



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

**FERTILIZACIÓN ORGÁNICA E INORGÁNICA EN MENTA: RENDIMIENTO
Y CALIDAD DE BIOMASA Y ACEITE ESENCIAL**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA**



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

PRESENTA

LAURA PICHARDO ROSILES

MAYO DE 2016, CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO



Instituto de Horticultura

FERTILIZACIÓN ORGÁNICA E INORGÁNICA EN MENTA: RENDIMIENTO Y CALIDAD DE BIOMASA Y ACEITE ESENCIAL

Tesis realizada por **Laura Pichardo Rosiles** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

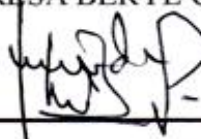
MAESTRA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTORA:



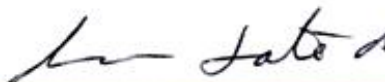
DRA. MARÍA TERESA BERYL COLINAS LEÓN

ASESOR:



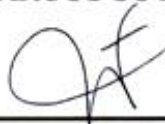
DR. JOEL PINEDA PINEDA

ASESOR:



DR. RAMÓN MARCOS SOTO HERNÁNDEZ

ASESOR:



DR. EDGAR JESÚS MORALES ROSALES

DEDICATORIA

A Dios;
para que siempre me guíe
por el camino, la verdad y la vida.

A mi madre.

A Ignacio.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por haberme otorgado la beca que hizo posible lograr un grado más en mi formación profesional.

A mi comité asesor: Dra. Ma. Teresa Colinas, Dr. Joel Pineda, Dr. Marcos Soto y Dr. Edgar Morales, por sus asesorías, correcciones y valiosas aportaciones para realizar este trabajo de investigación.

A la Universidad Autónoma Chapingo e Instituto de Horticultura del Departamento de Fitotecnia por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado y por el apoyo.

A todos los profesores del Posgrado de Horticultura que contribuyeron en mi formación profesional.

A mis amigos: Carolina, Eduardo, Efrén, Sandro y compañeros, por sus diversos apoyos.

DATOS BIOGRÁFICOS

Laura Pichardo Rosiles nació en agosto de 1987 en la ciudad de Toluca, México; se graduó como Ingeniera Agrónoma Industrial por parte de la Universidad Autónoma del Estado de México en el 2010.

Comenzó su desempeño profesional en el 2011 en Bartlett's Farm, una granja hortícola en Estados Unidos. En el 2012, regresó a México para trabajar como Coordinadora de Producción, trabajando en la logística de embarques al extranjero para LABMET.

En enero de 2014 ingresó a la Maestría en Ciencias en Horticultura en el Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo donde tuvo la oportunidad de hacer una estancia de investigación en la Universidad de Alicante en España, derivada del presente trabajo.

FERTILIZACIÓN ORGÁNICA E INORGÁNICA EN MENTA: RENDIMIENTO Y CALIDAD DE BIOMASA Y ACEITE ESENCIAL

ORGANIC AND INORGANIC FERTILIZER IN MINT: QUALITY AND YIELD OF BIOMASS AND ESSENTIAL OIL

Laura **Pichardo Rosiles**¹ y María Teresa Beryl **Colinas León**²

RESUMEN

La menta es de importancia económica por sus hojas frescas, secas y por su aceite esencial rico en mentol. Es poco lo que se conoce sobre la producción del cultivo de menta con sustratos orgánicos y cómo se modifican los indicadores de desarrollo y crecimiento. Por el gran potencial de comercialización que tiene en mercados alimentarios, cosmetológicos y farmacéuticos y principalmente por las características con las que el mercado la demanda, en el presente trabajo se evaluaron las siguientes fertilizaciones orgánicas: Vermicomposta, Composta, Biovital® y Lixiviado de Lombriz y una fertilización química: Solución Nutritiva Steiner, para evaluar la producción y calidad de biomasa, y del aceite esencial. La solución Steiner fue la mejor fertilización en cuanto a rendimiento de biomasa; respecto de las fertilizaciones orgánicas, Biovital® fue el mejor tratamiento para las variables de rendimiento de biomasa. Los mejores tratamientos para la variable contenido de aceite esencial, fueron la solución nutritiva Steiner y el lixiviado de lombriz. Biovital® fue el tratamiento que menos clorofila acumuló; por otro lado, se encontró una alta correlación ($R^2=0.94$) entre el contenido de clorofila y las unidades SPAD. Por último, las fuentes de fertilización utilizadas en este experimento no tuvieron efecto significativo en la composición del aceite esencial de la menta.

Palabras clave: mentol, vermicomposta, composta, lixiviado de lombriz, unidades SPAD.

ABSTRACT

Mint is economically important for its fresh and dry leaves and its menthol-rich essential oil. Little is known about mint production with organic substrates and how growth and development indicators change. Due to its great marketing potential in the food, pharmaceutical and cosmetic markets, and mainly for the characteristics that the market demands from it, this study evaluated four organic fertilizers, namely Vermicompost, Compost, Biovital® and Worm Leachate, plus a chemical fertilizer, Steiner Nutrient Solution, to evaluate the production and quality of biomass and essential oil. The Steiner solution was the best fertilization in terms of having the highest biomass yield. Regarding the organic fertilizers, Biovital® was the best treatment for biomass yield variables. The best treatments for essential oil content were the Steiner Nutrient Solution and Worm Leachate. The treatment with the lowest chlorophyll accumulation was Biovital®; on the other hand, a high correlation ($R^2=0.94$) between chlorophyll content and SPAD units was found. Finally, the fertilization sources used in this experiment had no significant effect on the composition of the essential oil.

Keywords: menthol, vermicompost, compost, worm leachate, SPAD units.

¹Tesista

²Director

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivo general.....	2
1.1.1 Objetivos particulares.....	2
1.2 Hipótesis.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 La menta y sus usos.....	4
2.2 La menta en México y el mundo.....	5
2.3 La menta y la agricultura orgánica.....	7
2.4 Aceite esencial de menta y su composición.....	10
2.4.1 Ruta metabólica.....	11
2.5 Factores que afecta la composición del aceite esencial de la menta.....	15
2.5.1 Condiciones ambientales y agronómicas.....	15
2.5.2 Periodo de cosecha.....	20
2.5.3 Métodos de extracción y almacenamiento.....	22
2.5.4 Análisis del aceite esencial.....	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
3.1 Localización y establecimiento del experimento.....	27
3.2 Factores de estudio.....	27
3.3 Control fitosanitario.....	28
3.4 Tratamiento y diseño experimental.....	28
3.5 Variables evaluadas.....	28
3.6 Análisis estadístico.....	30
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
V. CONCLUSIONES.....	39

VI. LITERATURA CITADA.....	40
VII. ANEXOS.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Síntesis de terpenos y su clasificación según las unidades de isopreno que contienen (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).....	13
Figura 2.	Principal ruta metabólica de los monoterpenos en la menta. Las enzimas responsables son las siguientes: geranyl difosfato sintasa (1); (-)-limoneno sintasa (2); citocromo P450 (-)-limoneno-3-hidroxilasa (3); (-)-trans-isopiperitenol deshidrogenasa (4); (-)-isopiperitona reductasa (5); (+)-cis-isopulegona isomerasa (6); (+)-PR (7); citocromo P450 (+)-MFS (8); (-)-mentona reductasa (9); y la epoxidasa terpenoide (10). OPP indica la fracción de difosfato (Mahmoud y Croteau, 2003).....	14
Figura 3.	Métodos de extracción de aceites esenciales (SENA, 2012).....	22
Figura 4.	Correlación entre unidades SPAD y contenido de clorofila en plantas de menta.....	35
Figura 5.	Cromatograma de accesiones de aceite esencial de menta 1: Biovital ®; 2: Solución Nutritiva Steiner; 3: Lixiviado de lombriz; 4: Composta; 5: Vermicomposta.....	37

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Análisis de varianza de las variables morfológicas y de rendimiento de la menta, cultivadas con fertilización orgánica e inorgánica, mostrando los valores de los cuadrados medios de las variables evaluadas.....	31
Cuadro 2.	Comparación de medias de las variedades estudiadas en la planta de la menta, cultivadas con fertilización orgánica e inorgánica.....	32

I. INTRODUCCIÓN

Las mentas se han dispersado y cultivado en el mundo por métodos naturales y artificiales (Singh, 1986), la mayoría de las variedades comerciales de menta son híbridos. La menta (*Mentha x Piperita L.*) es una planta aromática usada desde la antigüedad perteneciente a la familia *Lamiaceae*, distribuida en regiones templadas y subtempladas (Arzani *et al.*, 2007), actualmente es una de las hierbas comunes más utilizadas por la sociedad (Blumenthal *et al.*, 2000). Las plantas aromáticas y medicinales han formado parte de nuestra historia y costumbres; su aprovechamiento comenzó con la experimentación de materiales vegetales diversos, que de acuerdo a sus características únicas ofrecían agradables aromas, sabores en los alimentos, alivio del dolor y cura de enfermedades (Craker, 1999). Betancourt y Gutiérrez (1999) reportan que se comercializan de manera cotidiana cerca de 250 especies de hierbas aromáticas frescas y deshidratadas provenientes principalmente de las zonas centro y sur del país. El mercado de hierbas aromáticas es considerado un negocio de nichos o especialidades (López, 2011). 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), en donde también existe una tendencia a preferir alimentos libres de productos químicos, inocuos y con alto valor nutrimental, en especial los consumidos en fresco; una opción para la generación de este tipo de alimentos es la producción orgánica. La capitalización de la agricultura, la privatización del campo, la Revolución Verde y la producción de cultivos transgénicos, al tiempo que han propiciado un incremento en la productividad agrícola, han generado graves procesos de contaminación y erosión de los suelos, pérdida de la productividad ecológica sustentable de las tierras, así como pobreza y marginación de

los campesinos y de la población rural del tercer mundo. La sustentabilidad agrícola, la seguridad alimentaria y biológica, el alivio de la pobreza y la autogestión productiva de las poblaciones campesinas requieren nuevas estrategias productivas capaces de conjugar todos esos objetivos (Altieri y Nicholls, 2000).

El cultivo de la menta es de importancia económica por la producción de sus hojas frescas, secas y por la extracción de aceites esenciales. Los principales factores que modifican la producción y la calidad de aceites en la menta son el riego (Zheljazkov y Margina, 1996) y la aplicación de fertilizantes (Naghdi *et al.*, 2004).

Por el gran potencial de comercialización que tiene la menta en mercados alimentarios, cosmetológicos y farmacéuticos y por las características con las que el mercado la demanda, en el presente trabajo se evaluaron diferentes dosis de fertilización orgánica y una química, en la producción de biomasa, contenido y calidad del aceite esencial.

1.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la fertilización orgánica e inorgánica en algunas variables morfológicas, en producción de biomasa y en el contenido y calidad del aceite esencial de la planta de menta.

1.1.1Objetivos particulares

Evaluar el rendimiento de biomasa en plantas de menta a partir de algunas variables morfológicas.

Cuantificar el índice de verdor en unidades SPAD en respuesta a la fertilización orgánica e inorgánica.

Determinar la cantidad y calidad del aceite esencial en plantas de menta cultivadas con fertilización orgánica e inorgánica.

1.2 Hipótesis

La fertilización orgánica proporcionará mayor contenido y mejor calidad al aceite esencial, mientras que la inorgánica incrementará el rendimiento y calidad de biomasa.

Las unidades SPAD incrementarán conforme incremente el contenido de clorofila en las hojas de la planta de la menta.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 La menta y sus usos

La menta (*Mentha x Piperita* L.) es una hierba aromática perenne nativa de Europa que pertenece a la familia *Lamiaceae*, se distribuye en regiones templadas y subtempladas (Arzani *et al.*, 2007). Es un híbrido estéril generado de la cruce entre *Mentha Espicata* y *Mentha aquatica* (Erum *et al.*, 2012). Presenta una altura de 30-90 cm, de raíz fibrosa; sus tallos son erectos y ascendentes, ramificados con la parte superior siempre cuadrangular; hojas opuestas pecioladas, lanceoladas, ovado-oblongas u oblongo-lanceoladas, aserradas, puntiagudas y de color verde oscuro en el haz; las flores son racimos de color violeta dispuestos en las cimas en la axila de brácteas u hojas formando un verticilastro en cada nudo; cada flor muestra un cáliz tubular con 5 sépalos soldados, una corola violeta simpétala irregular con 4 lóbulos imbricados, 4 estambres didínamos soldados a la corola; el gineceo bicarpelar está dividido en 4 lóbulos y el fruto presenta 4 aquenios (Correa, 1984; Sachan *et al.*, 2013). Reúne propiedades tónicas, estimulantes y anti-espasmódicas de las Lamiaceas (Maracajá *et al.*, 2007).

Cerca del 80 % de la población mundial se basa en medicina indígena o tradicional para cubrir sus necesidades básicas de salud, y la mayoría de estas terapias involucran el uso de extractos de plantas (McKay, 2006); tal es el caso de la menta que es usada con propósitos medicinales y aromáticos (Shazia *et al.*, 2012), sus hojas son producidas tanto para su consumo en fresco como en seco, en la producción de infusiones y condimentos (McKay, 2006), la menta tiene diversas propiedades aromáticas que se pueden explorar para su utilización en la industria. Por su parte, el aceite esencial que se extrae de la menta es usado en varios productos como chicles, pastas dentales, enjuagues bucales, golosinas, productos farmacéuticos, cosméticos, en la industria de los plaguicidas, en la

aromaterapia, por mencionar algunos (Mint Industry Research Council, 2009; Erum *et al.*, 2012) y esto es debido mayormente a su principal compuesto aromático, el mentol (Ruiz del Castillo *et al.*, 2003).

2.2La menta en México y el mundo

En México la producción de hierbas aromáticas presenta un gran potencial debido al incremento en las exportaciones a países como Estados Unidos de América, Japón y Alemania (Sánchez y Lucero, 2012), recientemente se han identificado como valiosa fuente de diversos fitoquímicos, muchos de los cuales poseen actividad antioxidante significativa. En el mundo occidental, durante los últimos años se ha revalorizado el consumo de hierbas aromáticas, (especialmente las cultivadas en medios orgánicos) tanto en los condimentos de los alimentos, como en el uso medicinal y cosmético, es decir, el regreso a lo natural para el cuidado de la salud (Sánchez y Lucero, 2012). México cuenta con zonas de alto potencial para la producción de hierbas finas, su creciente demanda las ha convertido en productos con un nicho de mercado rentable y en expansión, además representan una alternativa económica a los cultivos tradicionales (Juárez *et al.*, 2013).

La producción orgánica de plantas aromáticas y medicinales es incipiente a pesar de que están incluidas en la categoría de productos orgánicos de exportación (Bojórquez, 2006). Actualmente la menta no es un cultivo común en México, datos registrados para el año 2012 muestran que de las 24,893.52 hectáreas destinadas a la producción comercial de hierbas aromáticas y medicinales (SIAP, 2014), la menta contribuye con una cantidad baja en la producción. En México, en el estado de Baja California Sur se produce la calidad más alta de plantas aromáticas orgánicas, con los cultivos de albahaca, tarragón,

romero, salvia, tomillo, orégano, menta y cebollines; en el 2010 apareció como el productor único de menta orgánica con una superficie sembrada de 13.75 ha (SIAP, 2014).

A nivel mundial, las hierbas aromáticas dentro de su uso culinario están adquiriendo día a día mayor importancia. En el 2006 China, Alemania y Estados Unidos de América se consolidaron como los principales países exportadores de hierbas aromáticas en el mundo, paradójicamente como mercado potencial para la exportación de hierbas aromáticas producidas en México se encuentra Estados Unidos ya que depende más de las importaciones para suministrar su mercado interno (Sánchez y Lucero, 2012).

En el año 2006, las importaciones mundiales de hierbas aromáticas registraron operaciones por más de 1,055 millones de dólares, cifra que revela un incremento interanual de 7 y 44 % durante el quinquenio (2002-2006). Los Estados Unidos de América, Alemania y Japón se consolidaron como los principales compradores de estos productos (Sánchez y Lucero, 2012). En cuanto al aceite esencial, aproximadamente en el mundo se obtienen 20,000 toneladas de aceite esencial de las especies de menta al año, siendo el segundo más importante después de los aceites de las especies de *citrus* (Telci, *et al.*, 2011; Erum *et al.*, 2012). De acuerdo con SENA (2012), en el año 2002 seis países concentraron las exportaciones del aceite esencial de menta: Estados Unidos, Francia, Reino Unido, Brasil, China y Argentina; durante ese mismo periodo los principales países importadores fueron Estados Unidos, Francia, Reino Unido, Japón y Alemania manteniendo un flujo de 1,300 millones de dólares. Por su parte, el consumo del mentol en todas sus formas excede las 7,000 toneladas anuales, con un valor aproximado de 300 millones de dólares (Croteau *et al.*, 2005).

2.3 La menta y la agricultura orgánica

A nivel mundial, las hierbas aromáticas dentro de su uso culinario están adquiriendo día a día mayor importancia. Lo anterior se debe a que los consumidores adquieren nuevas formas de alimentación dirigida hacia lo sano, con incremento significativo en la elección de los alimentos orgánicos y el auge por los alimentos étnicos (Sánchez y Lucero, 2012). Muchos países desarrollados han cambiado las estrategias de cultivo hacia aspectos que involucran el uso de elementos biológicos con el fin de producir alimentos en forma orgánica, lo cual confiere al producto obtenido un valor agregado que lo hace aún más atractivo para su consumo y compra (Alarcón y Ferrera, 2000). La producción y comercialización de productos biológicos está encaminada al fortalecimiento de sistemas de producción sostenible; esto en respuesta a la preocupación que a nivel mundial se ha generado, y en la demanda de productos alimenticios sin casi o nula aplicación de plaguicidas que repercutan en la contaminación ambiental (en la que actualmente estamos inmersos), y que también impactan en la salud humana con agentes tóxicos y carcinogénicos (Alarcón y Ferrera, 2000).

Es poco lo que se conoce sobre la producción del cultivo de menta con sustratos orgánicos y cómo se modifican los indicadores de desarrollo y crecimiento (Romero *et al.*, 2013). Existen en el mercado productos denominados biofertilizantes cuyos beneficios no sólo se enfocan al crecimiento vegetal, sino que también pueden ser elementos importantes en la estabilidad de los agroecosistemas y del ambiente, ya que su aplicación influye directamente en la disminución de la aplicación de plaguicidas que participan como agentes de contaminación, ya que ayudan a reducir enfermedades (Alarcón y Ferrera, 2000). Actualmente el manejo de desechos orgánicos a través de

compostas y vermicompostas ha tenido fuerte impulso, sobre todo porque el producto de estos procesos se cataloga como fuente rica en nutrientes y su aplicación a las plantas puede contribuir significativamente en la estimulación o incluso inhibición del crecimiento (altas dosis) y desarrollo vegetal (Alarcón y Ferrera, 2000). Estos sustratos contienen ácidos húmicos y promotores de crecimiento que incrementan la altura de la planta, el área foliar y el peso fresco y seco de la parte aérea (Atiyeh *et al.*, 2002). Mediante el uso de este tipo de sustratos es posible mantener niveles óptimos de disponibilidad nutrimental para las plantas que sean producidas en vivero (Alarcón y Ferrera, 2000).

En la producción orgánica la relación C/N inicial determina la disponibilidad nutrimental de la composta o vermicomposta (Romero *et al.*, 2013). Zhu (2007) reporta que la relación C/N en la vermicomposta oscila entre 13-15, lo cual define la estabilidad del producto, mientras que Sánchez *et al.* (2008) indican que la mejor relación C/N de una vermicomposta para la producción agrícola, oscila entre 10 y 13.

En la producción orgánica el uso de las compostas se ha convertido en un elemento central, ya que proveen de una aeración adecuada, mejora la capacidad de retención del agua, promueve el crecimiento de microorganismos benéficos en la rizósfera y sirven como un reservorio de nutrientes para la obtención de plantas sanas que contribuyen a la productividad de las mismas (Nair *et al.*, 2012).

Sousa *et al.* (2003) expresan que la vermicomposta puede ser una alternativa contraria al uso de fertilizantes químicos. Es un material que tiene microorganismos humificantes alcalinos y bacterias que constituyen algo semejante a anticuerpos naturales que protegen a las plantas contra las plagas y enfermedades. Por su parte, Vogel *et al.* (2001) afirman que la vermicomposta es, en promedio 70 % más rica en nutrientes que los

humus convencionales y presenta la ventaja de ser neutra además de tener una alta porosidad y drenaje, alta capacidad de retención del agua y nutrimentos, elevada fertilidad y generar buena formación del sistema radicular. Se puede ampliar la información sobre la cantidad de vermicomposta a ser adicionada al suelo para el aumento del crecimiento de las plantas y la utilización eficiente de los nutrimentos, ya que se conoce que dosis elevadas pueden traer prejuicios a las mismas (Maracajá *et al.*, 2007) debido al exceso de nutrimentos disponibles para las plantas. Piroli *et al.* (1996) constataron mayor altura de la parte aérea y diámetro del tallo en dosis de hasta un 30 % de vermicomposta al sustrato, mientras que Maracajá *et al.* (2007) aplicando un 15 % de vermicomposta al sustrato observaron los mejores resultados en producción de biomasa fresca y seca en las plantas de hierba buena.

Niveles altos de fosforo son importantes para la estimulación del crecimiento de raíces, pero también puede afectar el desarrollo de la planta cuando las concentraciones son demasiado altas (Romero *et al.*, 2013). Atiyeh *et al.* (2002) mencionan que la vermicomposta al sufrir una serie de transformaciones hacen disponibles cuatro veces más el nitrógeno, veinticinco veces más el fósforo y dos veces más el potasio, y si tomamos en cuenta que los ácidos húmicos mejoran la absorción mineral, mediante el aumento de la permeabilidad de las membranas (Valdrighi *et al.*, 1996); entonces, debemos cuidar los daños por toxicidad por cualquiera de estos elementos.

Por otro lado, también existen los lixiviados de humus de lombriz, los cuales en los últimos años han demostrado que mejoran el desarrollo de hojas, tallos y raíces, además de aumentar los rendimientos en ornamentales y hortalizas; esto debido no sólo a la

disponibilidad de nutrimentos, sino también a algunos factores biológicos tales como ácidos húmicos o enzimas libres (Arancon *et al.*, 2006).

Es cierto que en comparación con los fertilizantes químicos, contienen bajas cantidades de nutrimentos; sin embargo, la disponibilidad de dichos elementos es más constante durante el desarrollo del cultivo por la mineralización gradual a que están sometidos (Trinidad, 2000).

2.4 Aceite esencial de menta y su composición

El aceite esencial de la menta se obtiene de las hojas de hierbas perennes como la *Mentha piperita* L. y la *M. arvensis* var. *piperacens* miembros de la familia lamiaceae. Es un líquido incoloro, amarillo pálido o amarillo verdoso pálido que tiene un olor y sabor característicos, seguido de una sensación de frescor, muy soluble en etanol (70 %) (Alankar, 2009); el aceite esencial se encuentra en el envés de las hojas y generalmente es rectificado y fraccionado antes de su uso, los rendimientos van de 0.1-1.0 % del peso fresco de la parte aérea de la planta (Sachan *et al.*, 2013). Está compuesto principalmente por mentol (30-55 %) y mentona (14-32 %). El mentol aparece mayormente en su forma de alcohol libre con pequeñas cantidades de ésteres de acetato (3-5 %) y valerato. Otros monoterpernos presentes son la isomentona (2-10 %), eucaliptol (6-14 %), α -pineno (1.0-1.5 %), β -pineno (1-2 %), limoneno (1-5 %), neomentol (2.5-3.5 %) y mentofurano (1-9 %) (WHO, 2002).

Comercialmente el aceite esencial de la menta (*M. piperita*) es el más usado principalmente por su alto contenido de mentol, un contenido moderado de mentona (Gul, 1994; citado por Daramola, 2011) y bajas cantidades de pulegona y mentofurano (Mahmoud y Croteau, 2003). El mentol es el principal producto comercial que se

obtiene de la menta y es producido en unas glándulas especializadas presentes en las hojas y flores de la planta (Shazia *et al.*, 2012; Erum *et al.*, 2012), es el principal responsable del sabor característico y de la sensación de frescor de la menta (McConkey *et al.*, 2000); por otro lado, el mentofurano es un componente indeseable que contribuye al sabor no deseado y produce el color en el almacenamiento del aceite (Rios *et al.*, 2007). El mentol, la mentona, el metofurano, y el eucaliptol son los principales componentes, ya que constituyen el 75 % del aceite esencial y son los que modifican la calidad de éste (Zheljazkov *et al.*, 2009). Por otra parte, del aceite también se extraen otros metabolitos secundarios como la carvona, el limoneno, el aceite desmentolado o fracciones de terpenos que tienen usos alimenticios, farmacéuticos, cosméticos y en la industria de los pesticidas (Khanuja *et al.*, 2000). De acuerdo con Dwivedi (2004), la evaluación cualitativa del aceite esencial de menta, según la *Farmacopea Europea*, se basa en la cantidad relativa de mentol: 44-55 % de alcoholes libres (como el mentol), 15-32 % de cetonas (como la mentona), 4.5-10 % de ésteres (como el acetato de mentilo), 3.5-14 % de cineol, 1.5-10 % de isomentona, 1-9 % de mentofurano, 1-5 % de limoneno, no más de 4 % de pulegona ó 1 % de carvona y sesquiterpenos (aproximadamente un 5 % de viridiflorol).

La demanda global del aceite de menta va en aumento, los principales países europeos productores son Bulgaria, Inglaterra, Francia, Hungría, Italia, Moldavia, Rumania, Rusia y Serbia y Montenegro; China e India en Asia y los Estados Unidos y Argentina en América (Dwivedi *et al.* 2004; Zheljazkov *et al.*, 2009; Erum *et al.*, 2012).

2.4.1 Ruta metabólica

A pesar de la importancia económica de los aceites esenciales, se sabe relativamente poco sobre la regulación de la biosíntesis de terpenos de aceites esenciales (McConkey

et al., 2000). Los monoterpenos son los componentes principales de los aceites esenciales de la familia de las mentas (*Lamiaceae*), son químicamente complejos y su ruta metabólica implica esencialmente los tipos de reacción del metabolismo terpénico (Mahmoud y Croteau, 2003).

La producción de los monoterpenos se da en los tricomas glandulares de las hojas de menta que dependen de la velocidad de la biosíntesis, que a su vez está determinada por la asimilación del CO₂ y se limita a las hojas de 12 a 20 días de edad (McConkey *et al.*, 2000). La ruta del mevalonato se origina en los plástidios (leucoplastos) de las células secretoras de estas estructuras glandulares especializadas no fotosintéticas para el metabolismo de isoprenoides, que proporciona isopentenil difosfato (y por isomerización dimetilalil difosfato) y que son el precursor universal de los terpenoides a través de reacciones redox (Turner *et al.*, 1999). Los terpenos se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico, activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar isopentenil bifosfato (IPP), o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en cloroplastos y genera también IPP. El isopentenil difosfato y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP) son los precursores activados en la biosíntesis de terpenos en reacciones de condensación catalizadas por prenil transferasas para dar lugar a prenil bifosfatos como geranil difosfato (GPP), precursor de monoterpenos; farnesil difosfato (FPP), precursor de sesquiterpenos; y geranilgeranil difosfato (GGPP) precursor de diterpenos (Figura 1) (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

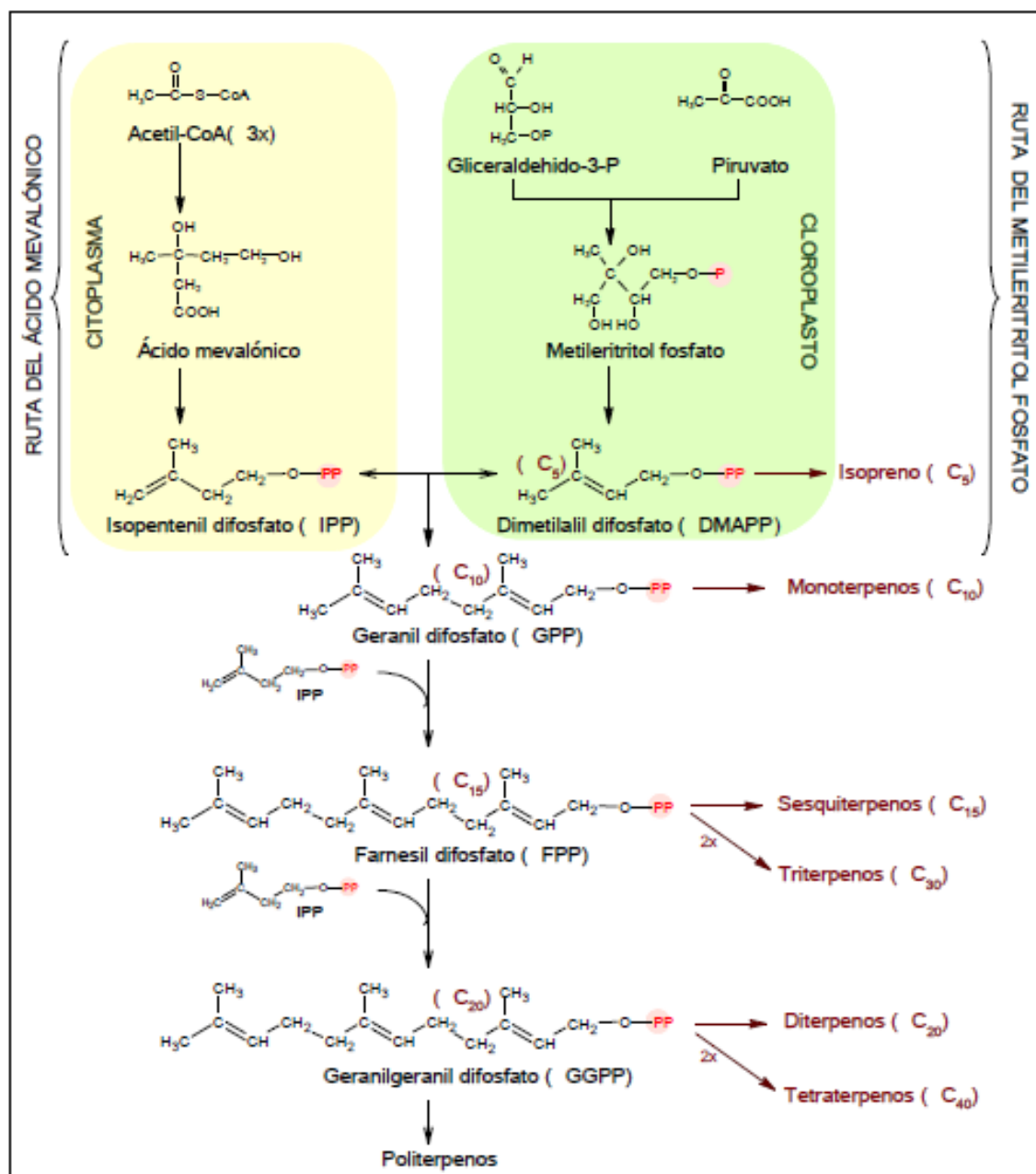


Figura 1. Síntesis de terpenos y su clasificación según las unidades de isopreno que contienen (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

La ruta metabólica que conduce al compuesto principal, el mentol, es compleja y envuelve múltiples pasos y diferentes tipos de reacciones (Figura 2). Después de la conversión de los metabolitos primarios isopentenil difosfato y dimetilalil difosfato a geranil difosfato, la ciclación de este monoterpeno precursor universal llega al (-)-

limoneno y mediante hidroxilación mediada por el citocromo P450 se convierte en (-)-trans isopiperitenol, posteriormente una secuencia de cinco pasos produce (-)-mentol (Mahmoud y Croteau, 2003).

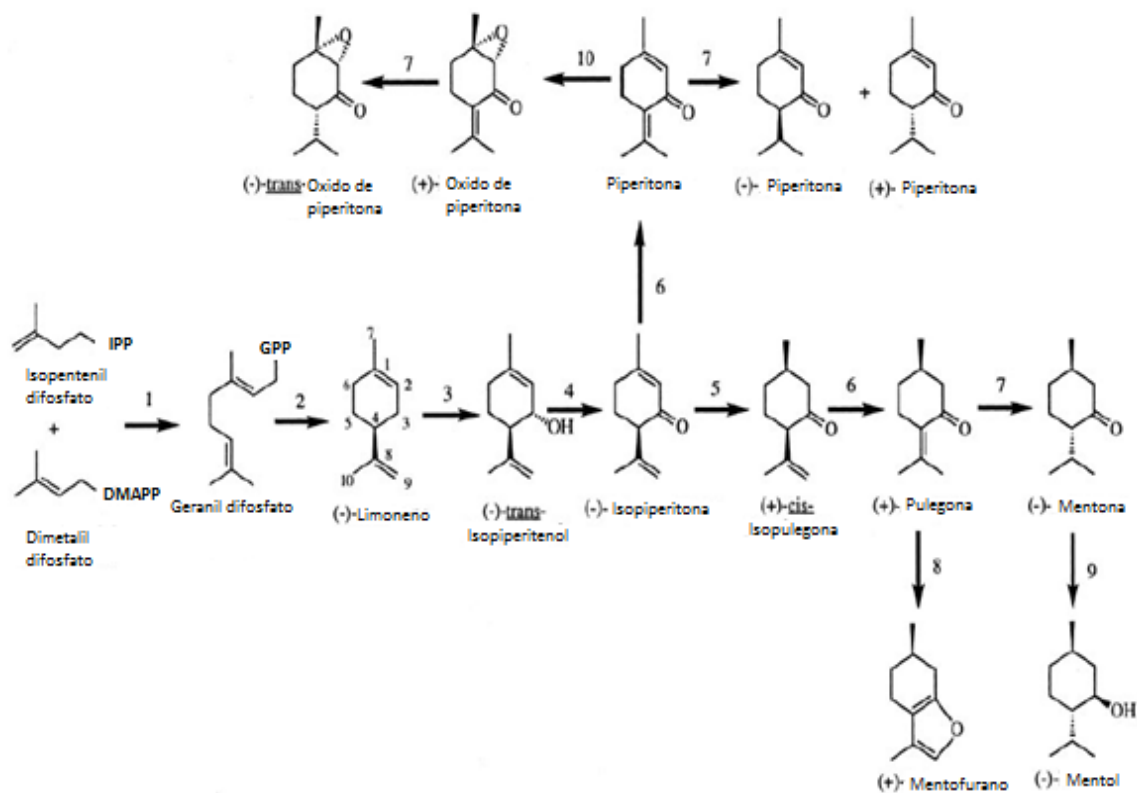


Figura 2. Principal ruta metabólica de los monoterpenos en la menta. Las enzimas responsables son las siguientes: geranil difosfato sintasa (1); (-)-limoneno sintasa (2); citocromo P450 (-)-limoneno-3-hidroxilasa (3); (-)-trans-isopiperitenol deshidrogenasa (4); (-)-isopiperitona reductasa (5); (+)-cis-isopulegona isomerasa (6); (+)-PR (7); citocromo P450 (+)-MFS (8); (-)-mentona reductasa (9); y la epoxidasa terpenoide (10). OPP indica la fracción de difosfato (Mahmoud y Croteau, 2003).

En el esquema de interconversiones propuesto por Reitsema (1958), la pulegona se puede oxidar a mentofurano o reducir a mentona; la mentona se reduce a mentol y el mentol se reduce a acetato de mentilo. La conversión de pulegona a mentofurano por la enzima sintasa mentofurano, se asocia con el ambiente y las condiciones de la planta que

favorecen el agotamiento de los sustratos para la respiración en las células productoras de los monoterpenos, mientras que la producción de mentona por el otro lado, se ve favorecida si hay un abasto de estos sustratos para la respiración y se da por la enzima pulegona reductasa (Mahmoud y Croteau, 2003). La conversión de mentona a mentol y de mentol a acetato de mentilo, se asocia al estado de madurez de la planta, que a su vez se ve afectada por los factores ambientales. (Clark y Menary, 1981).

2.5 Factores que afectan la composición del aceite esencial de la menta.

El contenido y la composición del aceite esencial de la menta tienen importancia económica para el mercado (Zheljazkov *et al.*, 2009). Investigaciones pasadas han mostrado que el genotipo y factores ambientales como la etapa de la cosecha, el fotoperiodo, la temperatura (Clark y Menary, 1979; Verma *et al.*, 2010), la latitud, las condiciones de crecimiento (Zheljazkov, 2005), el riego (Shazia *et al.*, 2012), la aplicación de pesticidas (Zheljazkov y Margina, 1996) y la fertilización (Mitchell y Farris, 1996; Scavroni *et al.*, 2005; Topalov, 1962) ejercen influencia en el contenido del aceite esencial. Los componentes químicos de las hojas y del aceite esencial dependen de la madurez de la planta, la variedad, la localización geográfica y del proceso de extracción del aceite (Clark y Menary, 1981; Ruiz del Castillo *et al.*, 2003; McKay, 2006).

2.5.1 Condiciones ambientales y agronómicas

La *M. piperita* tiene una amplia adaptación a diferentes condiciones climáticas y tipos de suelo, aunque es sabido que los climas templados mejoran su calidad (Telci, 2011) y que se desarrolla bien en suelos con alta capacidad de retención de agua (McKay, 2006 y Hart *et al.*, 2010). También bajo condiciones de estrés como baja fertilidad del suelo,

déficit de agua, reducción de la intensidad luminosa y altas temperaturas nocturnas, se presenta una reducción del rendimiento de aceite esencial, lo cual está correlacionado con hojas más pequeñas y un menor número de tricomas glandulares por hoja; también la composición del aceite cambia, ya que el mentofurano es retenido en las células secretoras bajo condiciones de estrés (Rios *et al.*, 2007).

El cultivo de la menta tiene demandas relativamente altas de agua durante su etapa de crecimiento; sin embargo, no toleran los suelos anegados, por lo que deben ser suelos con buen drenaje. Además, ya que las raíces de la menta son poco profundas, se estresan fácilmente si no tiene disponibilidad de agua (Weller *et al.*, 1998). El pH del suelo afecta la disponibilidad de varios nutrimentos minerales tales como N, P, K, S, Ca, Mg, Fe, Mn, Br, Cu, Zn, Mo y todos estos nutrimentos están disponibles en el rango de pH de entre 5.5-6.5 (Taiz y Zeiger, 1998) por lo que un pH en el sustrato entre 5.5 y 6.0 será adecuado para el cultivo de menta (Hart *et al.*, 2010).

El nitrógeno es uno de los nutrimentos más importantes que modifican la producción de menta y por tanto, la composición del aceite esencial (Mitchell y Farris, 1996). Generalmente, altas aplicaciones de N están asociadas a mayores rendimientos de biomasa (Zheljazkov *et al.*, 2009) ya que se sabe que una elevada aplicación de N incrementa el desarrollo del área de la hoja y el rendimiento (Alfasar y Al-Hassan, 2009); en tanto que el K es indispensable para la regulación osmótica de las células (Valmorbida y Fernandes 2007); y el P es requerido como constituyente de proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos, además de participar en las reacciones de energía con el ATP y ADP (Davis *et al.*, 2005). Sin embargo, Jiménez *et al.* (2012) observaron que los macronutrimentos (N, P, K Y Mg), no modificaron el contenido de aceite pero sí la cantidad de materia foliar, a su vez, encontraron que altas dosis de P afectaron el

contenido de mentol. Esto puede ser debido a la función que tiene en las células la actividad de las fosfatasa para desfosforilar las moléculas orgánicas; en particular a medida que disminuye el fósforo hay un decremento de monoterpenos, a causa de que se reduce la fosforilación requerida para producir el geranil pirofosfato, el cual es el precursor primario de los monoterpenos (Ramos *et al.*, 2005). Por otra parte, se ha reportado que el K no afecta significativamente al incremento de materia foliar en el cultivo de la *Mentha piperita* L. (Valmorbida y Fernandes 2007). Sin embargo, Valmorbida y Fernandes (2007) reportan que fue el macronutriente cuya ausencia se vio reflejada en la menor acumulación de mentol, probablemente debido a que es esencial en las células de la planta para las funciones bioquímicas de regulación osmótica y actividad enzimática como carbonil-P-sintasa, piruvato kinasa y en general con las enzimas involucradas en la fotosíntesis. El Mg tiene un comportamiento similar al K (Jiménez *et al.*, 2012). Por otro lado, habiendo disponibilidad de Zn y S, las actividades de varias enzimas mejoran sintetizando más proteínas, lo que conduce a mayor altura de plantas, a un aumento en el índice de área foliar y una mejora en la relación tallo hoja, resultando en un mayor rendimiento de follaje (Kumar *et al.*, 2010), esto posiblemente por el sinergismo que existen entre el S y el N, ya que habiendo un mejor aprovechamiento del N bajo la disponibilidad del S se obtienen mayores rendimientos de biomasa; en cuanto al Zn se sabe que está involucrado en mejorar la actividad enzimática en la fotosíntesis produciendo más fotosintatos y también como activador de varias enzimas involucradas en la biosíntesis del aceite esencial (Kumar *et al.*, 2010).

La densidad de plantación es un factor importante para la determinación del micro clima en el cultivo de menta (Mansoori, 2014), la optimización de este factor puede contribuir a un rendimiento superior en la cosecha. El efecto de la densidad de siembra sobre el

crecimiento y el desarrollo se debe en gran medida al cambio en la interceptación de energía radiante; cuanto mayor sea la densidad de plantas, mayor será la intercepción y en consecuencia, mayor será el crecimiento de la menta (Dadkhah *et al.*, 2009). Mansoori (2014) encontró que menos siembra por unidad de superficie resulta en alturas inferiores de planta (menores a 69.7 cm); es bien conocido que muchas plantas herbáceas mejoran el alargamiento de los tallos cuando la densidad de masa o el índice de área foliar es alta (Wajid *et al.*, 2004). Las hojas son un buen indicador de la productividad de las plantas, la densidad de plantación y el tiempo de cosecha afectan significativamente el peso fresco de las hojas (Mansoori, 2014). Mayores rendimientos de biomasa ($20.3 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$) y de aceite esencial ($17.88 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$) fueron obtenidos en plantas sembradas a una distancia de 30cm entre surco y surco; el contenido del aceite esencial no se vio afectado por la distancia entre surcos (Mengesha *et al.*, 2011) ya que el incremento de materia foliar y el rendimiento de aceite no está correlacionado con la composición del mismo y con la acumulación del mentol (Jiménez *et al.*, 2012).

Gupta *et al.* (1971) dicen que los aceites de plantas que se producen a gran altitud tienen altas concentraciones de mentol, mientras que las plantas que se producen a altitudes más bajas tienen altas concentraciones de mentofurano; se dice que el aceite esencial de alta calidad sólo se puede producir en cultivos sembrados en ciertas zonas geográficas con días cálidos y noches frías (Rios *et al.*, 2007). Burbott y Loomis (1967) mencionan que noches cortas o con temperaturas frías, combinadas con una alta intensidad luminosa durante el día, promueven la formación de mentona y limitan la acumulación de mentofurano y pulegona. Esto se basa en la probabilidad de que las noches cálidas (25°C) causan el agotamiento de los sustratos respiratorios, lo que resulta en condiciones de oxidación; mientras que noches frías (8°C) conservan altos niveles de sustratos

respiratorios y por lo tanto se mantienen condiciones de reducción. En la luz, la fotosíntesis produce condiciones de reducción; en la oscuridad, los productos de la fijación fotosintética del CO₂ sirven como sustratos para la respiración, y siempre que estos sustratos estén disponibles en abundancia, se espera que las enzimas de la respiración se mantengan en un estado de reducción (Burbott y Loomis, 1967). También Burbott y Loomis (1967) encontraron que bajo condiciones de estrés, tales como baja intensidad luminosa, déficit de agua, y/o temperaturas elevadas por la noche, elevan las cantidades acumuladas de pulegona y mentofurano; en contraste, en su investigación Virmani y Data (1968) a una altitud de 26°52' encontraron que las plantas florecieron y produjeron aceite de una composición aceptable bajo condiciones de días cortos y temperaturas altas de día y de noche. Por lo tanto, no es posible imponer una localización geográfica estricta para la producción del cultivo ya que son muchos los factores ambientales que interactúan para determinar la composición final del aceite esencial.

Por otro lado, se dice que la duración del día afecta al cultivo de menta, ya que días largos inducen a la floración, mientras que días cortos traen el crecimiento de muchos estolones (una característica de invierno), en lugar de promover tallos erectos (Burbott y Loomis, 1967). De acuerdo con (Hart *et al.*, 2010) la producción de menta requiere de 14 a 16 horas luz.

Clark y Menary (1981) encontraron que los aceites con alto contenido de mentofurano se asocian a cultivos fuertemente afectados por la roya, ya que debido a la roya, se pierde un alto porcentaje de hojas dejando un pequeño número de hojas superiores y la inflorescencia. Jiménez *et al.* (2012) observaron que el tamaño de la hoja y su posición en la planta asociada a la edad, determinan que el (-) mentol y su inmediato precursor la

(-) mentona, aumenten de la primera a la cuarta hoja; en la sexta disminuye (-) mentona y el (-) mentol alcanza su mayor concentración; por lo tanto, el contenido de mentol y rendimiento de aceite se incrementa con la madurez de la hoja ya que la enzima mentona reductasa aparece notablemente tarde en el desarrollo de la hoja (Davis *et al.*, 2005) y por otro lado, condiciones de estrés relacionados a la luz, a la temperatura y a la humedad, tienden a promover la acumulación de pulegona y mentofurano (Clark y Menary, 1981). Los medios por los cuales estos factores influyen específicamente en el metabolismo de los terpenos todavía no se entiende (Mahmoud y Croteau, 2003).

2.5.2 Periodo de cosecha

La composición del aceite esencial es fuertemente dependiente de la etapa de desarrollo de la planta (ontogenia), y por lo tanto el tiempo de cosecha es uno de los factores más importantes que influyen en el aceite esencial (Mansoori, 2014). Cosechar la menta en su estado de madurez ideal, ofrece un rendimiento de aproximadamente el 1% de aceite esencial en peso seco con un contenido de mentol de cerca del 50 % (Croteau *et al.*, 2005). La cosecha temprana o tardía del cultivo dará bajos rendimientos de las hojas y del contenido de aceite esencial, porque una cosecha tardía o temprana resultará en un cultivo pasado o inmaduro resultando bajos rendimientos en la biomasa y en el aceite (Shah y Gupta, 1989).

La menta cosechada durante la formación de yemas florales presenta mayor contenido de aceite debido a una mayor cantidad de biomasa y también a una mejor calidad que cuando se cosecha en plena floración (Zheljazkov *et al.*, 2009; Hart *et al.*, 2010). Concentraciones más altas de acetato de mentilo y mentol están asociadas normalmente con el inicio de la floración (Clark y Menary, 1981) mientras que concentraciones de mentofurano y pulegona se incrementan según se incrementa la cantidad de flores (Court

et al., 1993), siendo las flores de menta las que contienen mayores cantidades de estos compuestos (Court *et al.*, 1993). El DAFF (2012) indica que un buen rendimiento y una calidad óptima del aceite se obtienen generalmente cuando el cultivo se encuentra en un 10 % en estado de floración. Por otro lado, Mengesha *et al.* (2011) y Hart *et al.* (2010) encontraron que el rendimiento en biomasa de la menta y contenido de aceite esencial incrementan al incrementarse el tiempo de cosecha, 120 días después del trasplante; posteriormente, los valores decrecen. Verma *et al.* (2010) igualmente encontraron que el contenido de mentol se incrementa con la madurez del cultivo alcanzando un pico máximo durante los 120 a 150 días después del trasplante. Además, se encontró que el aceite obtenido de la menta cosechada en etapa tardía, casi siempre tenía bajas concentraciones de otros componentes como el α -pineno, β -mirceno, sabineno, entre otros, esto es atribuible a la pérdida de follaje (Court *et al.*, 1993).

También se dice que la cosecha debe hacerse en un día soleado, seco, al final de la mañana cuando todos los rastros de rocío hayan desaparecido (DAFF, 2012), esto porque la actividad reductora de los compuestos es más fuerte en días soleados y cálidos, y débil en días fríos o nublados (Burbott y Loomis, 1967). Nilofer *et al.* (2015) encontraron que un mejor crecimiento de las plantas en términos de propagación del cultivo y de área foliar (mayor proporción de hojas es igual a mayor rendimiento de aceite) se debió a condiciones climáticas favorables requeridas para la cosecha, es decir, una mayor temperatura del aire y una humedad relativa baja; confirmando esto, en su mismo estudio un año después, encontraron menores contenidos de aceite en las plantas en las cuales durante su etapa de maduración y de cosecha se registró un clima húmedo debido a las fuertes lluvias, lo cual rompió y lavo las glándulas que contienen el aceite de las hojas.

2.5.3 Métodos de extracción y almacenamiento

Los aceites esenciales son líquidos volátiles, en su mayoría insolubles en agua (aunque le transmiten su perfume) pero fácilmente solubles en alcohol, éter y aceites vegetales y minerales y demás disolventes orgánicos; por lo general no son oleosos al tacto, son inflamables y son responsables del aroma en muchas plantas (Yáñez *et al.*, 2007).

Existen varios métodos para la obtención del aceite esencial (Figura 3). Los aceites esenciales de las hierbas aromáticas tradicionalmente se obtienen por hidrodestilación, por arrastre con vapor de agua o por extracción con disolventes (Wenqiang *et al.*, 2007). Es importante establecer que ninguna cantidad de mejoras en los aspectos tecnológicos compensará la mala calidad del material vegetal (SENA, 2012). Los métodos de obtención de los aceites esenciales determinan el uso de los mismos. El tipo de disolvente puede contaminarlos o limitar su uso, dependiendo de la toxicidad del disolvente y de las técnicas utilizadas para su eliminación (Peredo *et al.*, 2009).

Tipo de Método	Procedimiento	Productos obtenidos
Métodos directos	Extrusión	Aceites esenciales cítricos
	Exhudación	Gomas, resinas, bálsamos
Destilación	Directa	Aceites esenciales y aguas aromáticas
	Arrastre con vapor de agua	
	Destilación – maceración (liberación enzimática de agliconas en agua caliente)	
Extracción con solventes	Solventes volátiles	Infusiones y resinoides alcohólicos
		Concretos y absolutos
	Solventes fijos (grasas y aceites)	Absolutos de pomadas
		Absolutos de enflorados
	Extracción con fluidos en estado supercrítico	

Figura 3. Métodos de extracción de aceites esenciales (SENA, 2012).

La influencia del método de extracción y la labilidad química de los constituyentes del aceite esencial explica porque la composición del producto destilado es diferente de la composición inicial presente en los órganos secretores de la menta (Brunenton, 1995). Diversas investigaciones demuestran que la composición de los aceites esenciales y

extractos pueden variar de acuerdo al método de extracción utilizado. Aunque estas variaciones pueden no ser importantes, son detectables por técnicas sensibles como la cromatografía de gases. Las variaciones radican en diferencias en la proporción de los compuestos e incluso en diferencias en el número de los compuestos (Peredo *et al.*, 2009). La mayoría del aceite comercializado se obtiene por destilación por arrastre con vapor de agua (Court *et al.*, 1993). La destilación con agua o hidrodestilación consiste en poner a hervir agua en la cual se sumerge previamente el material vegetal con el objeto de que el vapor de agua ejerza su acción en el mayor número posible de partículas vegetales, es similar al arrastre con vapor, el vapor producido arrastra los aceites esenciales hasta otro apartado donde se condensan y se separan (SENA, 2012); una desventaja es que pueden ocurrir procesos colaterales debido a la temperatura que se emplea, ya que puede provocar que algunos compuestos presentes en las plantas se degraden y se pierdan, también puede ocurrir una polimerización y/o resinificación de los terpenos, así como una hidrólisis de esteres (SENA, 2012).

En el método de extracción con disolventes volátiles, la muestra se pone en contacto con disolventes orgánicos tales como alcohol, cloroformo, entre otros. Estos disolventes solubilizan la esencia pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una oleorresina o un extracto impuro (Peredo *et al.*, 2009). Algunos disolventes utilizados en este método de extracción tienen restricciones en cuanto a los residuos máximos que pueden dejarse cuando los aceites esenciales son la materia prima en las industrias de los perfumes o alimentos. Estos límites varían de acuerdo a las diferentes legislaciones (Ortuño, 2006). La selección del disolvente pretende que sea capaz de disolver rápidamente todos los principios y la menor cantidad de materia inerte, que tenga un punto de ebullición bajo y uniforme que permita

eliminarlo rápidamente pero evitando pérdidas por evaporación; químicamente inerte, para no reaccionar con los componentes de los aceites; no inflamable y barato. Este disolvente ideal no existe, y los más empleados son el éter de petróleo, con punto de ebullición de 30 a 70 °C, que se evapora fácilmente y es inflamable, benceno, que disuelve también ceras y pigmentos, y alcohol, que es soluble en agua (Arraiza, 2015). Los disolventes derivados del petróleo, como éter dietílico, ciclohexano, hexano, acetato de mentilo, propanol, etc., son tóxicos al inhalarlos y al contacto con la piel, y dependiendo del tiempo de exposición será la gravedad de los efectos. Los extractos obtenidos con este tipo de disolventes suelen ser más oscuros, ya que llegan a arrastrar algunos pigmentos, su solubilidad en alcohol diluido es menor y se recuperan muchos compuestos de tipo aromático. El disolvente con el aceite esencial se filtra y se evapora a presión atmosférica y/o a vacío. Los restos de disolvente deben separarse a temperatura baja (Ortuño, 2006). En este tipo de procedimientos se obtienen masas viscosas llamadas concretos que se obtienen de las plantas aromáticas frescas por extracción con disolventes apolares (hidrocarburos), tienen forma de semi-sólidos coloreados, libres del disolvente original (SENA, 2012). Según la materia prima que contienen el aceite esencial, se arrastran grandes cantidades de ceras, resinas y pigmentos que se eliminan realizando extracciones con alcohol, enfriando a temperaturas de -5 a -13 °C; a estas temperaturas las ceras se precipitan y se pueden remover por filtración y evaporando el alcohol (Ortuño, 2006; SENA, 2012). Los métodos más usados a nivel laboratorio son extracciones por reflujo y mediante equipo Soxhlet (Thongson *et al.*, 2004). Lo que hace un extractor Soxhlet es realizar un sinnúmero de extracciones de manera automática, con el mismo disolvente que se evapora y condensa llegando siempre de manera pura al material (Núñez, 2008). Los aceites

esenciales son recuperados evaporando el alcohol, generalmente en rotavapores (Chua *et al.*, 2008).

Una desventaja de estas técnicas de extracción es que se requieren largos tiempos de extracción, pueden contener residuos tóxicos de los disolventes, y puede ocurrir la degradación de los compuestos insaturados, originando compuestos que le pueden conferir mal sabor al aceite debido al calor (Khajeh *et al.*, 2003; Peredo *et al.*, 2009).

Una vez que se separa el aceite, el producto es relativamente estable para muchos meses, a condición de que se almacene fuera del alcance de la luz solar directa y lejos de fuentes de calor (DAFF, 2012). Cuando el almacenamiento de los aceites esenciales es el ideal, la mayoría se pueden preservar de 2 a 5 años (SENA, 2012). El aceite esencial de la menta se debe almacenar en un lugar fresco y seco hasta que se use; una vez abierto la refrigeración y el cierre hermético de la tapa prolongaran su vida útil (DAFF, 2012).

2.5.4 Análisis del aceite esencial

La técnica acoplada Cromatografía de Gases-Espectrometría de masas, permite obtener el espectro de masas de cada componente con el cual se obtiene el peso molecular e información estructural (Martínez, 2003). Debido a la diversidad de grupos funcionales que pueden estar presentes en los componentes mono y sesquiterpénicos de un aceite esencial no existe una prueba específica para su reconocimiento. Sin embargo existen unos pocos procedimientos experimentales que permiten reconocer algunos de ellos por su coloración con diferentes reactivos, su absorción de luz UV de 254 nm y su R_f en cromatografía en capa fina (Martínez, 2003). Los monoterpenos y sesquiterpenos en un buen número se pueden caracterizar químicamente a partir de los datos de cromatografía de gases y los espectros de masas tal como se anotó anteriormente, pero cuando existan

dudas de tal caracterización se recurre a los métodos espectrales como Infrarrojo, Ultravioleta y Resonancia Magnética Nuclear (Martínez, 2003).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización y establecimiento del experimento

El experimento se estableció en el ciclo verano-otoño de 2014 bajo condiciones de cubierta plástica en la Universidad Autónoma Chapingo en el municipio de Texcoco, Estado de México (19°30 Latitud Norte y 98°59 Longitud Oeste a 2,250 msnm). Se utilizaron plántulas de *Mentha x piperita* L. de 10 cm de altura compradas en la empresa Plántulas de Tetela, las cuales fueron trasplantadas en bolsas de polietileno negro (30 X 30 cm). Como sustrato se utilizó tezontle (granulometría de 1-6 mm) con una Dap de 0.8; una capacidad de aireación de 42.62 %; una capacidad de retención de humedad de 19.5 % y un espacio poroso de 63 %. El riego se hizo por goteo durante dos minutos tres veces por día y el pH del agua fue ajustado a 5.5 con ácido sulfúrico para todos los tratamientos y soluciones.

3.2 Factores de estudio

Se probaron las siguientes cinco fertilizaciones:

Para las fertilizaciones orgánicas se utilizaron 4 productos:

- Vermicomposta mezclada con tezontle en proporción 1:2 (v:v) respectivamente, cuyas características físico-químicas fueron: Dap 0.79 g·cm³; M.O. 37.34 %; pH 8.5; N 2.05 %; P 1.85 %; K 1.18 %; y con una relación C/N de 10.57.
- Composta convencional mezclada con tezontle en proporción 1:1 (v:v) cuyas características físico-químicas fueron: Dap 0.68 g·cm³; M.O. 23.9 %; pH 7.11; N 1.4 %; P 0.6 %; K 1.0 %; y con una relación C/N de 13.
- Biovital®850 ml mezclados con el tezontle, sólo en los primeros diez centímetros de la superficie, este es un fertilizante orgánico certificado por la

IFOAM procedente de biosólidos de la producción de levaduras, sus características químicas fueron: M. O. 55-60 %; pH 8.5; N 4.5 %; P 1.9 %; K 1.9 %; Ca 7 % y Mg 1.5 %.

- Lixiviado de lombriz al 2.5 % en el agua, con esta solución se aplicó el riego constante. Sus características químicas fueron: M. O. 35 %; pH 7; N 2.3 %; P 1.5 %; K 0.9 %; relación C/N 10. Como sustrato se utilizó tezontle.

Fertilización inorgánica:

- Solución Nutritiva Steiner (Steiner, 1984) y como sustrato se utilizó tezontle.

3.3 Control fitosanitario

Se emplearon productos biológicos para el control de plagas.

3.4 Tratamiento y diseño experimental

El diseño del experimento fue un completamente al azar con seis repeticiones, la unidad experimental estuvo constituida por 10 plantas.

3.5 Variables evaluadas

El contenido de clorofilas se realizó mediante la técnica descrita por Witham *et al.* (1971); también se tomaron lecturas SPAD de los estratos inferior y superior del vegetal con un medidor de SPAD Minolta 502 portátil, esto para la estimación indirecta del contenido de clorofila.

Altura de planta: se midió con una cinta métrica desde la base de la planta hasta la punta y se expresó en centímetros.

Peso fresco: se midió el peso de las plantas en gramos en una balanza analítica considerando solo el vástago, luego se separaron las láminas de hojas y se pesaron, y por diferencia con el peso fresco de la planta entera, se obtuvo el peso fresco de tallo.

Peso seco: se colocó el vástago, hojas y tallos por separado en una estufa de aire forzado a 50 °C por 72 h y luego se registró su peso en gramos.

Se cuantificó en gramos el contenido de los aceites esenciales obtenidos de los tratamientos. La extracción de los aceite esencial se hizo por dos horas mediante un equipo Soxhlet con éter de petróleo (Núñez, 2008), se evaporó el disolvente con un rotavapor y posteriormente para separar el aceite del concreto obtenido, las muestras se sometieron a una hidrodestilación (SENA, 2012) por dos horas más. Las muestras fueron almacenadas en frascos tipo vial, y conservadas en refrigeración hasta su análisis.

Mediante cromatografía de capa fina (CCF) de acuerdo a la metodología señalada por Wagner y Bladt (1996), se observaron 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 un cromatógrafo HP 6890 acoplado a un detector selectivo de masas HP 5973. El sistema cromatográfico uso una columna HP-5MS 30 x 0.250 mm y 0.25 μm de grosor de fase estacionaria. Para la separación de compuestos la temperatura del horno comenzó en 40 °C y aumento 5 °C min^{-1} hasta alcanzar 180 °C. Como gas acarreador se usó Helio con grado de pureza de 99.9 % en modo rampa de flujo, con flujo de 1 L min^{-1} por 16 min, para posteriormente aumentar a velocidad de 1 mL min^{-1} hasta 1.7 mL min^{-1} durante 4 min. La temperatura del puerto de inyección en modo splitless fue de 220 °C, y 280 °C como temperatura de interfase. Para el detector

de masas la temperatura de la fuente de iones fue de 230 °C y 250 °C para el cuadrupolo. La energía de ionización fue de 70 eV. La dilución de las muestras fue 1:1000 (v:v) en diclorometano, del cual se tomó 1 µL como volumen de inyección. Las separaciones e identificaciones se hicieron por triplicado. La identificación de los compuestos se hizo mediante la comparación de espectros de iones de la muestra y de la biblioteca NIST V. 2008. El compuesto mayoritario fue analizado mediante Resonancia Magnética Nuclear.

3.6Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza en los caracteres evaluados de acuerdo al diseño experimental completamente al azar con el programa estadístico SAS versión 9.0 (SAS Institute Inc., USA). Posteriormente se realizaron comparaciones de medias de Tukey ($P=0.05$) para los factores correspondientes. Finalmente se hizo un análisis de correlación lineal de Pearson a partir de las unidades SPAD y los contenidos de clorofila.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cultivo en menta se condujo sin complicaciones, la cosecha se realizó a los 120 días después del trasplante cuando las primeras flores aparecieron (Zheljazkov *et al.*, 2009; Hart *et al.*, 2010; Verma *et al.*, 2010). Los resultados del análisis de varianza (Cuadro 1) mostraron significancia estadística en la mayoría de las variables estudiadas, a excepción de la variable AP (altura de planta). En general los coeficientes de variación indican que los resultados son confiables.

Cuadro 1. Análisis de varianza de las variables morfológicas y de rendimiento de la menta, cultivadas con fertilización orgánica e inorgánica, mostrando los valores de los cuadrados medios de las variables evaluadas.

FV	GL	AP	PFH	PFA	PFT	PSH	PSA	PST	CC	CA
FF	4	62.2 ^{NS}	3601.7 ^{**}	16079.6 ^{**}	35240.1 ^{**}	348.5 ^{**}	1681.7 ^{**}	3644.9 ^{**}	0.50 [*]	1.99 ^{**}
ERROR	25	122.1	115.8	332.8	674.56	12.54	59.02	105.1	0.12	0.16
CV %		13.71	26.47	21.58	20.86	27.57	27.44	25.00	10.15	40.23

NS: No significativo; * y **, significativo ($P \leq 0.05$ y 0.01 , respectivamente); FV: Factor de variación; FF: Fuentes de Fertilización; CV: Coeficiente de variación; GL: Grados de Libertad; AP: Altura de Planta; PFH: Peso Fresco de Hojas; PFA: Peso Fresco de Tallos; PFT: Peso Fresco Total; PSH: Peso Seco de Hojas; PSA: Peso Seco de Tallos; PST: Peso Seco Total; CC: Contenido de Clorofilas; CA: Contenido de Aceite Esencial.

De modo general, las aplicaciones de las fertilizaciones no influyeron en la altura de las plantas de menta, es por esto que no se muestra la comparación de medias de esta variable, obteniendo una media general de 80.40 cm. Para explicar la significancia de las demás variables, en el Cuadro 2 se muestra las comparaciones de medias.

Cuadro2. Comparación de medias de las variedades estudiadas en la planta de la menta, cultivadas con fertilización orgánica e inorgánica.

FF	PFH gpl ⁻¹	PFA gpl ⁻¹	PFT gpl ⁻¹	PSH gpl ⁻¹	PSA gpl ⁻¹	PST gpl ⁻¹	CC mg g ⁻¹	CA g kg ⁻¹
1	52.23b ^z	107.43b	160.65b	16.21b	33.00b	49.22b	3.09b	0.73bc
2	77.13a	164.54a	241.67a	24.51a	54.96a	80.30a	3.42ab	1.85a
3	30.46c	54.65c	81.63c	9.62c	18.41c	28.02c	3.57ab	1.31ab
4	16.13c	37.19c	53.33c	5.37c	13.18c	18.55c	3.89a	0.48c
5	26.25c	58.83c	85.08c	8.52c	20.41bc	28.94c	3.53ab	0.60c
Media	40.44	84.53	124.47	12.85	27.99	41.00	3.50	0.99
DMSH _{0.05}	18.25	30.93	44.04	6.01	13.03	17.38	0.60	0.68

^zMedias con la misma letra dentro de columnas son iguales (Tukey, $P=0.05$); FF: Fuentes de Fertilización; 1: Biovital ®; 2: Solución Nutritiva Steiner; 3: Lixiviado de lombriz; 4: Composta; 5: Vermicomposta; AP: Altura de Plata; PFH: Peso Fresco de Hojas; PFA: Peso Fresco de Tallos; PFT: Peso Fresco Total; PSH: Peso Seco de Hojas; PSA: Peso Seco de Tallos; PST: Peso Seco Total; CC: Contenido de Clorofilas; CA: Contenido de Aceite Esencial; DMSH: Diferencia Mínima Significativa Honesta.

Las plantas cultivadas en la fuente de fertilización inorgánica (solución nutritiva Steiner) presentaron un aumento significativo en todas las variables evaluadas; de acuerdo con Mairapeytan *et al.* (1999) esto posiblemente se deba a la fertilización, es decir, a una relación más óptima de la nutrición mineral. El peso fresco total de la parte aérea aumentó un 50 % con respecto de la mejor fertilización orgánica (Biovital®) para esta variable. Este valor fue atribuido al vigor de las plantas, ya que la solución nutritiva Steiner favoreció la formación de numerosos estolones que originaron mayor cantidad de tallos y hojas. A esto, Zheljazkov 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.

En el caso de las fertilizaciones orgánicas como la vermicomposta y la composta, quizá pudo haberse presentado una retención de humedad excesiva en el material orgánico, que pudo haber afectado de manera negativa la absorción por la raíz, ya que las mentas no toleran los suelos anegados (Weller *et al.*, 1998), lo que podría explicar los bajos rendimientos de biomasa en estos tratamientos (Cuadro 2). En el tratamiento de la composta quizá ocurrió una mala mineralización de la materia orgánica y no se dio un balance nutrimental adecuado, por lo tanto, la absorción de los iones por parte del cultivo no fue la adecuada, ya que este tratamiento al principio mostraba plantas de crecimiento lento que presentaron un quemado en los bordes de las hojas que pudieron deberse a quemaduras por exceso de sales, y más tarde debido a deficiencias de potasio (Brown *et al.*, 2003); también presentaron una pigmentación purpura en los tallos y las hojas que se traducen a deficiencias de fósforo (Brown *et al.*, 2003).

La vermicomposta utilizada tenía las siguientes características, M.O. 37.34 %; N 2.05 %; P 1.85 %; K 1.18 %; Atiyeh *et al.* (2002) concluyen que la vermicomposta al sufrir una serie de transformaciones hace disponible cuatro veces más el nitrógeno, veinticinco veces más el fósforo y dos veces más el potasio; debido a esto, pudo haber ocurrido una fitotoxicidad por el exceso de nutrimentos disponibles para las plantas conforme esta se fue mineralizando; Romero *et al.* (2013) mencionan que niveles altos de fósforo pueden afectar el desarrollo de las plantas. El lixiviado de lombriz también presenta bajos valores en las variables de peso fresco, esto también pudo deberse a deficiencias en el cultivo ya que las plantas presentaron síntomas de deficiencias principalmente de nitrógeno de acuerdo con Brown *et al.* (2003), al manifestar una clorosis que empezaba en las hojas viejas y avanzaba hacia toda la planta. La fertilización con Biovital® fue la

que mayores rendimientos de biomasa mostró respecto de los tratamientos orgánicos, pero aun así existen diferencias altamente significativas respecto de la fertilización inorgánica en cuanto a las variables de peso fresco y seco, las plantas también mostraban síntomas de deficiencias, sobre todo de nitrógeno.

Para los resultados de las variables de la materia seca se aprecian los mismos efectos (Cuadro 2), la fertilización con la solución nutritiva Steiner dio significativamente mayor acumulación de materia seca tanto en hojas como en tallos, mientras que la fertilización con Biovital® nuevamente fue la que mayor acumulación de materia seca dio entre las fertilizaciones orgánicas. Jeliazkova *et al.* (1999) reportan una mayor acumulación de materia seca con el aumento de la tasa de aplicación de fertilizantes con nitrógeno, fósforo y potasio. Generalmente, altas tasas de aplicación de nitrógeno fueron asociadas con mayores rendimientos de biomasa (Zheljazkov y Cerven, 2009). En cualquier cultivo, la acumulación de materia seca es un índice fisiológico estrechamente relacionado con la actividad fotosintética de las hojas (Mahmoud, *et al.*, 2009).

Se observaron diferencias en las tonalidades de verde en las hojas entre los tratamientos por lo cual se tomaron lecturas SPAD y se ratificaron con los análisis del contenido de clorofila. Se ha reportado que la cantidad de clorofila y de nitrógeno total determinados por los métodos tradicionales en leguminosas, gramíneas, frutales y hortalizas presenta una alta correlación con las unidades SPAD (Revees *et al.*, 1993). El contenido de clorofila y la absorción de nitrógeno se han correlacionado con las unidades SPAD en diversas condiciones ambientales de intensidad luminosa, temperatura, humedad relativa, plagas, densidad de población, fuente de nitrógeno, entre otras (Hiderman *et al.*, 1992). Para la variable de contenido de clorofila (Cuadro 2), las hojas que presentaron

los mayores valores fueron las tratadas con la Composta, el Lixiviado de lombriz, la Vermicomposta y la Solución Nutritiva Steiner; los tratamientos que mostraron diferencias significativas fueron la Composta y Biovital®, ésta última con un menor contenido de clorofila; según los autores anteriores, esto puede significar una menor acumulación de nitrógeno en la planta, lo que explica los síntomas de clorosis observados, ya que este tratamiento fue el que mostro más síntomas por deficiencias de este nutrimento. Sin embargo, los contenidos de clorofila en las hojas no se asociaron con los mayores rendimientos, lo que indica la necesidad de conocer la distribución que la planta hace de la energía generada y la función que tienen dichos pigmentos en los procesos metabólicos y el rendimiento.

Las unidades SPAD mostraron valores mayores conforme aumentó el contenido de clorofila, de tal forma que el valor más bajo (22.98) se obtuvo con las hojas de un tono verde más claro y el más alto (47.58) con las hojas verdes más oscuras. Se encontró una correlación altamente significativa ($r=0.94$) entre el aumento de las unidades SPAD y el contenido de clorofila (Figura 4), lo cual presenta una gran ventaja al poder sustituir la determinación de clorofila por el método tradicional (que es un método destructible) por la simple lectura de unidades SPAD. Estos resultados son similares a los reportados por Marquadt y Tipton (1987), quienes aplicaron este mismo estudio a 12 cultivos de hortalizas, leguminosas, flores y frutales.

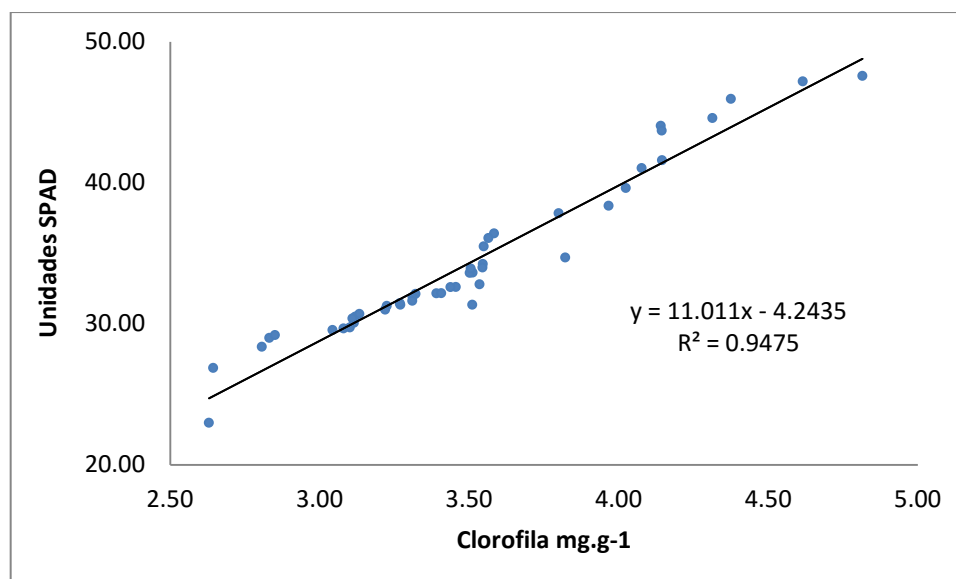


Figura 4. Correlación entre unidades SPAD y contenido de clorofila en plantas de menta

Respecto al contenido de aceite esencial (Cuadro 2), los tratamientos que mostraron mayores resultados fueron las plantas fertilizadas con la solución Steiner y con el lixiviado de lombriz. Al respecto, se ha reportado que el rendimiento de aceites esenciales, depende del incremento en área foliar y de tricomas glandulares (Jeliazkova *et al.*, 1999) lo cual concuerda con la fertilización con la solución Steiner y las otras fertilizaciones orgánicas que presentaron mayores y menores rendimientos en las hojas, respectivamente. Para el caso de la fertilización con el lixiviado de lombriz, quizá estos resultados se deban a que la planta bajo este tratamiento tuvo una mejor asimilación de P y de Zn, ya que estos elementos son requeridos para la formación de precursores de aceites esenciales (Misra *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2010), no se cuenta con datos de análisis nutrimentales, pero se intuye que debido a esto, el contenido de aceite esencial se incrementó con este tratamiento. Por otro lado, el alto CV (Cuadro 1) puede también indicar que hubo algún error en la extracción del aceite.

Para la identificación del mentol, uno de los principales objetivos de este trabajo, preliminarmente se realizó una Cromatografía de Capa Fina (Figura 5) donde no se detectó mentol en los componentes de la muestra. Con el número I a las orillas, se observa cómo el testigo (Menthol, 99.9%) manifiesta una coloración morada y un Rf de 0.22, mientras que ninguna de las accesiones presentan una coloración con un Rf similar. Por otro lado, se aprecia claramente que las accesiones comparten tres compuestos en común: II con un color café oscuro y un Rf de 0.39; III con un color amarillo y un Rf de 0.51 y IV con un color morado y un Rf de 0.89.

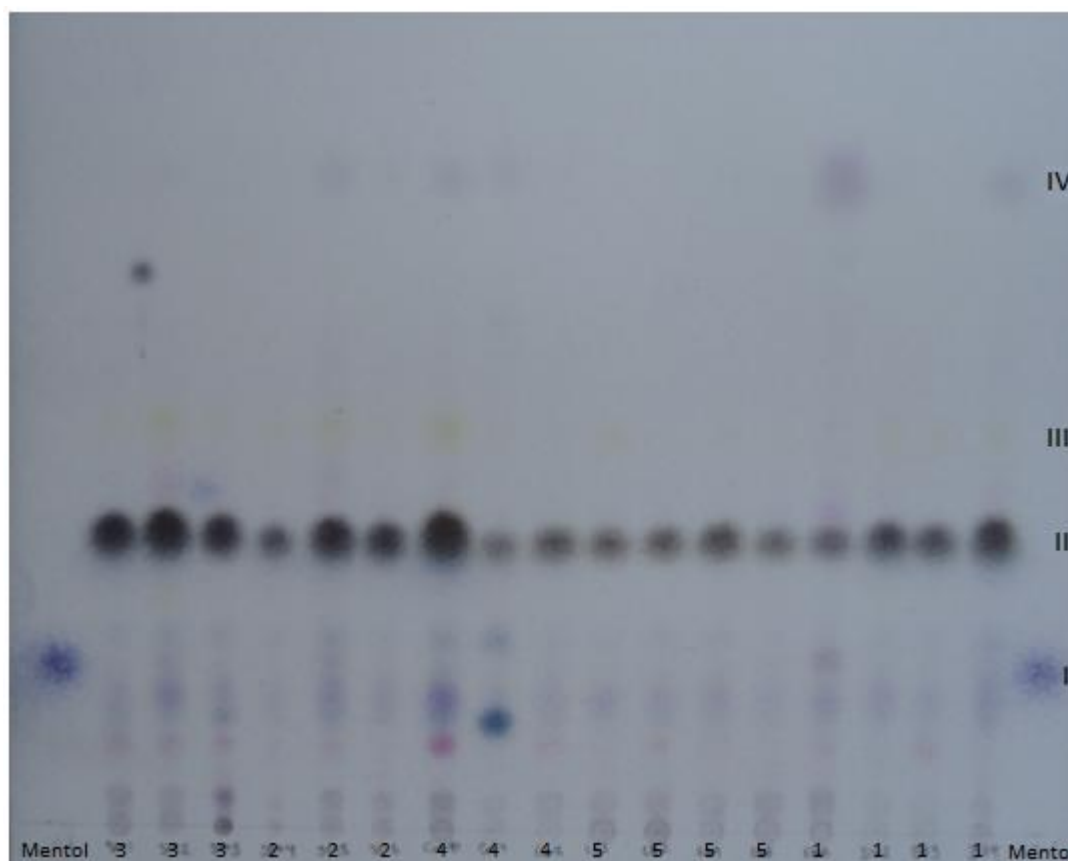


Figura 5. Cromatograma de accesiones de aceite esencial de menta 1: Biovital ®; 2: Solución Nutritiva Steiner; 3: Lixiviado de lombriz; 4: Composta; 5: Vermicomposta.

El análisis de Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-EM) detectó la presencia de mirceno (Tr 9.02), eucaliptol (Tr 10.09), limoneno (Tr 10.11), linalol (Tr

12.18), mentona (Tr 14.08), óxido de piperitona (Tr 16.65) y chavivetol (Tr19.23), los cuales fueron identificados en función del tiempo de retención (Rt) y de acuerdo a la biblioteca de espectros NIST V. 2008; estos componentes se encontraban en cantidades muy pequeñas, y por tal motivo no fueron analizadas estadísticamente. El análisis cromatográfico tampoco detectó la presencia de mentol; lo que pudo deberse a una degradación del componente durante la obtención del aceite; SENA (2012) reporta que la hidrodestilación presenta la desventaja de que pueden ocurrir procesos colaterales debido a la temperatura que se emplea, ya que puede provocar que algunos compuestos presentes en las plantas se degraden y se pierdan; también puede ocurrir una polimerización y/o resinificación de los terpenos; así como una hidrólisis de esterés. También es posible que el contenido de mentol fuera afectado por la fuente de fertilización (Scavroni *et al.*, 2005; Valmorbida y Fernandes, 2007; Jiménez, *et al.*, 2012). Otro factor a considerar es la edad de la planta, 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. Además, se encontró que el aceite obtenido de la menta cosechada en etapa tardía, casi siempre tenían bajas concentraciones de otros componentes como el α -pineno, β -mirceno, sabineno, entre otros, esto es atribuible a la pérdida de follaje (Court *et al.*, 1993).

Sin embargo, la GC-EM detectó un compuesto mayoritario (77 %) presente en todas las muestras, el cual no fue identificado por la biblioteca de espectros. El compuesto se aisló y se analizó mediante resonancia magnética nuclear (RMN), en el espectro se puede observar que es un compuesto fenólico (Anexo 1), pero tampoco se logró identificar.

V. CONCLUSIONES

La solución nutritiva Steiner produjo el mayor rendimiento de biomasa, demostrando que la menta se puede cultivar satisfactoriamente bajo invernadero en Texcoco de Mora, obteniendo excelentes rendimientos ($21.4 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$) con esta fertilización inorgánica.

Entre las fertilizaciones orgánicas, Biovital® fue el mejor tratamiento para las variables de rendimiento de biomasa.

Para el contenido de clorofila, los tratamientos que mostraron diferencias significativas fueron la Composta y Biovital®, con el mayor ($3.89 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) y menor ($3.09 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) contenido, respectivamente.

Se encontró una alta correlación entre el contenido de clorofila y las unidades SPAD ($R^2=0.94$).

La solución nutritiva Steiner y el lixiviado de lombriz produjeron los mayores contenidos de aceite esencial en menta.

Las fuentes de fertilización utilizadas en este experimento no tuvieron efecto significativo en la composición del aceite esencial de la menta.

VI. LITERATURA CITADA

- Alankar, S. 2009. A review on peppermint oil. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 2: 27-33.
- Alarcón, A.; Ferrera C., R. 2000. Biofertilizantes y utilización en la agricultura. Agricultura Técnica en México 26(2): 191:203.
- Alfasar, S. M.; Al-Hassan M., Y. 2009. Effect of nitrogen and phosphorus fertilizers on growth and oil yield of indigenous mint (*Mentha longifolia* L.). Biotechnology 8(3): 380-384.
- Altieri, M.; Nicholls, C. I. 2000. Teoría y práctica para una agricultura sustentable. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Red de Formación Ambiental para America Latina y el Caribe. México, D. F. 257 p.
- Arancon, N. Q.; Edwards, C. A.; Lee, S.; Byrne, R. 2006. Effects of humic acids from vermicomposts on plant growth. European Journal of Soil Biology 42: S65-S69.
- Arzani, A.; Zeinadi, H.; Razmjo, K. 2007. Iron and magnesium concentrations of mint accessions (*Mentha* spp.). Plant Physiology and Biochemistry 45: 323-329.
- Arraiza B., M. P. 2015. Uso industrial de plantas aromáticas y medicinales. Universidad Politécnica de Madrid. [Consultado septiembre de 2015]. Disponible en: <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema7.pdf>

- Atiyeh, R. M.; Lee, S.; Edwards, C. A.; Arancon, N. Q.; Metzger, J. D. 2002. The influence of humic acids derived from earthworm processed organic wastes on plant growth. *Biores. Technol.* 84: 7-14.
- Ávalos G., A.; Pérez-Urria C., E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)* 2(3): 119-145.
- Betancourt A., S. Y.; Gutiérrez, D. M. A. 1999. Proyecto mercados verdes herbolarios. Informe Técnico Final. Fondo de América del Norte para la Cooperación Ambiental (FANCA), Ecología y desarrollo de Tlaxcala y Puebla A. C. México, D.F. 250 p.
- Blumenthal, M.; Goldberg, A.; Brinckmann, J. 2000. Herbal Medicine: Expanded Commission e Monographs. Integrative Medicine Communications. Newton, MA. 519 p.
- Bojórquez, F. 2006. Tendencias orgánicas. Productores de hortalizas 1: 82-84.
- Brown, B.; Hart, J. M.; Wescott, M. P.; Christensen, N.W. 2003. The critical role of nutrient management in mint production. *Better Crops with Plant Food* 87(4): 9-11.
- Bruneton, J. 1995. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. Lavoisier Publ. Londres, New York, Paris 466 p.
- Burbott, J. A.; Loomis, W. D. 1967. Effects of light and temperature on the monoterpenes of peppermint. *Plant Physiology* 42: 20-28.

- Clark, R. J.; Menary, R. C. 1979. The importance of harvest date and plant density on the yield and quality of Tasmanian peppermint oil. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 104:702–706.
- Clark, R. J.; Menary, R. C. 1981. Variations in composition of peppermint oil in relation to production areas. *Economic Botany* 35(1): 59–69.
- Chua, M. T.; Tung, Y.; Chang, S. T. 2008. Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinamomum osmophloeum*. *Bioresource Technology* 99: 1918-1925.
- Correa M., P. 1984. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Imprensa Nacional Rio de Janeiro. 765 p.
- Court, W. A.; Roy, R. C.; Pocs, R. 1993. Effect of harvest date on the yield and quality of the essential oil of peppermint. *Can. J. Plant Sci.* 73: 815-824.
- Craker, L. E. 1999. Trends in medicinal and aromatic plant production in the United States. *Acta Horticulturae* 502: 71-75.
- Croteau, B. R.; Davis M., E.; Ringer L., K.; Wildung R., M. 2005. (-)-Menthol biosynthesis and molecular genetics. *Naturwissenschaften* 92: 562-577.
- Dadkhah, A. R.; Kafi, M.; Rasam, G. H. 2009. The effect of planting date and plant density on growth traits, yield quality and quantity of matricaria (*Matricaria chamomilla*). *Journal of Horticulture Science* 23(2): 100-107.
- Department of Agriculture, Forestry and Fisheries (DAFF). 2012. Peppermint production. 2^{sd} ed. Directorate Communication Services. Pretoria, 0001 South África 22p.

- Daramola, O.S. 2011. Effects of organic fertilizers on growth and yield of mint (*Mentha piperita*). Trans. Br-Mycol. Soc. 55(1): 58-61.
- Davis, M. E.; Ringer, K. L.; McKonkey, M. E.; Croteau, R. 2005. Monoterpene metabolism cloning, expression, and characterization of menthone reductases from peppermint. Plant Physiology 137: 873-881.
- Dwivedi, S.; Khan, M.; Srivastava, S. K.; Syamasunnder, K.V.; Srivastava, A. 2004. Essential oil composition of different accessions of *Mentha x piperita* L. grown on the northern plains of India. Flavour and Fragrance Journal 19: 437-440.
- Erum, S.; Naeemullah, M.; Masood, S. 2012. Phenotypic variation among mentha spp. Pakistan J. Agric. Res 25(1): 55-62.
- Gupta, R.; Gulati, B. C.; Duhan, S. P. S.; Bhattacharya, A. K. 1971. Quality of oil of peppermint and spearmint crops introduced in Tarai Region of U. P. (*M. piperita* and *M. spicata*). Agric. Agro-ind 4: 33-40.
- Hart, J. M.; Sullivan, D. M.; Mellbye, M. E.; Hulting, A. G.; Christensen, N. W.; Gingrich, G. A. 2010. Peppermint (Western Oregon) nutrient management guide. Oregon State University. Oregon, USA. 18 p.
- Hiderman, J.; Makino, A.; Kurita, Y.; Masa, T.; Ojima, K. 1992. Changes in the level of chlorophyll and light-harvesting chlorophyll a/b protein of PS II in senescence. Plant Cell Physiology 53: 1209-1214.
- Jiménez A., A. E.; Rodríguez M., M. A.; López A., P. L.; López M., L.; Gutiérrez M., F. A.; Arias C.; C. 2012. Efecto de macronutrientes en la acumulación de (-) mentol

- en el aceite esencial de menta (*Mentha piperita* L.) cultivado *in vitro* e invernadero. Gayana Bot. 69: 101-108.
- Jeliazkova, E. A.; Zheljazkov, V. D.; Craker, L. E.; Yankov, B.; Georgieva, T. 1999. N P K fertilizer and yields of peppermint, *Mentha x piperita*. Acta Horticulturae 502: 236-240.
- Juárez, R. C. R.; Aguilar, C. J. A.; Juárez, R. M. E.; Bugarín, M.R.; Juárez, L.P.; Cruz C.E. 2013. Hierbas aromáticas y medicinales en México: tradición e innovación. Revista Bio Ciencias 2(3): 119-129.
- Khajeh, M.; Yamini, Y.; Sefidkon, F.; Bahramifar, N. 2003. Comparision of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. Food Chemistry 86: 587-591.
- Khanuja, S. P. S.; Shasany, A. K.; Srivastava, A.; Kumar, S. 2000. Assessment of genetic retalionships in *Mentha* species. Euphytica 111: 121-125.
- Kumar, A.; Patro, H. K.; Kewalanand. 2010. Effect of zinc and sulphur on herb, oil yield and quality of menthol mint (*Mentha arvensis* L.) var. Kosi. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research 2(4): 642-648.
- López, I. L. A. 2011. Aromático negocio. El Economista [Consultado mayo 2014].
Disponible en:<http://eleconomista.com.mx/columnas/agronegocios/2011/05/04/aromatico-negocio>.

- Mahmoud, S. S.; Croteau, R. B. 2003. Menthofuran regulates essential oil biosynthesis in peppermint by controlling a downstream monoterpene reductase. PNAS 100(24): 14481-14486.
- Mairapeytan, S. K.; Tadevoisan, A. H.; Alexanya, S. S.; Stepanyan, B. T. 1999. Optimization of the N: P: K ratio in the nutrient medium of some soilless aromatic plants. Acta Horticulturae 502: 29-32.
- Mansoori, I. 2014. The effect of plant density and harvesting time on growth and essential oil of peppermint (*Mentha piperita* L.). Journal of Medical and Bioengineering 3(2): 113-116.
- Maracajá B., P.; Sousa H., A.; Marques C., F. 2007. Crecimiento de plantas de hierba buena en varias dosis de vermicompost en dos tipos de suelos. Centro Agrícola 34(4): 61-64.
- Martínez M., A. 2003. Aceites esenciales. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín, Colombia. 34 p.
- Marquard, D. R.; Tipton, J. L. 1987. Relationship between extractable chlorophyll and on *in situ* method to estimate leaf greenness. Hort Sciences 22: 1327.
- McConkey, M. E.; Gershenzon, J.; Croteau, R. B. 2000. Developmental regulation on monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of peppermint. Plant Physiology 122: 215-223.

- Mckay, D. L.; Blumberg, J. B. 2006. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research* 20: 619-633.
- Mengesha K., B.; Teixeira S., J. A.; Abate M., S. 2011. Agronomic characters, leaf and essential oil yield of peppermint (*Mentha piperita* L.) as influenced by harvesting age and row spacing. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* 5(1): 49-53.
- Mint Industry Research Council. 2009. [Consultado mayo 2014]. Disponible en: <http://usmintindustry.org/>
- Misra, A.; Srivastava, N. K. 2000. Influence of water stress on japanese mint. *Journal of Herb, Spices and Medicinal Plants* 7(1): 51-58.
- Mitchell, A. R; Farris, N. A. 1996. Peppermint response to nitrogen fertilizer in an arid climate. *Plant Nutrition* 19: 955–967.
- Naghdi, B. H. D.; Yazdani, A.S. M.; Nazari, F. 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.
- Nair, A.; Ngouajio, M.; Biernbaum, J. 2012. Trasplantes orgánicos. *Productores de Hortalizas* 6: 12-14.
- Nilofer; Anil, K. S.; Saudan, S.; Gangwar, S. P.; Man, S.; Rupal, S.; Anju, Y. 2015. Effect of weather conditions on growth, yield and quality of menthol mint

- (*Mentha arvensis* L.) cultivars transplanted in different years on different dates under sub-tropical climate of North India. IJAAR 6(2): 82-88.
- Núñez, C. E. 2008. Extracciones con Soxhlet. [Consultado octubre 2015]. Disponible en: <http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-extraccinconequiposoxhlet.pdf>
- Ortuño, M. F. 2006. Manual Práctico de Aceites Esenciales, Aromas y Perfumes. Aiyana. España. 274 p.
- Peredo L., H. A.; Palau G., E.; López M., A. 2009. Aceites esenciales: métodos de extracción. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos 3(1): 24-32.
- Pirolí E., L.; Bordin A., F.; Schumacher M., V. 1996. Desenvolvimento de mudas repicadas de *Cordia trichotoma* em diferentes dosagens de vermicomposto. O Ambiente da Floresta 1: 29-32.
- Ramos E., R.; Fernandes L., A.; Marques C., C.; Silva D., D.; Palmeira C., M.; Martines R., E. 2005. Produção de matéria seca e óleo essencial de menta sob diferentes doses de fósforo. Revista Brasileira de Plantas Medicinais Botucatu 8(1): 9-12.
- Reeves, W. D.; Mask, P. L.; Wood, C. W.; Delay, D. P. 1993. Determination of wheat nitrogen status with a handheld chlorophyll meter. Influence of management practices. Plant Nutrition 16: 7781-7796.
- Reitsema, R. H. 1958. A biogenetic arrangement of mint species. Journal of the American Association 47(4): 267-269.
- Rios E., R.; Turner W., G.; Lee M., J.; Croteau B., R.; Markus L., B. 2007. A systems biology approach identifies the biochemical mechanisms regulating

- monoterpenoid essential oil composition in peppermint. PNAS 105(8): 2818-2823.
- Rohloff, J.; Dragland, R. M.; Iversen, T. H. 2005. Effect of harvest time and drying method on biomass production, essential oil yield and quality of peppermint (*Mentha x piperita* L.). Journal of Agriculture and Food Chemistry 53: 4143-4148.
- Romero F., J. C.; Rodríguez M., M. N.; Gutiérrez C.; M. C.; Sánchez E., J. 2013. Vermicompost como sustrato en la producción de menta (*Mentha piperita* L.) Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 5: 889-899.
- Ruiz del Castillo, M. L.; Santa M., G.; Herraiz, M.; Blanch P., G. 2003. A comparative study of the ability of different techniques to extract menthol from *Mentha piperita*. Journal of Chromatographic Science 41: 385-389.
- Sachan K., A.; Das R., D.; Shuaib, M.; Gangwar S., S. 2013. An overview on menthae piperithae (peppermint oil). International Journal of Farmaceutical, Chemical and Biological Sciences 3(3): 843-838.
- Sánchez E., J.; Rodríguez M., M. N.; Sánchez R., C. V.; Fernández L., F. 2008. Abonos Orgánicos. Ediciones Papiro Omega, S.A. de C.V. México, D. F. 139 p.
- Sánchez V., C.; Lucero F., J. M. 2012. Nichos de Mercado de Especies Aromáticas Tipo Gourmet. Edit. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, Baja California Sur, México. 72 p.
- SAS Institute. 1999. Statistical analysis system. Release 8.1. Cary NC. USA.

- Scavroni, J.; Boaro, C. S. F.; Marques, M. O. M.; Ferreira L. C. 2005. Yield and composition of the essential oil of *Mentha piperita* L. (*Lamiaceae*) grown with biosolid. *Plant Physiology* 17: 345–352.
- SENA. 2012. Introducción a la Industria de los Aceites Esenciales de Plantas Medicinales y Aromáticas. NaturAEsén, Incubar. Colombia, Bogotá. 86 p.
- SIAP. 2014. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [Consultado Mayo 2014]. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/>
- Sha, S. C.; Gupta, L. K. 1989. Response of mentha species to different harvesting intervals. *Progressive Horticulture* 21: 148-150.
- Shazia, E.; Muhammad N.; Shahid, M. 2012. Phenotypic variation among mentha ssp. *Pakistan Journal of Agricultural Research* 25(1): 55-62.
- Singh, A. K. 1986. Cultivation of Japanese mint in India. *Indian Foreign Review* 23(16): 54-62.
- Sousa A.; H.; VasconcelosW., E.; Barros J., A. P.; Silveira L., M; Freitas R., S. 2003. Produção de biomassa na parte aérea da erva cidreira (*Melissa spp.*) em função de doses de esterco bovino, húmus de minoca, composto orgânico e N P K em casa de vegetação. *Revista de Biologia e Ciências da Terra* 3(2): 1-11.
- Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution. *Proceeding sixth international congress on soilless culture*. Wageningen, The Netherlands pp 533-650.
- Taiz, L.; Zeiger, E. 1998. *Plant Physiology*. 2nd ed. University of California. Sinauer Associates, Inc., Publishers. 792 p.

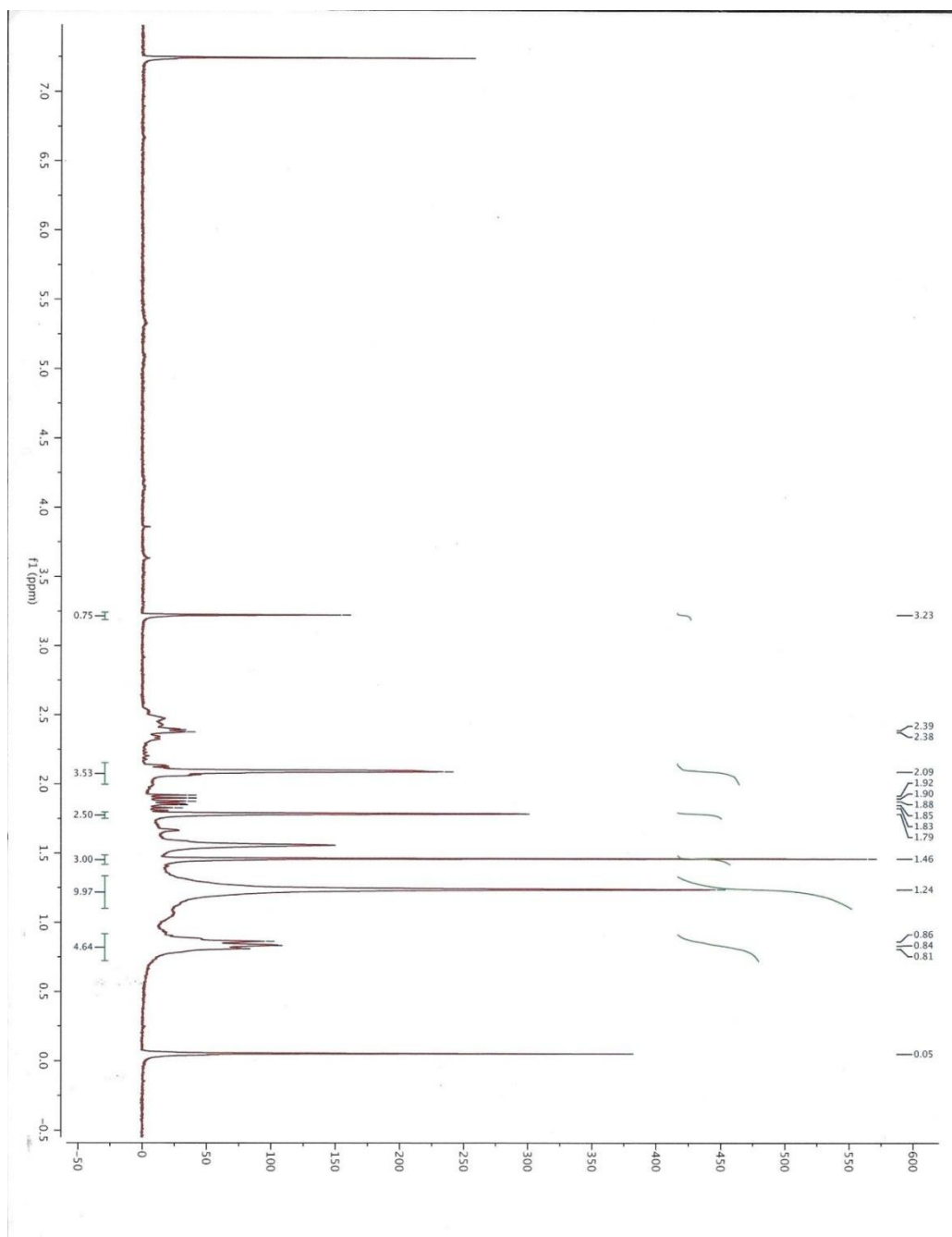
- Telci, I.; Kacar, O.; Bayram, E.; Arabaci, O.; Dermirtas, I.; Yilmaz, G.; Özcan, I.; Sönmez, Ç.; Göksu, E. 2011. The effect of ecological conditions on yield and quality traits of selected peppermint (*Mentha piperita* L.) clones. *Industrial Crops and Products* 34: 1193-1197.
- Thongson, C.; Davidson, P. M.; Mahakarnchanakul, W.; Weiss, J. 2004. Antimicrobial activity of ultrasound-assisted solvent-extracted species. *Letters in Applied Microbiology* 39: 401-406.
- Topalov, V.D. 1962. *Essential Oil and Medicinal Plants*. V.D. ed. Hr. G. Danov Press Plovdiv, Bulgaria pp 106–153.
- Trinidad S., A. 2000. *Abonos orgánicos*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación y Colegio de Postgraduados. Texcoco, México. 8 p.
- Turner, G.; Gerchenzon, J.; Nielson, E. E.; Froehlich, J.E.; Croteau, R. 1999. Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplast of oil gland secretory cells. *Plant Physiology* 120: 879-886.
- Valdrighi, M. M.; Pera, A.; Agnolucci, M.; Fressinetti, S.; Lunardi, D.; Vallini, G. 1996. Effects of compost-derived humic acids on vegetables biomass production and microbial growth within a plant (*Cichorium intybus*)-soil system: a comparative study. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 58: 133-144.

- Valmorbida, A.; Fernandes B., C. S. 2007. Growth and development of *Mentha piperita* L. in nutrient solution as affected by rates of potassium. Brazilian Archives of Biology and Technology 50(3): 379-384.
- Virmani, O. P.; Datta, S. C. 1968. Seasonal variation on the oil of peppermint at Lucknow. Perf. Essent. Oil Rec. 59: 272-274.
- Verma, R. S.; Rahman, L.; Verma, R. K.; Chauhan, A.; Yadav, A. K.; Singh, A. 2010. Essential oil composition of menthol mint (*Mentha arvensis*) and peppermint (*Mentha piperita*) cultivars at different stages of the plant growth from Kumaon region of Western Himalaya. Journal of Medicinal and Aromatics Plants 1(1): 13-18.
- Vogel H., L. M.; Schumacher M., V.; Barichelo L., R.; Oliveira L., S.; Caldeira M., W. V. 2001. Utilização de vermicomposto no crescimento de mudas de *Hovenia dulcis* Thunberg. Ciência Florestal 11(1): 21-27.
- Wagner, H.; Bladt, S. 1996. Plant Drug Analysis. Springer Verlag. Berlin 384p.
- Wajid, A.; Hussain, A.; Ahmad, A.; Rafiq, M.; Goheer, A. R.; Ibrahim, M. 2004. Effect of sowing date and plant density on growth, light interception and yield of wheat under semi arid conditions. International Journal of Agriculture and Biology 6: 1119-1123.
- Weller, S.; Green, R. Jr.; Janssen, C.; Whitford, F. 1998. Mint production and pest management in Indiana. Purdue Pesticide Programs. West Lafayette, IN. 16p.

- Wenqiang, G.; Shufen, L. I.; Ruixiang, Y.; Shaokun, T.; Can, Q. 2007. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chemistry* 101: 1558-1564.
- WHO. 2002. WHO Monographs On Selected Medicinal Plants. World Health Organization Vol. 2. Geneva pp 188-198.
- Witham F., H.; BLAYDES D., F.; DEVLIN R., M. 1971. Experiments in Plant Physiology. Van Nostrand Reinhold Company. N. Y. 245 p.
- Yáñez R., X.; Lugo M., L. L.; Parada P., D. Y. 2007. Estudio del aceite esencial de la cáscara de la naranja dulce (*Citrus sinensis*, variedad Valenciana) cultivada en Labateca (norte de Santander, Colombia). *Bistua* 5(1): 3-8.
- Zamorano, U.J.; Ríos, S. H. 2004. Importancia y perspectiva de los productos no tradicionales. *Claridades Agropecuarias* 132: 3-19.
- Zheljazkov, V. D.; Margina, A. 1996. Effect of increasing dosis of fertilizer application on quantitative and qualitative characters of mint. *Acta Horticulturae* 426: 579–584.
- Zheljazkov, V. D. 2005. Assessment of wool-waste and hair-waste as soil amendment and nutrient source. *J. Environ. Qual.* 34:2310–2317.
- Zheljazkov, V. D.; Cerven, V.; Charles, L. C.; Wayne, M.E.; Thomas, O. 2009. Effect of nitrogen, location, and harvesting stage on peppermint productivity, oil content, and oil composition. *Hort Science* 44(5): 1267-1270.

Zhu, N. 2007. Effect of low initial C/N ratio on aerobic composting of swine manure with rice straw. *Biores. Technol.* 98: 9-13.

VII. ANEXOS



Anexo 1. Espectro de RMN de un compuesto no identificado del aceite esencial de menta