima (30.26 cm planta⁻¹) y diámetro de tallo (6.616 mm); las demás variables también aumentaron sus dimensiones y por lo tanto incrementó el peso de biomasa fresca y seca. A partir de esta etapa y hasta los 120 DC, las plantas desarrollaron un mayor número de ramas laterales y de raíces, que hicieron que la BFPA y la BSPA incrementaran significativamente (Cuadro 2). La fertilización inorgánica superó a la fertilización orgánica en todas las variables evaluadas, como la altura de planta que aumento en un 36.5 %, posiblemente las características físicas del sustrato también influyeron en este resultado (Adams, 2000), debido a que el tezontle es un material altamente poroso con relación a los sustratos orgánicos utilizados, en los que se pudo presentar una menor disponibilidad de oxígeno en las raíces por la compactación del suelo y la alta capacidad de retención de humedad.

Sin embargo, para los tratamientos orgánicos se observó un crecimiento homogéneo en la primera etapa, tal vez porque las plantas utilizaron las fracciones inorgánicas de los sustratos orgánicos que estuvieron disponibles para las raíces como lo señala Zaller (2007); y a la composición de los fertilizantes orgánicos que contienen además de nutrimentos, otras sustancias que estimulan y regulan el crecimiento vegetal.

Cuadro 2. Valores medios de las variables evaluadas en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris* L.). Colegio de Postgraduados, 2007.

	AP ^p (cm)	BFPA ^α	BFR ^{††}	DT ^{¶¶}	BSPA ^{§§}	BSR ^{pp}
		g.planta ⁻¹	g.planta ⁻¹	(mm)	g.planta ⁻¹	g.planta ⁻¹
DC [†]						
60	19.24c	24.83c	17.38c	4.91b	4.77c	3.08c
90	30.22a	58.51b	39.96b	6.61a	12.26b	9.63b
120	26.94b	83.75a	77.18a	5.74a	22.79a	23.00a
FF ^{¶¶}						
Orgánica 1	21.96b	25.88b	24.82b	5.30b	6.54b	4.70b
Orgánica 2	20.68b	33.84b	35.56b	5.41ab	8.44b	9.20b
Inorgánica	33.77a	107.38a	74.14a	6.09a	24.84a	21.82a
DSH [§]	1.66	8.64	11.68	0.72	3.26	4.65

Medias con letras diferentes en cada columna para cada factor son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$). [†]DC: días a la cosecha; ^{¶¶}FF: fuente de fertilización; [§]DSH: diferencia significativa honesta; ^pAP: altura de planta; ^αBFPA: biomasa fresca de parte aérea; ^{††}BFR: biomasa fresca de raíz; ^{¶¶}DT: diámetro de tallo; ^{§§}BSPA: biomasa seca de parte aérea; ^{pp}BSR: biomasa seca de raíz.

En la Figura 1, se muestra la extracción nutrimental expresada en mg.planta⁻¹ al comparar la extracción con los rendimientos en peso de biomasa fresca y seca de la parte aérea en este estudio con lo reportado por Baranauskienė *et al.* (2003) se observan similitudes con referencia a que la fertilización nitrogenada incrementó el rendimiento de biomasa fresca. Las extracciones nutrimentales presentaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos; con

excepción de la extracción de Cu, en el resto de los nutrientes la media obtenida en el tratamiento con fertilización inorgánica fue mayor al resto de los tratamientos.

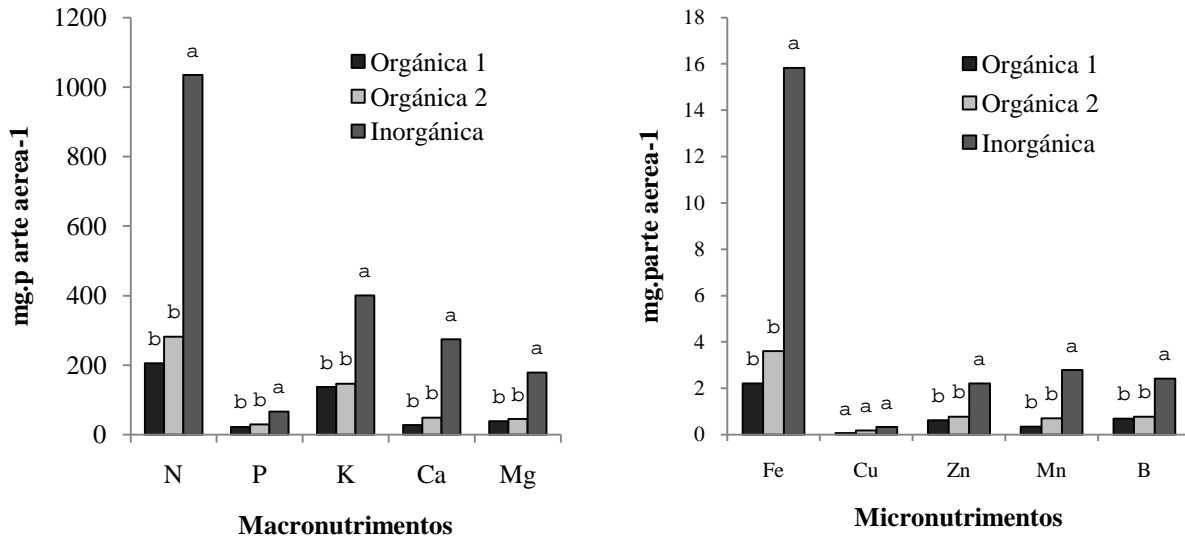


Figura 1. Extracción nutrimental (mg parte aerea⁻¹) en plantas de tomillo por efecto de la nutrición. Medias con letras iguales entre columnas para cada factor no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$).

En lo que respecta a la edad de la planta y su efecto en el contenido nutrimental en tomillo, se tiene que a los 120 ddt, se presenta la mayor extracción de N, P, K, Ca, Mg y Fe, Zn, Mn, y B, esto puede explicarse por el papel que juegan en las biomoléculas del metabolismo primario (Alcántar et al., 2007). La extracción del Cu no mostró diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$) durante todo el ciclo de cultivo (Figura 2).

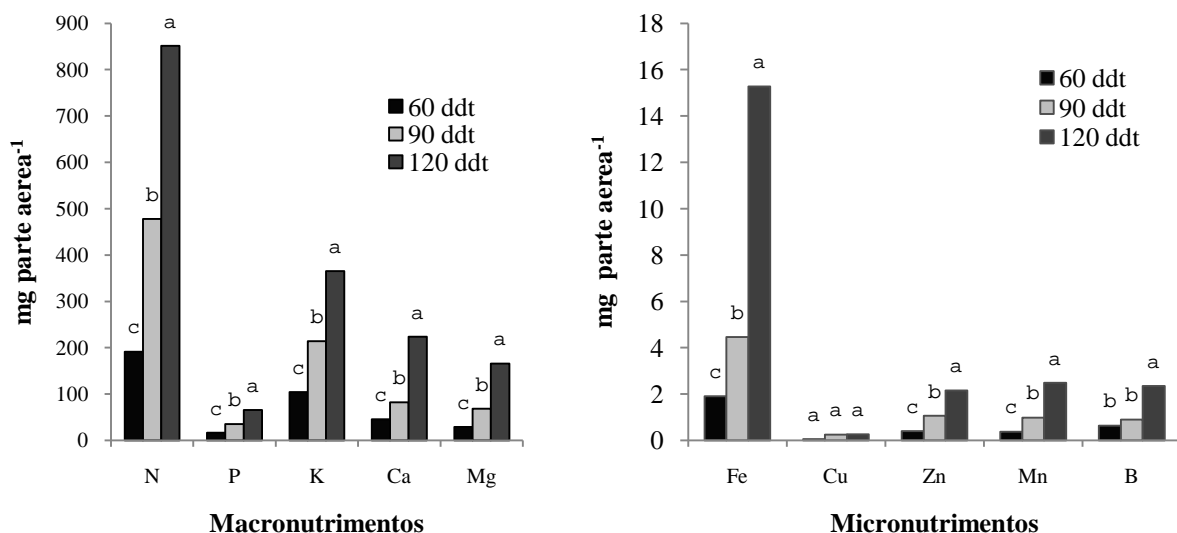


Figura 2. Extracción nutrimental (mg parte aérea⁻¹) en plantas de tomillo por efecto de la edad de la planta. Medias con letras iguales en cada subfigura, no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$).

Mediante la técnica de CCF desarrollada de acuerdo a Wagner y Bladt (1996), se identificaron entre 5 y 7 componentes del aceite esencial de tomillo (Anexo 3), entre los que destacan: el geraniol con un valor del factor de retención (Rf) de 0.21 y color azul; el linalool con un Rf de 0.29 y color azul; a un Rf de 0.51 se presentó el timol con un color rojo-violeta; y a un Rf de 0.53 se localizó el carvacrol con color rojo.

El rendimiento total de aceites esenciales obtenidos de tomillo no varió en los diferentes cortes y la fuente de fertilización (Cuadro 3). En tanto que el rendimiento de timol presentó diferencias altamente significativas ($p \leq 0.05$) por efecto de la fuente de fertilización y los días a la cosecha, resultando significativa la interacción de estos factores. El rendimiento de carvacrol mostró diferencia significativa en los factores evaluados.

Cuadro 3. Análisis de varianza para el rendimiento total de aceite esencial en tomillo (*Thymus vulgaris L.*) y sus componentes activos principales. Colegio de Postgraduados, 2007.

Fuente de variación	GL [†]	Rendimiento de aceite esencial (g)	Rendimiento de timol (µg.mL ⁻¹)	Rendimiento de carvacrol (µg.mL ⁻¹)
DC [‡]	2	ns	**	*
FF [¶]	2	ns	**	*
DC X FF [§]	4	ns	*	ns
CME ^p		0.00001	12.84	0.089

[†]DC: días a la cosecha; [¶]FF: fuente de fertilización; [§]FF X DC: interacción fuente de fertilización por días a la cosecha; ^pCME: cuadrado medio del error; [†]GL: grados de libertad; ** altamente significativo; * significativo ($p \leq .05$); ns: no significativo.

Los días a la cosecha influyeron en el contenido de timol y carvacrol, siendo a los 90 DC cuando se registró el mayor contenido de estos compuestos activos. Lo que puede indicar que bajo condiciones de invernadero se pueden obtener estos compuestos en mayor cantidad sin llegar a la etapa de floración, donde ha sido reportada de mayor producción de constituyentes volátiles (Nickabar *et al.*, 2005; Golmakani y Rezaei, 2008). El mayor contenido de timol (22.967 µg.mL⁻¹) y carvacrol (1.12 µg.mL⁻¹) se obtuvo de las plantas bajo manejo inorgánico (Cuadro 4), los cuales definen la calidad del aceite esencial en tomillo por sus propiedades farmacológicas (Oh *et al.*, 2008) y por dar el aroma característico de las especies de *Thymus* (Golmakani y Rezaei, 2008).

Cuadro 4. Efecto de la fertilización y los días a la cosecha sobre el rendimiento de aceite esencial y el contenido de timol y carvacrol en tomillo (*Thymus vulgaris* L.)

	Rendimiento de aceite esencial (g)	Rendimiento de timol ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Rendimiento de carvacrol ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
DC [†]			
60	0.0143 a	12.714 b	0.677 b
90	0.0134 a	21.627 a	1.161 a
120	0.0167 a	9.973 b	0.674 b
FF [¶]			
Orgánica 1	0.0157 a	8.927 b	0.648 b
Orgánica 2	0.0137 a	12.421 b	0.739 b
Inorgánica	0.0152 a	22.967 a	1.126 a
DSH [§]	0.0039	4.360	0.364

Medias con letras diferentes entre columnas para cada factor, son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$). [†]DC: días a la cosecha; [¶]FF: fuente de fertilización; [§]DSH: diferencia significativa honesta.

Bajo condiciones de fertilización inorgánica se puede obtener mayor rendimiento económico en términos de peso de biomasa fresca, lo que representa una mayor cantidad de aceite esencial; así como de timol y carvacrol por unidad de área, representado una ventaja con respecto a los tratamientos orgánicos.

3.4. Conclusiones

La fuente de fertilización modifica la producción de biomasa fresca y seca en plantas de tomillo, siendo la fertilización inorgánica la que favorece su desarrollo. El rendimiento total de aceites esenciales en tomillo no fue afectado por los días a cosecha y la fuente de fertilización. La calidad del aceite esencial fue mayor en el tratamiento inorgánico a los 90 DC debido a los contenidos de timol y carvacrol presentes en el extracto.

3.5. Literatura citada

Adams, P. 2000. Aspectos de nutrición mineral en cultivos sin suelo en relación al suelo. *In*: Urrestarazu G. M. Manual de cultivos sin suelo. Ediciones Mundi-Prensa, Almería, España. pp:95-104.

Alcántar G. G., M. Sandoval V. 1999. Manual de Análisis Químico de Tejido Vegetal. Guía de muestreo, preparación, análisis e interpretación. Publicación especial 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Chapingo, México. 155 p.

Arzani, A., H. Zeinadi, and K. Razmjo. 2007. Iron and magnesium concentrations of mint accessions (*Mentha spp.*). *Plant Physiol. and Biochem.* 45: 323-329.

Baranauskiene, R., P. R. Venskutonis, P. Vikellis and E. Dambrauskien. 2003. Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*) J. *Agric. Food Chem.* 51 (26): 7751-7758.

Bojorquez F. 2006. Tendencias orgánicas. *Productores de Hortalizas*, 1:82-84.

Böhne, M., and T. L. Hoang. 1997. Influence of mineral and organic treatments in the rhizosphere on the growth of tomato plants. *Acta Hort. (ISHS)*450: 161-168.

Chizzola, R., H. Michitsch and C. Franz. 2008. Antioxidative properties of *Thymus vulgaris* leaves: comparison of different extracts and essential oil chemotypes. *J. Agric. Food Chem.* 56:6897-6904.

Craker, L. E. 1999. Trends in medicinal and aromatic plant production in the United States. *Acta Hort. (ISHS)* 502: 71-75.

Figueiredo, A. C., J. G. Barroso, L. G. Pedro and J. J. C. Scheffer. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Frag. J.* 23:213-226.

- Golmakani, M. T. and K. Rezaei. 2008. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of the essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chem.* 109: 925-930.
- Kaloustian, J., L. Abou, C. Mikail, M. J. Amiot and H. Portugal. 2005. Southern French thyme oils chromatographic study of chemotype. *J. Sci. Food Agric.* 85 (14):2437-2444.
- Masarovičová, E. and K. Král'ová, 2007. Medicinal plants: past, nowadays, future. *Acta Hort. (ISHS)* 749: 19-27.
- McConkey, M. E., J. Gerhenzon and R. B. Croteau. 2000. Developmental regulation of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiol.* 122:215-223.
- Meneses-Reyes J. C., R. M. Soto-Hernández, T. Espinosa-Solares y Ramírez-Guzmán, M. E. 2008. Optimización del proceso de extracción de flavonoides de flor de Manzanilla (*Matricaria recutita* L.). *Agrociencia* 42: 425-433.
- Mohamed, M. and A. A. Abdum. 2004. Growth and oil production of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill): effect of irrigation and organic fertilization. *Biol. Agric. Hortic.* 22 (1):31-39.
- Naghdi Badi, H., D. Yazdani, A. S. Mohammad and F. Nazari. 2004. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Ind. Crops Prod.* 19: 231-236.
- Nakano, A., Y. Uehara and A. Yamauchi. 2003. Effect of organic and inorganic fertigation on yields, $\delta^{15}\text{N}$ values, and $\delta^{13}\text{C}$ values of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. Cv. Saturn). *Plant and Soil* 255:343-349.
- Nickabar B., F. Mojab and R. Dolat-Abadi. 2005. Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. *Food Chem.* 90: 609-611.
- Oh, S. Y., J. W. Ko, S. Y. Jeong and J. Hong. 2008. Application and exploration of fast gas chromatography-surface acoustic wave sensor to the analysis of *Thymus* species. *J. Chromatog. A.* 1205:117-127.
- Omidbaigi, R. and A. Arjmandi. 2002. Effects of NP supply on growth, development, yield and active substances of garden thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Acta Hort.* 576: 263-265.
- Ritcher, J. and I. Schellenberg. 2007. Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of solid-phase microextraction/gas chromatography. *Anal Bioanal Chem.* 387:2207-2217.
- SAS Institute. 1999. Statistical Analysis System. Release 8.1. Cary NC. USA.
- Scheffer, M. C., P. Ronzelli and H. S. Koehler. 1993. Influence of organic fertilization on the biomass, yield and composition of the essential oil of *Achillea millefolium* L. *Acta Hort. (ISHS)* 331:109-114.
- Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution. Proceeding sixth international congress on soilless culture. Wageningen, The Netherlands. pp. 633-650

Udagawa Y. 1995. Some responses of dill (*Anethum graveolens*) and thyme (*Thymus vulgaris*) grown in hydroponic, to the concentration of nutrient solution. Acta Hort. (ISHS) 396: 203-207.

Wagner, H., and S. Bladt. 1996. Plant Drug Analysis. Springer Verlag. Berlin. 384 p.

Zaller, G. J. 2007. Vermicompost as a substitute for peat in potting media: effects on germination biomass allocation, yields and fruit quality of three tomato varieties. Sci. Hort. 112: 191-199.

**CAPITULO IV. HUMIC SUBSTANCES AND MOISTURE CONTENT ON THE
BIOMASS PRODUCTION AND BIOACTIVE CONSTITUENTS OF *Thymus vulgaris* L.
SUSTANCIAS HUMICAS Y CONTENIDO DE HUMEDAD EN LA PRODUCCION DE
BIOMASA Y COMPUESTOS BIOACTIVOS DE *Thymus vulgaris* L.**

Abstract

Thyme (*Thymus vulgaris*) is an aromatic and medicinal plant with antioxidant, antimicrobial and antifungal properties considering of interest in pharmacology and food industry. Humic substances (HS) are a natural product that increase biochemical interactions, and have beneficial effects on soil and growth plant. But it is unknown whether can be improving the yield and composition of bioactive constituents in thyme. To test the effect of these substances, thyme seedlings were obtained from seeds of *Thymus vulgaris* growing under different doses of HS from a commercial product (HumiSolve USA[®] and TM-7USA[®]) 100, 200, 300 and 400 mg.L⁻¹. Thyme plants were grown using three moisture levels 20, 40, 60 percent of field capacity. Changes in plant growth were determined in terms of height of plant, fresh and dry matter. The bioactive constituents were determined in terms of yield and composition of essential oils (Clevenger distillation and GC methods), antioxidant activity, total phenolic content and flavonoids were determined by spectrophotometer techniques. Morphological variables showed significant differences ($p \leq 0.05$) among source variation, except to the fresh weight of aerial part. The essential oil yield and composition were dependent of moisture percent and HS supplied. In general, the antioxidant activity, total phenol content and total flavonoids were modified by water content and HS levels supplied.

Keywords: humic acids, fulvic acids, essential oils, antioxidant activity, total phenolic content, flavonoides

Resumen

El tomillo (*Thymus vulgaris*) es una planta aromática y medicinal con propiedades antioxidantes, antimicrobiales y antifúngicas consideradas de interés en la industria farmacológica y alimentaria. Las sustancias húmicas (SH) son un producto natural que incrementa las interacciones bioquímicas. Tienen efectos benéficos en el suelo y el crecimiento de las plantas. Pero se desconoce si pueden incrementar el rendimiento y la composición de los constituyentes bioactivos en tomillo. Para probar el efecto de estas sustancias, plántulas de tomillo fueron obtenidas a partir de semillas de *Thymus vulgaris* cultivadas bajo diferentes dosis de SH de productos comerciales (HumiSolve USA[®] and TM-7USA[®]) 100, 200, 300 y 400 mg L⁻¹. Las plantas de tomillo se cultivaron usando tres niveles de humedad 20, 40 y 60 por ciento de capacidad de campo. Cambios en el crecimiento fueron determinados como altura de planta, peso en fresco y seco de la parte aérea. Los constituyentes bioactivos fueron determinados como rendimiento y composición de aceites esenciales (destilación en aparato Clevenger y métodos de cromatografía de gases), la actividad antioxidante, el contenido total de fenoles y flavonoides fueron determinados mediante técnicas espectrofotométricas. Las variables morfológicas mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre la fuente de variación, excepto para el peso en fresco de la parte aérea. El rendimiento del aceite esencial y su composición fueron dependientes del porcentaje de humedad y la dosis de SH aplicada. En general, la actividad antioxidante, el contenido total de fenoles y flavonoides fueron modificados por el contenido de humedad y la dosis de SH.

Palabras clave: ácidos húmicos, ácidos fulvicos, aceite esencial, actividad antioxidante, contenido total de fenoles y flavonoides.

4.1. Introduction

The genus *Thymus* belongs to the family of *Labiatae* and includes many species. *Thymus vulgaris* is a small woody shrub 10-30 cm tall aromatic plant native to the Mediterranean Region, which is characterized by great chemical intraespecific variability among plants (Bozin *et al.*, 2006; Figueiredo *et al.*, 2008). It is used to add a distinctive aroma and flavor to food. The leaves can be used fresh or dried as a spice (Lee *et al.*, 2004). The essential oils rich in phenolic compounds possess a wide range of biological and pharmacological activities (Bozin *et al.*, 2006) such as antiseptic, carminative, antimicrobial and antioxidative properties (Baranauskiene *et al.*, 2003; Burt 2004; Nejad Ebrahimi *et al.*, 2008). The content of essential oils and its composition in thyme depend on different factors such as chemotype, biotype and cultivation conditions (Figueiredo *et al.*, 2008).

Several works indicate that the humic substances (HS) used on plant nutrition, show enhance root, leaf, shoot growth and fruit yield (Chen *et al.*, 2004, Siminis *et al.*, 1998). These positive effects are explained by the direct interaction of humic substances with physiological and metabolism processes (Eyheraguibel *et al.*, 2008). Their effects appear to be exerted on cell membrane functions, promoting nutrient uptake or plant growth and development, because of acting as hormone-like substances (Nardi *et al.*, 2002). Literature documents the increase of yield of vegetables, root crops, flowers and cereals (Nikbaht *et al.*, 2008). Among other effects drought conditions can limit photosynthesis in plants and alter the nutrient uptake decreased the secondary metabolites production (Figueiredo *et al.*, 2008). Therefore, the purpose of this study

was to determine the biomass production and bioactive constituents in function of humic substances and soil moisture percent.

4.2. Materials and methods

This study was conducted in winter season 2009 in a greenhouse of Medicinal and Aromatic Plants of the University of Massachusetts, Amherst, MA. located at 42.37° Latitude North and at 72.53° Longitude West. The average temperature and daylight of greenhouse during the experiment were 20°C and 10 h, respectively.

The plants of thyme (*Thymus vulgaris* L.) were obtained from seeds of the company Botanical interest® (USA), growing under different doses of humic substances (HS1:100; HS2: 200, HS3: 300 and HS4: 400 mg.L⁻¹). The humic substances were obtained from a commercial product HumiSolve USA® (humic acids 57%) and TM-7USA® (fulvic acids 10.5% derived from frees water cretaceous humate deposits, soluble potash 3.7%; sulfur 5%; copper 0.31%; iron: 1.2%; boron 0.37%, manganese 1.2%; cobalt 0.05%; molybdenum 0.1%, zinc 1%). The HS were added during experiment time at the beginning of each week. The substrate used was Farfad 3B MIX® with the following characteristics: pH range: 5.5-6.5 after wetting, and contents: Canadian sphagnum 45%; perlite 15%; vermiculite: 15% and starter nutrients, wetting agents, dolomitic limestone. Thyme plants grown using three moisture levels M1: 20; M2: 40, and M3: 60 percent of field capacity. The substrate moisture content was measured by gravimetric method (Sanchez-Blanco *et al.*, 2008). Water consumption was monitored throughout the experimental period and was determined from the difference in weights in pots without plants each three days. A factorial experiment with completely randomized design with three replications was used.

Plant height: was determined by measuring the plants each week until the crop was harvested, when the plants has 60 days after the transplant. The biomass fresh was weight in an analytical balance (Mettler Toledo[®] PL303) and then the samples were placed in an oven at 70 until it reached a constant weight to determine dry weight. The other plant material was harvested and stored at -20 °C until hydrodistillation.

Aluminum Chloride was from Acros; caffeic acid, carvacrol, linalool, quercetin, thymol, sodium carbonate, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH); 3-octanol; 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox); α -pinene; (+)-limonene; (-)-Thujone, were obtained from Sigma-Aldrich. Sodium hydroxide (E. M. Science); Folin Ciocalteu Reagent, Ether and Methanol were from Fisher Scientific, sodium nitrite (J. T. Baker) and ethanol (Pharmco Products).

Ten grams of the aerial parts of fresh material were steam distilled in a Clevenger apparatus type during 2 h began start the boiling. The oil volume was measured directly in the extraction burette. Samples were stored in vial flasks and kept at 4°C until gas chromatography analysis. The volatile components from essential oils were analyzed in Shimadzu GC-2014[®] Gas Chromatograph with flame ionization detector (FID). A capillary column (30m X 0.25 mm inner diameter and 0.25 μ m film thickness) was used for the separation of individual components. Helium was employed as a carrier gas with a flow rate 1ml/min. Temperature was programmed from 75 to 200 ° C with a ramp rate of 4°C with a final time of 5 min. the injector and detector were maintained at 200 and 220°C, respectively. The sample (1 μ L) was injected with 5 split ratio with an autoinjector Shimadzu AOC-20i[®]. The individual peaks were identified from the retention time compared with those of standards.

The antioxidant activity index, total phenolic content and total flavonoid were measured in fresh material and are based on colorimetric reactions which were measured with a HACH DR/2000 Spectrophotometer. All analytical analysis were performed three times. Samples were prepared according to Chizzola *et al.* (2008) and Nourhene *et al.* (2009); using ethanol 60 % of concentration; 2 g of fresh/dry material was treated with 15 ml of solvent, and extraction was done at low temperature for 24 h. The extract solution was filtered and stored at -20 °C until analysis.

Antioxidant activity by DPPH method. This activity was determined using a procedure described by Chizzola *et al.* (2008) and Scherer and Texeira. (2009). The test was based on the ability of the antioxidant to give hydrogen radical. To 400 µL of the ethanolic samples was adjusted to 1 ml with 50% methanol and add 1 mL of DPPH (7.5 mg/50 ml of methanol). After 30 min in the dark at room temperature the absorbance was measured against the blank at 517 nm. A sample of 2.5 mM of Trolox in methanol was used as a reference substance. The blank was a solution containing 500 µL of trolox and 500 µL of methanol reacted with 1 mL of DPPH reagent to obtain a complete decoloration of the radical. The results are expressed as percentage of DPPH inhibition according to the following formula: % DPPH I= $[(Abs_c - Abs_s) / Abs_c] \times 100$, where Abs_c is the value of control absorbance and Abs_s is the value of sample absorbance. Lower absorbance of the reaction mixture indicated higher free radical scavenging activity.

The total phenolic content was determined by Folin Ciocalteu Method, according to (Chizzola *et al.*, 2008)) with some modifications. Using the following reagents: Caffeic acid, Folin Ciocalteu Reagent, Sodium Carbonate, ethanol. 0.5 ml of the ethanolic extract adds 1 ml of 95 percent ethanol and 5 ml of distilled water. Add 0.5 ml of Folin Ciocalteu Reagent diluted with distilled water 1:10; after 5 minutes add 1 ml of 5% sodium carbonate solution in water and mix

the samples and keep 30 minutes in the dark. The absorption was read at 725 nm. The blank was prepared by the same method using ethanol. Calibration curve is preparing use different concentrations (25-150 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of caffeic acid in ethanol. A calibration line with the correlation coefficient $R^2=0.989$. Total content of phenolic compounds in extract was expressed in μg of caffeic acid equivalents (CAE) per each 100 g of fresh plant material (FPM).

The content of flavonoid was measuring according to Socha *et al* (2009). To 1 ml of extract solution were added 5 ml of distilled water and 0.3 mL of sodium nitrite with 5 % of concentration. Then 0.3 ml of 4 % aluminium chloride solution was added. After 5 minutes 2 mL of 1M NAOH was added and the total was made up to 10 mL with distilled water. The solution was mixed and the absorbance was measured immediately with spectrophotometer against prepared the blank at 510 nm. The blank was prepared by the same procedure using ethanol. The total flavonoid content was calculated on the basis of standard curve of quercetin solutions between 25-150 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A calibration line with the correlation coefficient $R^2=0.988$. The results were expressed in μg of quercetin equivalents (QE) per 100 g of fresh plant material (FPM). The experimental data were statically analyzed by ANOVA. Estimation of the significance of differences between means was based on a Tukey test ($\alpha=0.05$).

4.3. Results and discussion

No visual differences of appearance or color were observed with the use of humic substances on the crop. Nevertheless, statistical differences ($p < 0.05$) were observed among morphological variables, except to the fresh weight of aerial part by the effect of the moisture percent, and their interaction with HS (Table 1).

Table 1. Analysis of variance for morphological variables evaluated at 60 days after transplanting in *Thymus vulgaris* L. University of Massachusetts, 2009.

Source of variation	DF [†]	HP ^{††}	FWAP [¶]	DWAP ^{¶¶}	FWR ^ξ	DWR ^{ξξ}
M % ^φ	2	*	ns	*	*	*
HS ^{φφ}	3	*	*	*	*	*
M % X HS ^{†††}	6	*	*	*	Ns	*
MEE ^{¶¶¶}		1.93	5.07	0.42	0.46	0.11

[†]DF: degree free; ^{††}HP: height of plant; [¶]FWS: fresh weight aerial part; ^{¶¶}DWAP: dry weight of aerial part; ^ξFWR: fresh weight of root; ^{ξξ}DWR: dry weight of root; ^φM %: moisture percent; ^{φφ}HS: humic substances level; ^{†††}M% X HS: moisture percent X humic substances interaction; ^{¶¶¶}MEE: mean squared error; * significant, ns: no significant ($p \leq 0.05$).

The plant height had a significant difference by effect of wet content at 40% (Table 2); and suggested that maintaining constant moisture level is important for plant growth. These results can be explained to the differential provision of water to plants influences their morphology, physiology and dry matter partitioning between roots and shoots. Exposure to deficit irrigation caused a significant decrease in height and plant weight (Sanchez Blanco *et al.*, 2008). In this study the ranged between 14.97-17.04 cm.plant⁻¹ to height plant.

Plant weight, was significantly with an increase irrigation levels. The highest values were found in 40% (M2) and 60% (M3) of water content of field capacity. In this study the ranged was between 8.78-11.15 g.plant⁻¹. Similar pattern was reported to thyme, hyssop (Khazaie *et al.*, 2008) and oregano (Azizi *et al.*, 2006); and the effect can be attributed to the availability of sufficient moisture for the root system.

Table 2. Effect of moisture content and humic substances levels on height, fresh weight in *Thymus vulgaris*. University of Massachusetts, 2009.

Source of variation	Height of plant (cm.plant ⁻¹)	Fresh weight aerial part (g.plant ⁻¹)
Moisture (%)		
20	14.97b	8.78b
40	17.04a	11.15a
60	16.22ab	11.06ab
HSD †(P=0.05)	1.426	2.31
HS [¶] level (mgL ⁻¹)		
100	16.42a	11.104a
200	16.26a	9.75a
300	16.48a	10.31a
400	15.14a	10.16a
HSD † (P= 0.05)	1.82	2.94

† HSD: Honestly Significance Difference P= 0.05; probability level at 5%; Means with the same letter are not significantly different. ¶HS: Humic substances level

To the effect of HS supply on yield of thyme were compared and it was found very similar values (g.plant⁻¹) in terms of total plant fresh weight (Table 2). As there was not significant differences in mean comparison to dry weight of aerial part, fresh and dry weight of root no were showed the results.

Essential oil yield (μL), showed significant difference ($p \leq 0.05$) in the moisture percent, as well as humic substances level, and their interaction (Table 3).

Table 3. Analysis of variance for essential oil yield in *Thymus vulgaris* L. University of Massachusetts, 2009.

Source of variation	DF [†]	Essential oil yield (μL)
M % [‡]	2	*
HS [§]	3	*
M % X HS [¶]	6	*
MEE ^{††}		12.05

[†]DF: degree free; [‡]M %: moisture percent; [§]HS: humic substances level; [¶]M% X HS: moisture percent X humic substances interaction; ^{††}MEE: mean squared error. * significant ($p \leq 0.05$).

Moisture percent had a positive effect on the yield of essential oil, being higher at 60% (Table 4). This effect can be attributed to favorable moisture conditions maintained throughout the crop growth period. In some studies on the effects of irrigation supply on different crops were found that the water supply significantly affects the yield and quality of essential oils. In this study the lowest oil yield was attributed to the moisture stress which adversely affected crop growth (Singh *et al.*, 2002). In other hand, Azizi *et al.* (2009) indicated that an optimal water supply during seedling development, stem elongation stages and a restriction of water supply after beginning of flowering may increase the content of essential oil and thus improve the quality in oregano herbage. The mean comparison showed that HS levels have not effect in the accumulation of essential oil, perhaps this effect was modified with the plant age (Khazaie *et al.* 2008). In this study the age of plants was 60 day after transplant.

Table 4. Essential oil yield in *Thymus vulgaris*. University of Massachusetts, 2009.

Source of variation	Essential oil yield (μL)
Moisture %	
20	6.50b
40	8.25ab
60	10.33a
HSD [†] (P=0.05)	3.56
HS [‡] level (mgL^{-1})	
100	9.11a
200	8.89a
300	8.44a
400	7.00a
HSD (P= 0.05)	4.54

[†] HSD: Honestly Significance Difference P= 0.05: probability level at 5%; Means with the same letter are not significantly different. [‡]HS: Humic substances level

The oils were yellow in color and had distinct sharp odor. The components identified are qualitatively similar according to retention time (RT) from external standards: β -pinene (RT: 6.615); (+)-limonene (RT: 9.492); 3-octanol (RT:15.215); (-)-thujone (RT: 16.399); linalool (RT:20.087); thymol (RT:36.310) and carvacrol (RT:36.976). The different levels in moisture percent and humic substances had a positive effect on components of essential oils (Table 5).

Table 5. Analysis of variance for the components of essential oil in *Thymus vulgaris* L. University of Massachusetts, 2009.

SV	[†] DF	β -pinene %	limonene %	3-octanol %	(-)-thujone %	Linalool %	Thymol %	Carvacrol %
M % ^{††}	2	*	**	**	**	*	ns	**
HS [¶]	3	ns	**	*	*	**	**	**
M%XHS [¶]	6	*	*	**	**	Ns	**	**
	1							
MEE [§]		2.96	0.34	1.77	1.17	1.70	2.30	0.57

[†]DF: degree free; ^{††}M %: moisture percent; [¶]HS: humic substances level; ^{¶¶}M% X HS: moisture percent X humic substances interaction; [§]MEE: mean squared error. * significant, ** high significant; ns: no significant ($p \leq 0.05$).

Quantitatively the most important compounds were thymol and carvacrol which constitute almost 72.3 % of the quantified total volatiles. Generally thymol phenolic monoterpene defines the essential oil quality because of its active pharmacological properties (Bozin *et al.*, 2006; Loziene *et al.*, 2007). Similar results have been reported by Nejad Ebrahimi *et al.* (2008) whom in *Thymus caramanicus*, during the vegetative stage were observed the lowest content of carvacrol and high amounts of thymol. The essential oil composition was dependent of moisture percent and humic substances supplied (Table 6). The moisture percent in the media growing does not affect the production of thymol, but modifies the concentration from tested components. These was higher to M3: 60. With 300 y 400 mg.L HS applied in the irrigation water increases the concentration of thymol (5.8 %) and (-)-thujone (11.4 %), while from 100 to 200 mg.L increases the concentration of carvacrol (33.8 %) and linalool (22.6 %).

Table 6. Effect of wet content and humic substances levels on components of *Thymus vulgaris* L. essential oil. University of Massachusetts, 2009.

	β -pinene %	(+)-limonene %	3-octanol %	(-)-thujone %	Linalool %	Thymol %	Carvacrol %
Moisture %							
20	6.86 ab	15.66 a	1.82 c	4.96 c	11.22 a	61.75 a	8.66 b
40	6.58 b	13.91 b	6.18 b	9.50 b	9.82 b	61.79 a	8.90 b
60	8.45 a	13.91 b	8.86 a	10.62 a	11.57 a	62.40 a	10.84 a
HSD [†] (P=0.05)	1.766	0.598	1.364	1.113	1.337	1.558	0.779
HS [‡] level							
100	7.04 b	15.54 a	6.03 a	7.96 b	12.96 a	59.60 b	10.98 a
200	9.74 a	14.93 ab	6.0 a	7.75 b	11.56 a	60.63 b	11.58 a
300	5.33 b	13.02 c	3.70 b	8.20 ab	9.53 b	63.27 a	8.26 b
400	7.08 b	14.50 b	6.76 a	9.53 a	9.43 b	64.42 a	7.03 c
HSD [†] (P= 0.05)	2.255	0.764	1.741	1.420	1.706	1.988	0.994

[‡]HS: Humic substances level [†] HSD: Honestly Significance Difference P= 0.05: probability level at 5%; Means with the same letter in each column are not significantly different.

The antioxidant activity of thyme was presented highly significant differences ($p < 0.05$) by the effect of moisture content. The total phenol content varied in the different factors and their interaction, were highly significant. The flavonoid content showed highly significant difference

for moisture content and significant for the level of humic substances and the interaction M% X HS.

Table 7. Analysis of variance for the effect of moisture percent and humic substances levels on bioactive compounds of *Thymus vulgaris* L. University of Massachusetts, 2009.

Source of variation	[†] DF	Antioxidant activity	Total phenolic content	Flavonoids
M % ^{††}	2	**	**	**
HS [¶]	3	ns	**	*
M % X HS ^{¶¶}	6	ns	**	*
MEE ^ξ		6.03	3.40	13.83

[†]DF: degree free; ^{††}M %: moisture percent; [¶]HS: humic substances level; ^{¶¶}M% X HS: moisture percent X humic substances interaction; ^ξMEE: mean squared error. * significant, ** high significant; ns: no significant (p≤0.05)

The water supply is one of the most determinative cultivation conditions which significantly affect the yield and composition of bioactive metabolites of various spices and herb crops (Azizi *et al.*, 2009; Jordan *et al.*, 2009; Sanchez-Blanco *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2002), in this case the highest Inhibition % of the free Radical DPPH were obtained at 60% of wet content, and 400 mg.L⁻¹ humic substances. Altogether, the less values of this parameter were at 20% of water content and a level of 100 mg L⁻¹ of humic substances. Nevertheless, the total antioxidant activity of DPPH determined in this study is lowest (43.43 % DPPH inhibition) than the values from 55.9 % DPPH inhibition reported by (Chizzola *et al.*, 2008), however is important considering that DPPH radical activity is influenced by the polarity of the reaction medium, chemical structure of the radical scavenger and the pH of the reaction mixture (Sharma and Bhat, 2009). Other factors such as age of plant perhaps influenced the reaction.

Table 8. Effect of wet content and humic substances levels on antioxidant activity index, total phenolic content and total flavonoid in *Thymus vulgaris L.* University of Massachusetts, 2009.

Variation source	Antioxidant Activity	Total phenolic content	Total flavonoid
	% DPPH inhibition	µg CAE/100 g	µg QE/ 100 g
Moisture %			
20	38.49c	41.00c	49.51c
40	41.17b	44.07b	57.36b
60	44.34a	45.97a	68.05a
HSD [†] (P=0.05)	2.51	1.89	3.81
HS [¶] level (mgL ⁻¹)			
100	39.23b	31.44d	57.12bc
200	41.85ab	44.06c	53.94c
300	40.84ab	47.56b	59.17b
400	43.43a	51.63a	63.00a
HSD [†] (P= 0.05)	3.21	2.41	4.86

[†] HSD: Honestly Significance Difference P= 0.05: probability level at 5%; Means with the same letter are not significantly different. [¶]HS: Humic substances level.

The contents of phenolic compounds determined for the different parameters evaluated are presented in the Table 8. The wet content showed significant differences among moisture level, ranged from 41 to 45.97 µg CAE/ 100 g in fresh plant material. The highest value was found in 60% of wet content. This trend are in agreement with data reported by Jordan *et al.* (2009), they

indicated an increase in the watering level applied favored the total phenolic content and also the radical scavenging activity of DPPH. In this regard, Strail *et al.* (2006), indicate that antioxidant activity properties of plant extracts are associated with the presence of phenolic compounds possessing the ability to donate hydrogen to reduce the DPPH radicals. Although the values are lowest than the results reported by Chizzola *et al.* (2008) that found an average value of 65.2 μg of caffeic acid/g of plant in *Thymus vulgaris* plants. The HS level affects significantly the contents of total phenolic. The highest value were found on 400 mg/L and decrease in the order HS3, HS2, HS1 while the lowest values were found for 100 mg/L with 31.44 μg CA/g.

Table 8 show different amounts of total flavonoids expressed as quercetin equivalents between variation sources. The total flavonoid content of thyme was significantly higher for M3 (60%) of wet content with a value of 68.05 μg QE/100 g of fresh matter, compared with the M1 equivalent to 20% of water content (49.51 μg QE/100g). Also was affected by the level of humic substances supplied. The data was showed high variability among levels. The lowest values were found to HS2 and HS1 in decrease order. The highest value was found to HS3 and HS4. The results on total phenolic and flavonid content highlight the role that play in providing high antioxidant activity with respect at the effect of water content. This results support previous observations (Scherer and Texeira 2009; Socha *et al.*, 2009; Strail *et al.*, 2006) that reported their relationship to the antioxidant activity.

4.4. Conclusions

An optimal water supply during vegetative stage increases the biomass yield, and may increase the essential oil yield. The humic substances can affect the yield of biomass, and modifying the concentration of timol, carvacrol, linalool and (-)thujone. A 60% water supply induce the increase in antioxidant activity, total phenolic content and total flavonoid. Humic substances

showed high variability between levels, being at 400 mg.L⁻¹ when there were higher values for antioxidant activity % DPPH, total phenol and total flavonoid contents.

4.5. References

Azizi A., F. Yan, and B. Honormeier. 2009. Herbage yield, essential oils content and composition of three oregano (*Origanum vulgare* L.) populations as affected by soil moisture regimes and nitrogen supply. *Ind. Crops Prod.* 29: 554-561.

Baranauskiene, R., P. R. Venskutonis, P. Vikellis and E. Dambrauskien. 2003. Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*) J. Agric. Food Chem. 51 (26): 7751-7758.

Bozin, B., N. Mimica-Dukic, N. Simin. and. G. Anackov 2006. Characterization of the volatile composition of essential oils of some *Lamiaceae* species on the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem.* 54: 1822-1828.

Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Inter. J. Food Microbiology.* 94:223-253.

Chizzola, R., H. Michitsch, C. Franz. 2008. Antioxidative properties of *Thymus vulgaris* leaves: Comparison of different extracts and essential oil chemotypes. *J. Agric. Food Chem.* 56:6897-6904.

Chen, Y., Clapp C. E. Magen H. 2004. Mechanisms of plant growth stimulation by humic substances: the role of organic iron complexes. *Japan. Soc. Soil Sci. Plant Nut.* 50(7):1089-1095.

Eyheraguibel, B., J. Silvestre, P. Morard. 2008. Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. *Bioresource Tech.* 99: 4206-4212.

Figueiredo A. C., J. G. Barroso, L. G. Pedro and J. J. C. Scheffer. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Frag. J.* 23: 213-226.

Jordan, M. J., R. M. Martinez, C. Martinez, I. Monino, J. A. Sotomayor. 2009. Polyphenolic extract and essential oil quality of *Thymus zygis* spp. Gracilis shrubs cultivated under different watering levels. *Ind. Crops Prod.* 29: 145-153.

Khazaie, H. R., F. Nadjafi, M. Bannayan. 2008. Effect of irrigation frequency and planting density on herbage biomass and oil production of thyme (*Thymus vulgaris*) and hyssop (*Hyssopus officinalis*). *Ind. Crops Prod.* 27:315-321.

Lee, S. J., K. Umamo, T. Shibamoto and K. G. Lee. 2004. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem.* 91: 131-137.

- Loziene, K., P. R. Venkutonis., A. Sipailiene, J. Labokas 2007. Radical Scavenging and antibacterial properties of extracts from different *Thymus pulegioides L.* chemotypes. Food Chem. 103:546-559.
- Nardi, S., D. Pizzeghello, A. Cuscolo, A. Vianello. 2002. Physiological effects of humic substances on higher plants. Soil Biol. Biochem. 34: 1527-1536.
- Nejad Ebrahimi , S., J. Haddian, M. H. Mirjalilli, A. Sonboli and M. Yousefzadi 2008. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phonological stages. Food Chem. 110 (4): 927-931.
- Nikbakht A., L. Ancheng, E. Nemat-allah, X. Yi Ping, K. Mohsen, B. Mesbah. 2008. Effect of humic acid on plant growth, nutrient uptake and postharvest life of gerbera. J. Plant Nutrition 31(10-12): 2155-2167.
- Nourhene, B., N Bahloul, I. B. Slimen. N. Kechaou. 2009. Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. Ind. Crops Prod. 29: 412-419.
- Scherer, R. and H. Teixeira G. 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. Food Chem. 112: 654-658.
- Sanchez-Blanco, M. J., S. Alvarez, A. Navarro, S. Banon. 2008. Changes in leaf water relations, gas exchange, growth and flowering quality in potted geranium plants irrigated with different water regimes. J. Plant Phys. 166: 467-476.
- Siminis, C., M. Loulakis, M. Kefakis, T. Manios and V. Manios. 1998. Humic Substances from compost affects nutrient accumulation and fruit yield in tomato. Acta Hort. 469: 353-358
- Singh, M., S. Sharma and S. Ramesh. 2002. Herbage, oil yield and oil quality of patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] influenced by irrigation, organic mulch and nitrogen application in semiarid tropical climate. Ind. Crops Prod. 16:101-107.
- Sharma O. P. and T. K. Bhat. 2009. DPPH antioxidant assay revisted. Food Chem. 113: 1202-1205.
- Socha R., L. Juszczak, S. Pietrzyk, T. Fortuna. 2009. Antioxidant activity and phenolic composition of herbhoneys. Food Chem. 113: 568-574.
- Stratil P. B. Klejdus and V. Kuban. 2006. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables- evaluation of spectrophotometric methods. Journal of Agriculture and Food Chem. 54:607-617.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

1. Discusión general

De los estudios realizados en Montecillo se deriva que en manzanilla, la tendencia en la curva de producción de flores fue similar en los diferentes tipos de fertilización, sin embargo, el rendimiento fue de un 35 % más para el tratamiento inorgánico a partir de los 78 DDT hasta los 108 DDT. El peso del rendimiento económico estuvo en función del número de flores por tratamiento, teniendo un promedio de 1 mg flor^{-1} cosechada durante todo el periodo de evaluación. Este efecto puede atribuirse al origen de la semilla utilizada y a las condiciones de cultivo, tal como lo señalan Sangwan *et al.* (2001). Por otra parte, se observó que durante la etapa de mayor crecimiento vegetativo y de producción de flores, la época de corte y la fuente de fertilización tuvieron influencia en la extracción de nutrimentos, siendo máxima a los 98 DDT y en el tratamiento inorgánico.

En las variables de crecimiento (altura de planta, peso en fresco y en seco de parte aérea y raíz) fueron afectadas de forma significativa por la fecha de corte en las tres especies evaluadas. Los análisis de varianza individuales realizados por especie muestran que en manzanilla el diámetro de tallo no tuvo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) durante las tres etapas de muestreo, pero si por efecto de la fuente de fertilización siendo superior bajo fertilización inorgánica.

En menta, el diámetro de tallo no mostró significancia estadística por efecto de la edad del cultivo. De ahí que a los 120 DDT disminuye el rendimiento de biomasa fresca y seca, así como, el diámetro de tallo y el peso seco de la parte aérea debido a un efecto de senescencia propio de la edad de la planta (Rohloff *et al.*, 2005). En contraste, en las plantas de tomillo la edad fue un factor determinante en el desarrollo de los caracteres morfológicos evaluados, siendo mayores

a los 120 DDT, con excepción de la altura de planta que fue menor en un 8.14 %, con respecto a la altura obtenida a los 90 DDT. Estas variaciones pudieron estar en función de mecanismos de adaptación de las especies evaluadas a las condiciones del cultivo.

Por efecto de la fuente de fertilización, las variables de crecimiento mostraron diferencias altamente significativas en las tres especies evaluadas, siendo en tomillo y menta donde el tratamiento inorgánico favoreció a todas las variables morfológicas evaluadas durante el ciclo del cultivo. En el caso de la menta la producción de biomasa bajo condiciones inorgánicas tuvo rendimientos de un 50% más con respecto a los tratamientos orgánicos. En lo que respecta a tomillo la diferencia fue de 62 %, bajo las mismas condiciones. Para el cultivo de manzanilla la fuente de fertilización no influye en el peso en fresco y en seco de la raíz (g planta^{-1}), pero si contribuye positivamente en la altura de planta, diámetro de tallo y peso en fresco y seco de la parte aérea.

En general, la extracción de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio fue mayor para el tratamiento inorgánico, debido a las condiciones particulares de este sistema de producción, en las que el sustrato y la frecuencia de riego jugaron un papel importante en la disponibilidad y absorción de nutrimentos (Alcántar y Sandoval, 1999). Y su acumulación en el tejido vegetal pudo deberse a la frecuencia y cantidad de solución suministrada (Misra y Srivastara, 2008). En relación con la edad del cultivo y la tendencia de extracción nutrimental, se observaron variaciones similares en las tres especies, siendo el segundo muestreo cuando se presentó la mayor extracción de todos los elementos nutrimentales evaluados con excepción del Cu, que fue igual para los tres tratamientos y especies.

En la caracterización de los aceites esenciales, se reconocieron los componentes principales del aceite esencial de las tres especies por cromatografía de capa fina (CCF). En manzanilla se detectó la presencia de óxido de bisabolol A/B (Rf: 0.20 y color violeta); bisabolol (Rf: 0.32 y color violeta) y al azuleno (Rf: 0.94 con color violeta). En menta, el mentol (Rf: 0.29, color azul) y cineol (0.45, color azul) fueron reconocidos por sus valores de Rf. En el análisis preliminar de los componentes aromáticos, en tomillo, se identificaron entre 5 y 7 componentes entre los que destacan el geraniol (Rf: 0.21 y color azul); el linalool (Rf: 0.29 y color azul), a un Rf de 0.51 se encontró el timol presentando un color rojo-violeta y a un Rf de 0.53 se localizó el carvacrol con un color rojo (Anexo 1), estos valores coinciden con lo reportado por Wagner y Bladt (1996) bajo las mismas condiciones de preparación de muestra.

El rendimiento total de aceites esenciales en las tres especies no fue modificado por la fuente de fertilización y la época de muestreo. Sin embargo, se observaron diferencias en la acumulación de componentes activos del aceite esencial para las tres especies. De acuerdo a los análisis realizados en cromatografía de gases-espectrometría de masas, en manzanilla, el contenido de α -(-)bisabolol fue mayor para las plantas cultivadas bajo el tratamiento de fertilización orgánica con aplicación de ácidos húmicos. Este efecto, puede atribuirse a una interacción entre las sustancias húmicas con los procesos de biosíntesis de monoterpenos en las plantas.

En tanto que en menta se tuvieron problemas para detectar la presencia de mentona y mentol, debido a efectos diversos como el manejo del cultivo, ya que algunos investigadores recomiendan cosechar hojas de tres semanas de edad (Rohloff *et al.*, 2005), o cuando las plantas se encuentran en etapa de formación de yemas florales y floración (Zheljazkov *et al.*, 2010) para obtener aceite esencial con altos contenidos de mentona y mentol. Otro efecto, pudo deberse a la

evaporación de los componentes volátiles de importancia o a la degradación de los mismos durante el manejo y almacenamiento de las muestras. Por esta razón, no se logro establecer un efecto claro de la influencia de la fertilización mineral y orgánica en su composición. No obstante, en tomillo, la fuente de fertilización inorgánica y la época de muestreo favorecen la acumulación de timol y carvacrol, debido seguramente a un aumento en la producción de tricomas glandulares por unidad de área. Estos resultados, reflejan que bajo condiciones de invernadero se puede obtener aceite de alta calidad, sin la necesidad de llegar a la etapa de floración, que ha sido reportada por Nickabar *et al.* (2005) como una de las etapas de mayor concentración de aceites esenciales, en esta especie. Sin embargo, este etapa dependerá de la especie o cultivar utilizado.

En la segunda etapa de investigación, que se realizó en la Universidad de Massachusetts, Campus Amherst, se valoro el efecto de sustancias húmicas derivadas de depósitos de humatos y la concentración de humedad en el sustrato sobre plantas de tomillo hasta los 60 días después del trasplante. Se observaron diferencias en la altura de planta por efecto del contenido de humedad en el sustrato, siendo mayores a 40 %. Y se encontró que la aplicación de ácidos húmicos, a una dosis de entre 100-400 mg L⁻¹ no incrementa el crecimiento vegetal ni el peso de cada planta, lo cual contradice lo señalado por Eyeraguibel *et al.* (2008).

Además, se observó que manteniendo un 60% de humedad en el sustrato se incrementó el rendimiento de aceite esencial. En este estudio se identificaron siete componentes del aceite esencial, siendo el timol y carvacrol los más abundantes con 76 % y 4 %, respectivamente. También, se observo que con la aplicación de sustancias húmicas a una dosis de 400 mg L⁻¹ en incrementan en un 17 % la actividad antioxidante; 16 % en el contenido total de fenoles y 35.98 % para el contenido total de flavonoides.

Lo anterior indica que el manejo de la fertilización orgánica e inorgánica, es un factor limitante del metabolismo primario y que puede afectar las características morfológicas y fisiológicas de la producción de aceites esenciales y de otros compuestos de importancia fitoquímica, por lo que sería interesante conocer a nivel metabólico si la combinación de la fertilización orgánica e inorgánica mejora la composición química de los compuestos bioactivos. Por tanto, es necesario realizar más estudios con aplicación de sustancias húmicas en plantas de tomillo para reforzar estas observaciones.

2. Conclusiones generales

La producción de biomasa fresca y seca en manzanilla, menta y tomillo presenta rendimientos considerables cuando se cultivó bajo el manejo de la nutrición inorgánica, lo que representa mayor cantidad de tricomas glandulares por unidad de área. Por tanto, el rendimiento total de aceites esenciales y algunos de sus componentes principales dependerán de la producción de biomasa fresca.

La evaluación de los factores fuente de fertilización y días a la cosecha, nos indican una tendencia de extracción nutrimental y sirve como antecedente para futuros trabajos de demanda nutrimental en manzanilla, menta y tomillo, ya que los requerimientos nutrimentales no se encuentran definidos para estas especies, o al menos no aparecen en la literatura científica disponible.

Los ácidos húmicos mejoran la composición de aceite esencial en manzanilla, aumentando el contenido de α -(-) bisabolol.

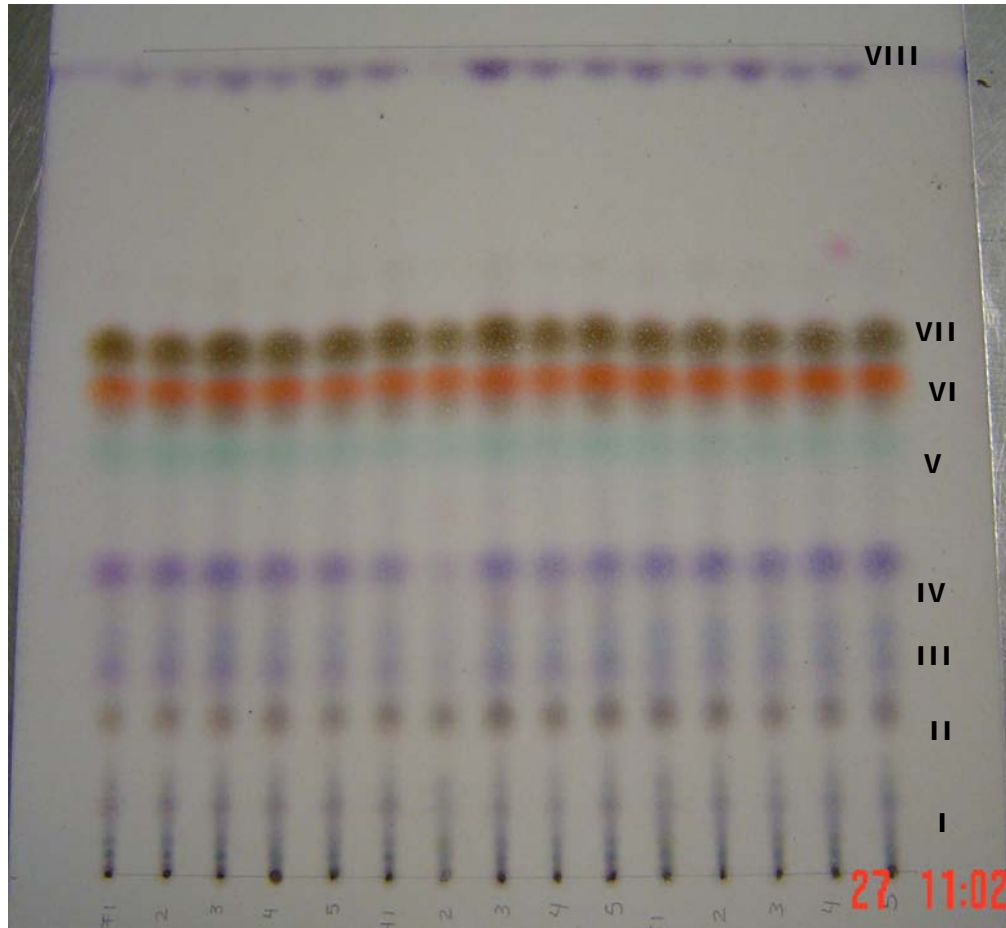
En menta, los resultados de producción y composición de aceites esenciales no apoyan la hipótesis planteada. Las fuentes de fertilización orgánica e inorgánica no mejoraron ni modificaron la composición de los aceites volátiles en esta especie.

En tomillo, el contenido total de timol y carvacrol fue mayor bajo condiciones de manejo inorgánico y su producción es factible bajo condiciones de invernadero.

La aplicación de sustancias húmicas a diferentes concentraciones aumentaron la actividad antioxidante, el contenido total de fenoles y flavonoides.

ANEXO 1.

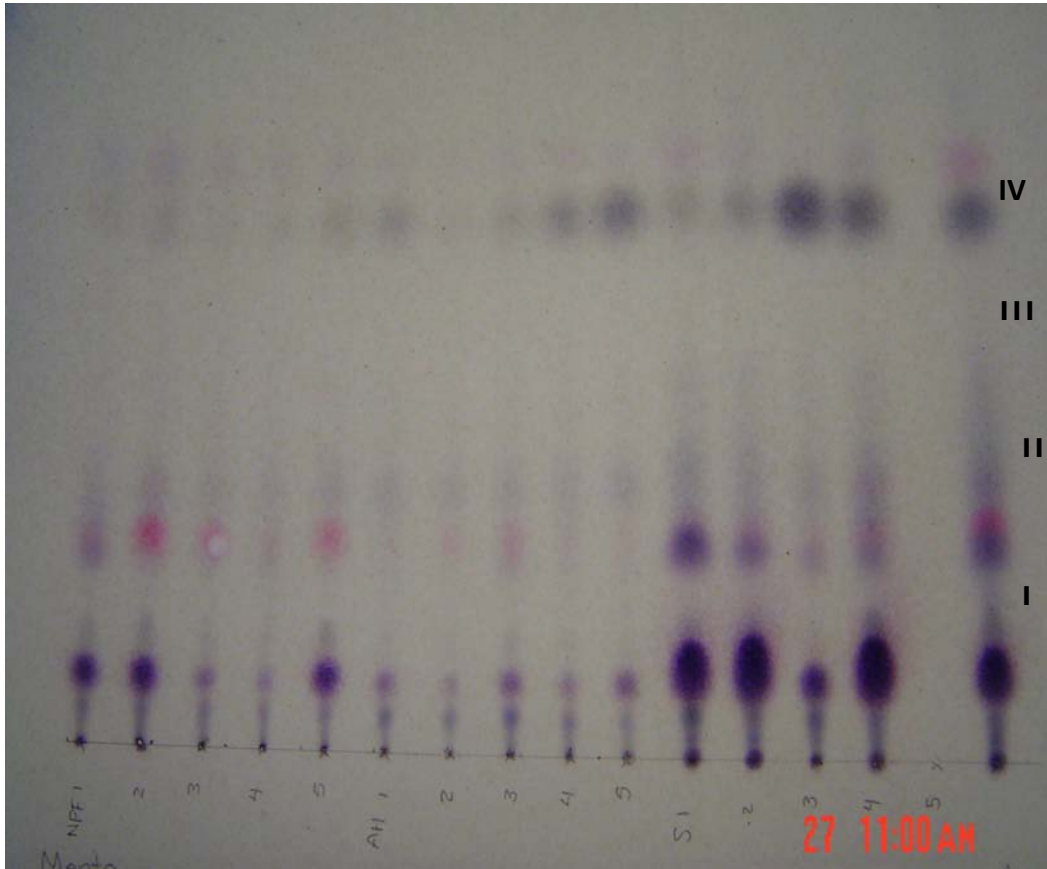
Cromatograma de Manzanilla



Identificación	Compuesto	Valor de Rf	Color
I		0.75	
II	Oxido de bisabolol A/B	0.15	Café
III	Bisabolol	0.20	Violeta
IV		0.32	Violeta
V	Poliines		Verde agua
VI		0.50	Café-naranja
VII	Azuleno	0.54	Café
		0.94	Violeta

ANEXO 2

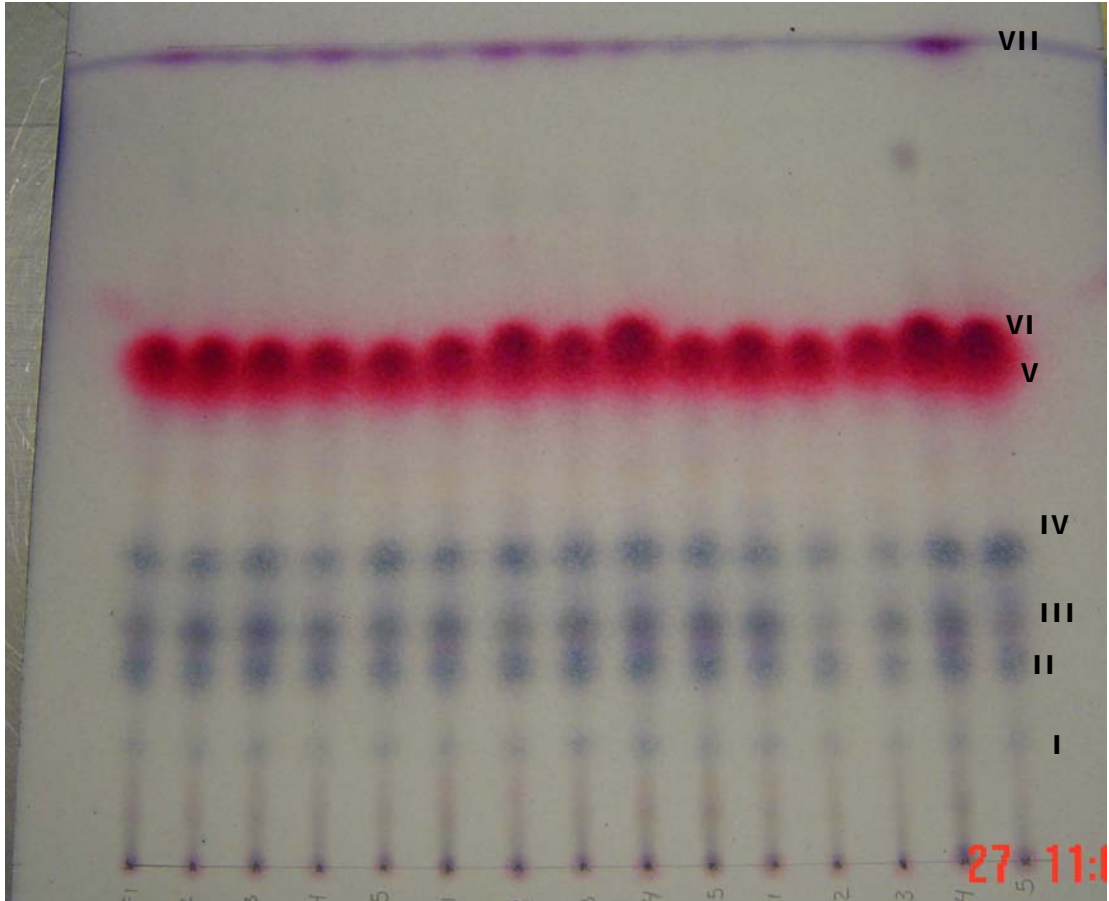
Cromatograma de Menta



Identificación	Compuesto	Valor de Rf	Color
I		0.04	Violeta
II		0.16	Violeta rosa
III	Mentol	0.29	Azul
IV	Cineol	0.45	Azul

ANEXO 3

Cromatograma de Tomillo



Identificación	Compuesto	Valor de Rf	Color
I		0.06	Café
II	Geraniol	0.21	violeta
III	Linalool	0.29	Azul-violeta
IV	Linalil acetato	0.36	Azul
V	Timol	0.51	Rojo violeta
VI	Carvacrol	0.53	Rojo
VII		0.98	Violeta