

Rendimiento y composición de aceite esencial de *Lippia alba* (Fam. Verbenaceae) quimiotipo carvona cultivada con diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo.

Julieta Constanza Ortiz Fernández

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2011**

Rendimiento y composición de aceite esencial de *Lippia alba* (Fam. Verbenaceae) quimiotipo carvona cultivada con diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo.

Julieta Constanza Ortiz Fernández

Trabajo de Investigación para optar por el título de Bióloga.

Directores:

Profesor. Cesar Marín, M.Sc

Profesora. Elena E. Stashenko, Ph.D.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2011**

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	10
1. DISEÑO METODOLÓGICO	14
1.1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	14
1.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	15
1.3. TRATAMIENTO	15
1.4. PARÁMETROS MORFOLÓGICOS Y DE CRECIMIENTO.....	15
1.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	16
1.6. EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL	16
1.7. ANÁLISIS POR GC-MS DE COMPONENTES VOLÁTILES	17
1.8. ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL ACEITE ESENCIAL.....	17
2. RESULTADOS.....	19
3. DISCUSIÓN	21
4. CONCLUSIONES	24
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	30

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1 PCA de las variables morfológicas y de asignación de biomasa y su relación con el rendimiento	25
Figura 1.2. Representación de los pesos de los componentes principales.	25
Figura 2.1. Relación área foliar en los diferentes tratamientos con nitrógeno y fósforo.	26
Figura 2.2. Relación masa seca de las raíz en los diferentes tratamientos con nitrógeno y fósforo.	26
Figura 2.3. Relación masa seca de las hojas en los diferentes tratamientos con nitrógeno y fósforo.	27
Figura 2.4. Relación masa seca total en los diferentes tratamientos con nitrógeno y fósforo.	27
Figura 3.1. Relación rendimiento % (p/p) del aceite esencial con los diferentes tratamientos de nitrógeno y fósforo.	28
Figura 3.2. Relación cantidad relativa de los componentes mayoritarios en el aceite esencial en plantas cultivadas bajo los diferentes tratamientos con nitrógeno y fósforo	28
Figura 3.3. Perfil Cromatográfico del AE de <i>Lippia alba</i> .	29

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 3.1 Contenido Relativo de los componentes mayoritarios del AE de <i>Lippia alba</i>	29

RESUMEN

Título: Rendimiento y composición de aceite esencial de *Lippia alba* (Fam. Verbenaceae) quimiotipo carvona cultivada con diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo.

Autor: Julieta Constanza Ortiz Fernandez**

Palabras clave: *Lippia alba*, nitrógeno, fósforo, metabolitos secundarios, terpenos, carbono, CO₂, fotosíntesis, limoneno, carvona.

Setecientos clones de *Lippia alba* se sometieron a siete tratamientos, variando la concentración en la relación nitrógeno (0.3, 1, 2.5 mM)/fósforo (0.3, 0.5, 0.7 mM) evaluando la interacción de estos nutrientes combinando las tres dosis. Se analizó su efecto sobre el rendimiento y la composición del aceite esencial (AE) de *Lippia alba* Mill N.E (Verbenaceae), quimiotipo carvona, usando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) para el análisis de los componentes volátiles del aceite. Su extracción se realizó por el método de hidrodestilación asistida por radiación microondas (MWHM). Se estudiaron también los efectos en algunas características morfológicas y de biomasa en la planta.

Se presentaron diferencias en el rendimiento del aceite esencial, pero no en el contenido relativo de sus compuestos mayoritarios, e.g. limoneno, carvona y biciclosesquifelandreno, es decir, no se alteró la calidad del aceite. Las relaciones N/P que permitieron una mayor producción del aceite fueron: 2,5 mM Ca (NO₃)₂ - 0,3 mM KH₂PO₄, 1 mM Ca (NO₃)₂ - 0,3 mM KH₂PO₄, debido a que el nitrógeno incrementa la ganancia de carbono en la planta, pero la deficiencia de fósforo varía la respuesta de la fotosíntesis al CO₂ intercelular, lo cual está relacionado con la acumulación de terpenos en las plantas.

En cuanto a la morfología, se encontró diferencia significativa en el área foliar, por la influencia del nitrógeno, no hubo diferencias significativas en la longitud de la raíz, tallo, ramas y en el número de hojas, debido al tiempo de experimentación y a los rangos utilizados entre los nutrientes. En la biomasa total y masa seca de la raíz se presentaron diferencias significativas, posiblemente por la acumulación de almidón en los tratamientos con menor concentración de fósforo y mayor concentración de nitrógeno, en la biomasa de las hojas la diferencia fue generada por el nitrógeno.

*Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Cesar Marín – Elena Stashenko.

SUMMARY

Title: Yield and composition of *Lippia alba* essential oil (Fam. Verbenaceae) carvone chemotype growing with different nitrogen and phosphorus concentrations.*

Author: Julieta Constanza Ortiz Fernandez**

Keywords: *Lippia alba*, nitrogen and phosphorus, secondary metabolites, terpenes, carbon, CO₂, photosynthesis, limonene, carvone.

Seven hundred *L. alba* clones were subjected to seven treatments, combining three different doses of nitrogen (0,3, 1, 2,5 mM)/ phosphorus (0,3, 0,5, 0,7 mM) concentration to evaluate the nutrients interaction leading to the yield and composition analysis on the essential oil of *Lippia alba* Mill N.E (Verbenaceae) chemotype carvone, to this purpose gas chromatography coupled mass spectrometry was used to analyze the essential oil composition obtained by microwave-assisted hydrodistillation (MWHHD). Some morphological and biomass effects in the plant were studied.

There were differences in essential oil quantity but there were not changes in the relative quantity in mainly compounds, e.g. limonene, carvone and bicyclosesquiphellandrene, i.e. the different concentrations of nitrogen and phosphorus did not modify the essential oil quality. The N/R ratios allowed to higher essential oil yield were 2,5 mM Ca(NO₃) – 0,3 mM KH₂PO₄, 1 mM Ca(NO₃)₂ – 0,3 mM KH₂PO₄, it possibly due to the nitrogen which increases the carbon gain in the plant but phosphorus deficiency changes the response of photosynthesis to intercellular CO₂, which is related to the accumulation of terpenes in plants.

In morphology terms, significant difference on leaf area was found, mainly because of nitrogen influence. There were not significant differences in the length of the root, stem, branches and leaves number it due to the time of experimentation and ranges used between nutrients.

The total biomass and root dry mass were significant different between treatments, possibly by the accumulation of starch in the treatments with lower concentrations of phosphorus and highest concentrations of nitrogen, with respect the leaves biomass, the difference was mainly generated by nitrogen.

*Work of Degree

** Faculty of Science, Biology School, Cesar Marín – Elena Stashenko.

INTRODUCCIÓN

Lippia alba Mill N.E (Fam. Verbenaceae), se encuentra ampliamente distribuida en el área entre el sur de los Estados Unidos y el norte de Argentina, está presente también en la India, África y Australia (Hennebelle *et al.*, 2008). Es una de las plantas más estudiada en farmacología, sus hojas se utilizan como infusión contra la hipertensión, trastornos digestivos, náuseas, bronquitis y para sanar heridas a nivel local (Distasi *et al.*, 2002). El aceite esencial de *L. alba* presenta propiedades antifúngicas en cultivos de leguminosas, actividad antibacterial, puede ser utilizado como agente antiviral, y su extracto tiene una potencial fuente de antioxidantes (Abad *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2006; Shuckla *et al.*, 2009; Ara & Nur, 2009). *L. alba* presenta plasticidad fenotípica para diferentes condiciones de luz, agua y nutrientes (Parra-Torres y Rodríguez –López, 2007; Camargo–Parra y Rodríguez–López, 2008; Antolines-Delgado y Rodríguez–López, 2008). Esta especie, también presenta una notable variación intraespecífica con respecto a su morfología y composición del aceite esencial (Matos *et al.*, 1996).

El aceite esencial de *L. alba* ha sido reconocido como fuente de varios compuestos terpénicos de alto valor comercial (limoneno, carvona, mirceno, geranial, guaiol y bulnesol), estos compuestos son producidos en estructuras secretoras localizadas en tricomas peltados (Braga *et al.*, 2005; Zoghbi *et al.*, 1998; Stashenko, Jaramillo & Martínez, 2003). Los aceites esenciales se sintetizan a partir del metabolismo secundario de las plantas (Venkatachalam, Kjonaas & Croteau, 1984). Estos compuestos terpénicos pueden estar involucrados en procesos que presentan diversas funciones en las plantas como son: la formación de las cadenas laterales de la clorofila, el transporte de electrones de la maquinaria fotosintética, al hacer parte de las plastoquinonas y ubiquitininas, en la formación de esteroides importantes para la membrana celular y regulación del desarrollo celular (Gershenson *et al.*, 1989: 1993). También, pueden estar especializados en funciones de defensa, al ser emitidos como volátiles en

respuesta a la herbivoría. Entre los compuestos con esta propiedad, se encuentran el β -myrceno, linalool, germacreno, entre otros, que pueden afectar al organismo herbívoro debido a su toxicidad, propiedades disuasivas y a su capacidad de atraer a los enemigos naturales (Degenhardt, 2009; Dudareva, Pichersky & Gershenzon, 2004).

Los terpenoides son muy variables en su estructura, son derivados de una estructura molecular de cinco carbonos (isopreno), unidad de isopentenildifosfato (IDP) (Gershenzon, Murtagh & Croteau, 1993). Las plantas producen diversos isoprenoides, los cuales son sintetizados en los plástidos, mitocondrias, retículo endoplasmático y organelos citoplasmáticos (Leivar *et al.*, 2005).

En plantas, existen dos rutas metabólicas diferentes que conducen a la formación de IDP y de dimetilalil fosfato (DMAPP). La primera ruta es la del mevalonato activo en el citosol, que es considerado el responsable del suministro de precursores para la formación de sesquiterpenos y triterpenos; y la segunda, es la del 2C-metil-D-eritrol 4 fosfato (MEP) activo en el plastidio, que provee precursores para la producción de isoprenos, monoterpenos, diterpenos y tetraterpenos, como el limoneno y la carvona (Mahmoud & Croteau, 2001; Dudareva, Pichersky & Gershenzon, 2004).

El metabolismo secundario de las plantas es afectado por múltiples factores, como son la composición química y concentración de los diferentes nutrientes (Raval *et al.*, 2003). En algunos estudios, el tratamiento de *L. alba* con fertilizantes orgánicos, incrementa la biomasa, pero disminuye el contenido de aceite esencial (Yamamoto, Colombo & Andelino, 2008). En *Nicotiana attenuata*, la deficiencia de nitrógeno incrementa la formación de metabolitos secundarios como el ácido clorogénico y glicósidos, pero no genera ninguna alteración significativa en la producción limoneno y germacreno (Lou & Baldwin, 2004). En *Zea mays* la deficiencia de nitrógeno, incrementa la emisión de volátiles sesquiterpénicos inducidos por herbivoría (Schmelz *et al.*, 2003).

Concentraciones bajas de fosfatos, limitan el crecimiento y la producción de biomasa de las plantas (Chen *et al.*, 2005; Rubio, Zhu & Lynch, 2003). Lo anterior, puede estimular el metabolismo secundario, debido al cambio en el flujo de nutrientes o la activación de enzimas relacionadas con el metabolismo (Ramachandra & Ravishankar, 2002). Plantas de *Phaseolus vulgaris* sometidas a deficiencia de fósforo, presentan aumento en la relación raíz-vástago, disminución del área foliar, decrecimiento en la tasa fotosíntesis neta y acumulación en las raíces de metabolitos relacionados con el estrés (polioles, azúcares y auxinas) (Hernández *et al.*, 2007; Jain *et al.*, 2007). En gramíneas, la deficiencia de fósforo genera una disminución en las tasas de expansión y división celular, reduciendo la elongación final de la hoja (Kavanová *et al.*, 2006). Otro aspecto importante es la actividad de cloroplasto exoribonucleasa polinucleótido fosforilasa involucrada en la aclimatación de la planta a la disponibilidad de fósforo, que ayuda a mantener el equilibrio adecuado de los metabolitos (Marchive *et al.*, 2009).

En plantas de soja la deficiencia en fósforo genera una disminución en la tasa de crecimiento, y produce un aumento en las concentraciones de almidón en el tallo, hojas y raíz (Qui & Israel, 1994), en *Vigna acotifolia* la baja aplicación de fósforo, conlleva a un aumento en la distribución de materia seca en las raíces (Chaudhary, 1998). En *Eucalyptus grandis* la proporción de materia seca en tallos incrementa con el tamaño de la planta, pero es independiente de la concentración interna de fósforo, a diferencia de la materia seca de la raíz y hojas que disminuyen con el incremento en la concentración de fósforo (Kirchbaum, 1992).

En *Thymus vulgaris*, la fertilización con nitrógeno genero un efecto positivo en el rendimiento del aceite esencial (Golcz & Bosiacki, 2008). En *Matricaria chamomilla* el nitrógeno influyo significativamente en el rendimiento del aceite, y aunque el fósforo no presento un efecto similar bajos índices tienden a aumentar el rendimiento de aceite, mientras que dosis altas disminuyen el rendimiento (Emongor *et al.*, 1990). En *Mentha* la aplicación de 150 Kg/ha de nitrógeno genero un aumento de la masa seca de las hojas y en la producción de AE, pero al

aumenta esta cantidad de nitrógeno no tuvo efecto en el rendimiento de AE por hectárea. (Maksimovic & Ristic, 1999). En *Eucalyptus grandis* el nitrógeno genera cambios en la localización de materia seca entre las hojas y la raíz, también contribuye en el área foliar específica y en el índice de crecimiento de las plántulas y produce cambios en la tasa neta de ganancia de carbono por unidad de área foliar (Cromer & Jarvis, 1990).

Este trabajo evaluó los efectos de las diferentes relaciones nitrógeno/fósforo en la variabilidad morfológica, asignación de biomasa, rendimiento y composición del aceite esencial de *L. alba*. La siguiente fue la hipótesis de este trabajo: Una baja concentración de nitrógeno en el suelo, disminuirá la producción de biomasa y aumentará el rendimiento del aceite esencial, mientras que una baja concentración de fósforo, reducirá el área foliar y disminuirá el rendimiento del aceite esencial.

1. DISEÑO METODOLÓGICO

1.1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Setecientos clones de *L. alba* se propagaron a partir de segmentos nodales de longitud homogénea (15 cm aprox.) y peso homogéneo (4-6 gr aprox.). Se utilizaron 50 plantas maduras (aproximadamente 20 esquejes por planta), colectadas en cultivos experimentales del Centro Nacional de Investigación para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), localizado en el campus de la Universidad Industrial de Santander. Estos clones se cultivaron en suelo conformado por una mezcla de arcilla (5.22%), arena (82.72%) y limo (12%), sobre bandejas de 50 puestos y se ubicaron en un vivero de malla polisombra, que permitió la penetración del 50% de la radiación incidente. El vivero se fumigó una vez al mes con una mezcla de Alisin (insecticida orgánico a base de ají y ajo) y Rutinal (Nematicida orgánico a base de extracto de ruda).

Las siguientes fueron las condiciones experimentales en el vivero durante el periodo de estudio: radiación fotosintéticamente activa entre 21.2 a 85.9 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$, humedad relativa entre 4,7% a 28,2%, humedad del suelo de aproximadamente $0,25 \text{ m}^3/\text{m}^3$ (se realizó un riego cada dos días de 50 mL de agua y solución nutritiva) y una temperatura mínima de 15°C y máxima de 35°C. Las mediciones de radiación fotosintéticamente activa, humedad relativa y humedad del suelo, se realizaron por medio de un sistema de monitoreo remoto HOB0 U30, y la temperatura del ambiente con un termómetro de máximos y mínimos (BRIXCO).

Dos meses después de la propagación, se realizó el trasplante a bolsas plásticas de 2 libras, utilizando arena de sílice como soporte físico de la planta. A partir de ese momento se iniciaron los respectivos tratamientos con nutrientes.

1.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Durante el experimento se utilizaron 25 clones, para el análisis fisiológico y 75 clones, para el análisis químico, en total 100 clones para cada tratamiento. En el análisis fisiológico, se realizaron muestreos destructivos de 5 individuos en la semana 0, 2, 4, 6, 8, una vez iniciados los tratamientos. Con respecto al análisis químico, en la semana 8 se colectaron 75 plantas, por tratamiento, para la extracción del aceite.

1.3. TRATAMIENTO

En esta investigación se modificó el método de Rubio *et al.*, 2003, para la utilización y concentración de dos nutrientes el nitrógeno y el fósforo, adicionando $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y H_2PO_4 como fuentes principales de estos compuestos en la solución basal, y cada nutriente se aplicó en tres concentraciones diferentes 0.3, 1 y 2.5 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y 0.3, 0.5, 0.7 mM de H_2PO_4 , basados en la concentración de estos dos nutrientes en las zonas del Cañon del río Chicamocha y Piedecuesta (Santander), donde crece *L. alba* (Delgado & Rodríguez, 2008). La influencia de estos nutrientes se evaluó al combinar estas tres dosis. La solución basal utilizada fue de 3 mM K, 1 mM MgSO_4 , 3 mM CaCl_2 , 25 μM H_3BO_3 , 2 μM MnSO_4 , 2 μM ZnSO_4 , 0.5 μM CuSO_4 , 0.5 μM Na_2MoO_2 (Chen *et al.*, 2005, Rubio *et al.*, 2003, Osone y Tateno, 2005). El pH de la solución se ajustó a 6 con ácido acético.

1.4. PARÁMETROS MORFOLÓGICOS Y DE CRECIMIENTO

Se realizaron mediciones de caracteres morfológicos: longitud del sistema radicular (LR), número de hojas (NH), y el área foliar que se obtuvo con el programa *Compueye Leaf & Symptom Area Software* (Bakr, 2005). Cuantificación de biomasa: biomasa total (BMT), masa seca de las hojas (MSH), masa seca de raíces (MSR). Luego de la cosecha, 5 plantas fueron seccionadas en raíz, tallo y

hojas, después de ser pesadas en una balanza analítica, todo fue sometido a secado a 70°C por 72 horas.

1.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron comparaciones estadísticas entre los tratamientos por medio de un análisis de varianza (ANDEVA) y una prueba de diferencia mínima significativa de Fisher, para probar si existen diferencias significativas de los caracteres morfológicos y de asignación de biomasa, en los diferentes tratamientos. Se transformaron datos como el número de hojas y longitud de la raíz con logaritmo natural, para cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas ($p > 0,001$). Se organizaron las variables por medio de un análisis de componentes principales (PCA) (Sokal & Rohlf, 1995).

1.6. EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

Se realizó por el método de hidrodestilación asistida por radiación microondas (MWHD). Se agregaron 200 mL de agua a 200 g de material vegetal (20 a 25 plantas aprox.), que se sometió a extracción en un equipo de destilación tipo *Clevenger* con reservorio de destilación *Dean-Stark* y adaptación para calentamiento por radiación microondas, a través de un horno de microondas convencional (Samsung, Modelo AMW 8113ST). Cada extracción duró 45 minutos, en intervalos de 15 min, al final de este proceso, se agregó sulfato de sodio, al aceite extraído para secar el agua residual. Se hicieron 3 réplicas para cada tratamiento (Stashenko, Jaramillo & Martínez, 2004).

1.7. ANÁLISIS POR GC-MS DE COMPONENTES VOLÁTILES

Productos volátiles se identificaron por cromatografía de gases (GC) acoplada a un detector selectivo de masas (MS). Para el análisis 50 μL , de AE se disolvieron en 1 mL de diclorometano, y se agregó 1 μL de patrón interno (*n*-tetradecano), se realizó el análisis de la muestra por cromatografía de gases, en un equipo *Agilent Technologies 6890 Plus* (Palo alto, CA, EE.UU) acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5975 Network*, equipado con puerto de inyección *split/splitless* (modo de inyección: *split*, 1:30, temperatura de inyector: 250°C, volumen de inyección :1 μL). Los metabolitos secundarios volátiles fueron separados en una columna capilar de sílice fundida DB-5MS de 60 m de longitud, diámetro interno de 0.25 mm y espesor de la fase estacionaria de 0.25 μm (*J & W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.); La temperatura del horno se programó de: 45 °C (5 min), a 4 °C/min hasta 150 °C (2 min), luego a 5 °C/min hasta 250 °C (5 min) y, finalmente a 10 °C/min hasta 275 °C (15 min).

Utilizando los tiempos de retención de los compuestos, se calcularon los índices de retención lineales y junto con los espectros de masas, se realizó una identificación tentativa de los principales compuestos del AE (Tabla 4.1), los espectros de masas de cada compuesto se compararon con los almacenados en la Base de Datos de espectros Adams 2005.

1.8. ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL ACEITE ESENCIAL

El rendimiento del aceite esencial para cada uno de los tratamientos, se calculó dividiendo la cantidad de aceite obtenida de la muestra vegetal entre el peso de masa seca de la misma muestra. Se realizaron comparaciones estadísticas entre los tratamientos por medio de un análisis de varianza (ANDEVA) y una prueba de diferencia mínima significativa de Fisher, para probar si existen diferencias

significativas entre el rendimiento y la composición de los compuestos mayoritarios en los diferentes tratamientos.

2. RESULTADOS

Las variables número de hojas, área foliar, rendimiento de aceite esencial y relación nitrógeno/fósforo son las que más contribuyen al factor 1. Se puede concluir que este factor está relacionado con el proceso de fotosíntesis en las plantas (Figura 1.1). Las variables que presentaron mayor importancia con respecto a la variabilidad total, fueron la: relación nitrógeno/fósforo, área foliar, número de hojas, peso fresco (Figura 1.2).

En características morfológicas sólo se encontró diferencia significativa entre los tratamientos de nutrientes en el área foliar ($P < 0,05$), y, en este caso, los tratamientos con las mayores concentraciones de nitrógeno T7 (2,5 mM NO_3^- / 0,3 mM PO_4^{3-}) y T3 (2,5 mM NO_3^- / 0,7 mM PO_4^{3-}) presentaron mayor área foliar (Figura 2.1).

En características de biomasa, la masa seca de las hojas (Figura. 2.2) presentó diferencia significativa ($P < 0,05$), los tratamientos con mayor concentración de nitrógeno, tuvieron la mayor biomasa en comparación con los tratamientos con menor concentración de nitrógeno (0,3 mM) (Figura. 2.2). En la masa seca de la raíz también se obtuvo diferencia significativa ($P < 0,05$) y las concentraciones de fósforo bajas presentaron la mayor masa seca de la raíz.

En la biomasa total (Figura. 2.4) se observó diferencia significativa entre los tratamientos ($P > 0,05$), los que exhibieron mayor relación nitrógeno/fósforo tienen mayor masa seca con respecto a los demás,

Se encontró diferencia significativa en el rendimiento de aceite ($P < 0,05$), los tratamientos T6 (1 mM NO_3^- / 0,3 mM PO_4^{3-}) y T7 (2,5 mM NO_3^- / 0,3 mM PO_4^{3-}) con relaciones de concentración alta de nitrógeno y concentración baja de fósforo, presentaron el mayor rendimiento de aceite esencial 0,11 % (p/p) y 0,10 % (p/p), respectivamente, en comparación con los tratamientos de concentraciones bajas

de nitrógeno y fósforo, T1 (0,3 mM NO₃/ 0,3mM PO₄) y T4 (0,3 mM NO₃/ 0,5 mM PO₄), que dieron un rendimiento de 0,05% (p/p) y 0,06% (p/p) respectivamente (Figura. 3.1).

No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) en el contenido relativo de algunos de los principales compuestos identificados tentativamente, del aceite esencial de *L. alba* (limoneno, carvona, biciclosesquifelandreno, mirceno, piperitona, piperitenona, borneol, linalool, ocimeno), obtenido de plantas cultivadas bajo diferentes tratamientos de nutrientes. (Figura. 3.2., Tabla. 3-1).

3. DISCUSIÓN

En el análisis de componentes principales (Figura. 1.1) se observa una posible relación entre la variación de la relación nitrógeno/fósforo, área foliar y número de hojas con la variación en el rendimiento del aceite esencial, debido a que la síntesis de monoterpenos se localiza en células secretoras de tricomas glandulares en las hojas (Gershenzon, 1989) y el número de hojas y área foliar en ciertas condiciones es influenciada por la disponibilidad de nitrógeno y fósforo (Kirschbaum, Bellingham & Cromer 1992; Causin *et al*, 2004).

No se encontraron diferencias significativas en características morfológicas de la planta como la longitud de raíz, longitud de las ramas y en el número de hojas, en algunos casos para evidenciar cambios mayores se requiere someter por un periodo de tiempo prolongado las plantas a los tratamientos con nutrientes (Martins *et al*, 2007).

Una disminución en las concentraciones de fósforo generó un aumento en materia seca de las raíces, resultados similares se encontraron en Chaudhary, M. 1998. En el caso del nitrógeno, altos niveles de este nutrientes aumentaron la masa seca foliar, probablemente porque afecta las enzimas de asimilación de CO₂, aumentando así la fijación de carbono por unidad de peso seco (Kirschbaum *et al.*, 1992; Osaki *et al.*, 2001).

En algunos estudios, el fósforo no genera cambios significativos en características de crecimiento, área foliar o biomasa de las plantas (Hansen & Lynch, 1998; Marks *et al*, 1998), ni en la composición y el rendimiento de AE (Benjeddou 1994; Akbarinia *et al*, 2004). Pero, hay excepciones en donde condiciones deficientes de fósforo disminuyen el número de hojas y el área foliar promedio y aumentan el rendimiento del AE, mientras que dosis altas causan el efecto contrario (Emongor *et al*, 1990; Chaudhary, 1998), y casos en que dosis altas de este nutriente aumenta la producción de AE (Abd-El-Gawad *et al*, 1990).

No se presentó diferencias en los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *L. alba* entre los tratamientos, en algunos casos la calidad del aceite se ve influenciada por el incremento solo hasta cierto nivel del nitrógeno (Abbes, 1998; Golcz & Bosiacki, 2008; Hongtao *et al.*, 2009)

La optimización en el rendimiento del AE, se dan en ciertos casos por causa de respuestas favorables en la morfología de la planta, su biomasa y en su crecimiento, al aumentar la eficiencia en la absorción de nitrógeno, lo cual influencia la calidad del aceite (Abbes 1998; Aiyanna *et al.*, 1998; Hongtao *et al.*, 2009). También existen casos cuando el nitrógeno no genera respuesta en el crecimiento de la planta, ni en la producción y calidad del aceite esencial (Diatloff 1990; Singh *et al.*, 1997; Chae *et al.*, 2001; Akbarinia *et al.*, 2004); en otros estudios, el rendimiento de AE se ve influenciado positivamente por el incremento solo hasta cierto nivel del nitrógeno (Maksimovic & Ristic, 1999; Golcz & Bosiacki, 2008; Hongtao, Wuhuan & Hongxi, 2009).

En nuestro estudio, la relación entre una concentración de fósforo baja (0,3 mM) y concentraciones de nitrógeno de 1 mM y 2,5 mM, generaron mayor rendimiento del aceite esencial, debido posiblemente a una acumulación de triosas fosfato en el plastidio, que al no poder ser exportadas al citosol, conducen a un incremento en la concentración de almidón y en la disponibilidad de carbono para la formación de terpenos, conforme con la relación que se observa entre la incorporación de CO₂ y la acumulación de monoterpenos (Andreeva *et al.*, 1992; Qui & Israel, 1994; McConkey, Gershenzon & Croteau, 2000).

La nitrato reductasa es regulada por la concentración de nitrato y esta enzima responde a la luz, sin embargo no en todos los casos esta respuesta es significativa (Goodman *et al.*, 1973). En diferentes quimiotipos de *Savia fruticosa*, la tasa de suministro de nitrógeno afectó la actividad nitrato reductasa, sin embargo no tuvo efecto sobre los metabolitos secundarios, es decir no tuvo efecto en el rendimiento del aceite esencial en esta planta (Abbes, 1998). En *M. Piperita*

quimiotipo Linalool se encontró diferencia significativa en el rendimiento de aceite, sometida a fertilización con nitrógeno y sin nitrógeno en un nivel de radiación del 46% (Castro *et al.*, 2010)

La deficiencia de nitrógeno genera también acumulación de carbohidratos, sin embargo, no hay suficientes estudios de esta relación (Araya, Noguchi & Terashima, 2010); en estos casos donde las triosas fosfato quedan acumuladas en el plastidio, se observa una ruta alternativa y es la biosíntesis de metabolitos secundarios por la vía 2C-metil-D-eritrol 4 fosfato (MEP) activo en el plastidio; es ruta principal de formación de monoterpenos, como la carvona y el limoneno, componentes mayoritarios del aceite esencial de *L. alba*, sintetizados por la enzima limoneno sintasa localizada en los leucoplastos (Turner, 1999; Mahmoud & Croteau, 2002). Según lo anterior, se puede suponer una relación entre condiciones que generen acumulación de triosas fosfato en los plastidios y producción de aceite esencial, que posee como principales constituyentes a los monoterpenos, como en el caso del aceite esencial de *L. alba*.

4. CONCLUSIONES

Una alta concentración de nitrógeno y baja concentración de fósforo en un nivel de luz del 50%, puede incrementar el rendimiento del aceite esencial y la biomasa seca total en *L. alba*.

Ninguno de los tratamientos con nitrógeno y fósforo generó cambios en la composición de los compuestos mayoritarios del aceite esencial.

En general las diferencias en las concentraciones de nitrógeno y fósforo no producen variación significativa en los parámetros morfológicos y en la composición del aceite esencial de *L. alba*, en las condiciones experimentales dadas en este caso.

Un incremento en la concentración de nitrógeno puede generar un aumento significativo en la biomasa de hojas de *L. alba*.

FIGURAS

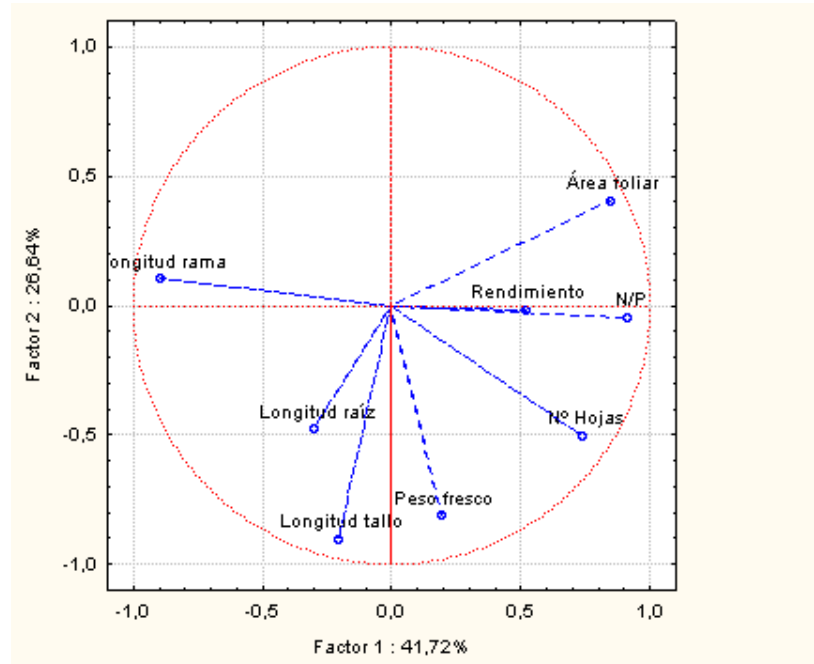


Figura 1.1 PCA de las variables morfológicas y de asignación de biomasa y su relación con el rendimiento

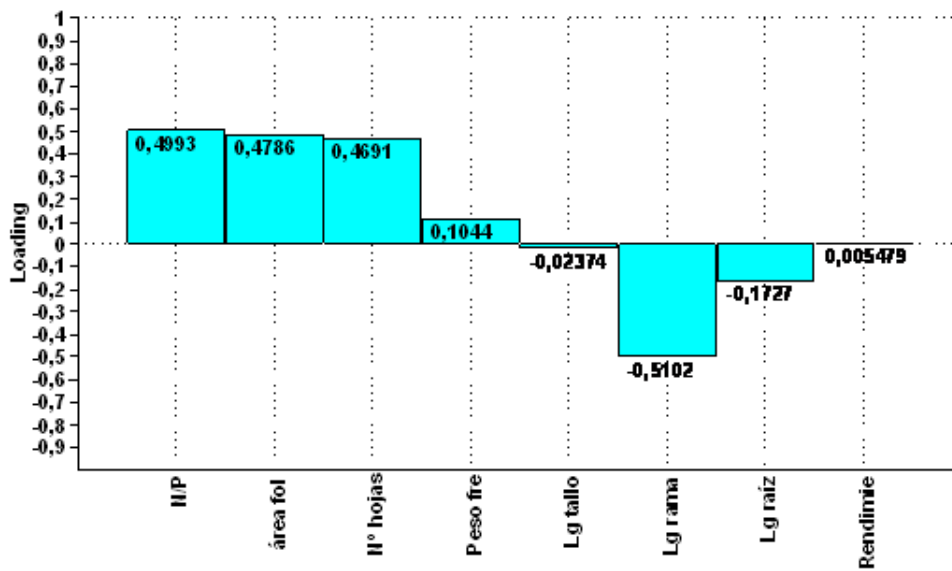


Figura 1.2. Representación de los pesos de los componentes principales.

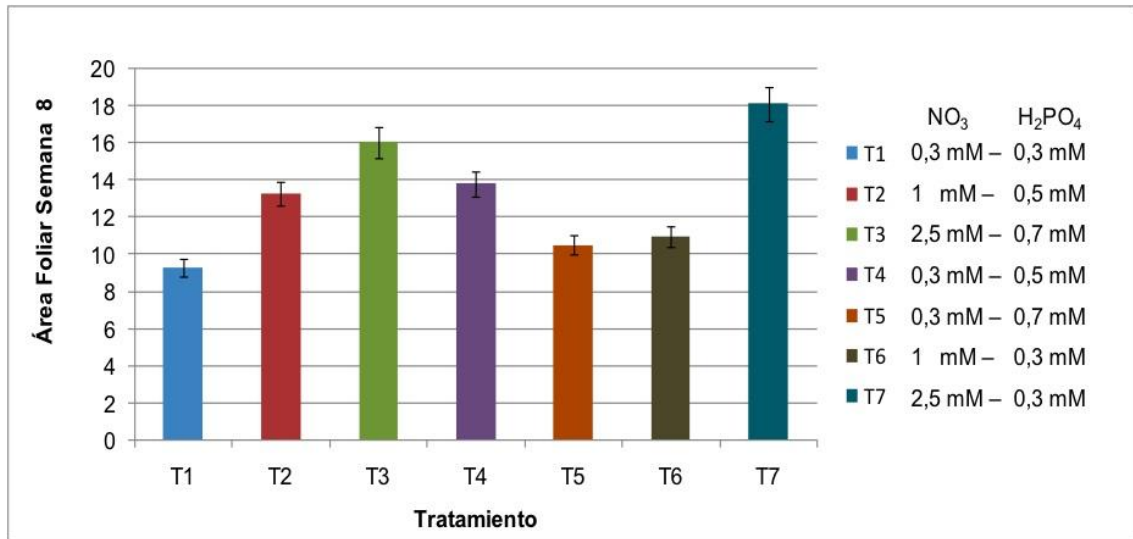


Figura 2.1. Relación área foliar en los diferentes tratamientos con nitrógeno y fósforo.

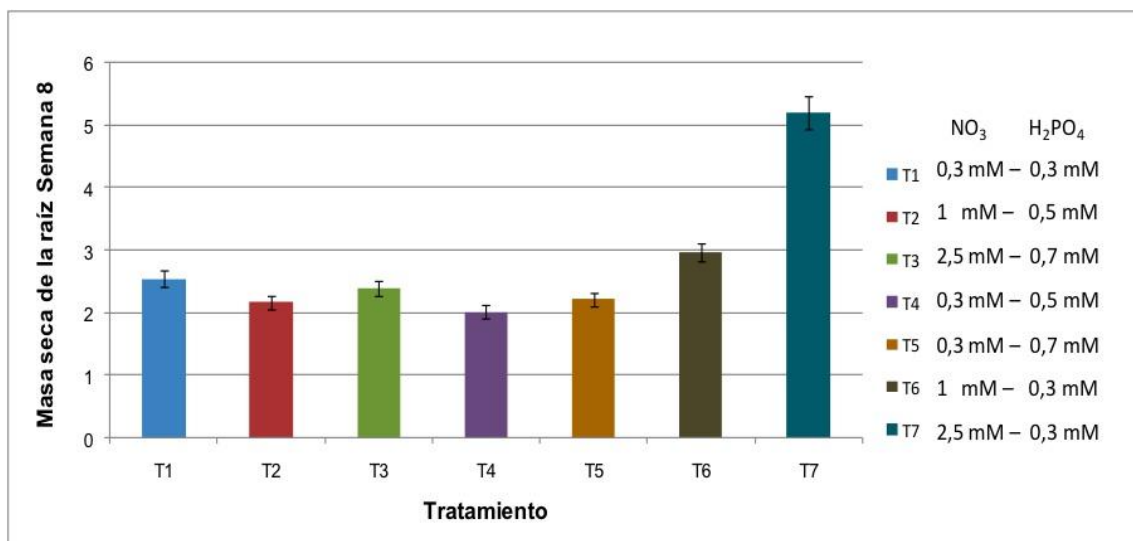


Figura 2.2. Relación masa seca de las raíz en los diferentes tratamientos con nitrógeno y fósforo.

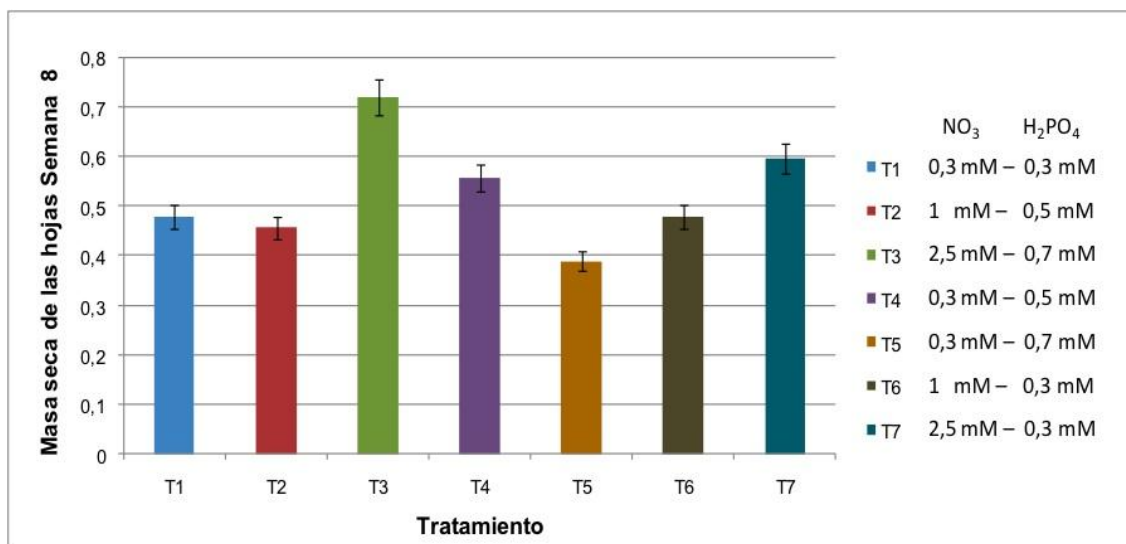


Figura 2.3. Relación masa seca de las hojas en los diferentes tratamientos con nitrógeno y fósforo.

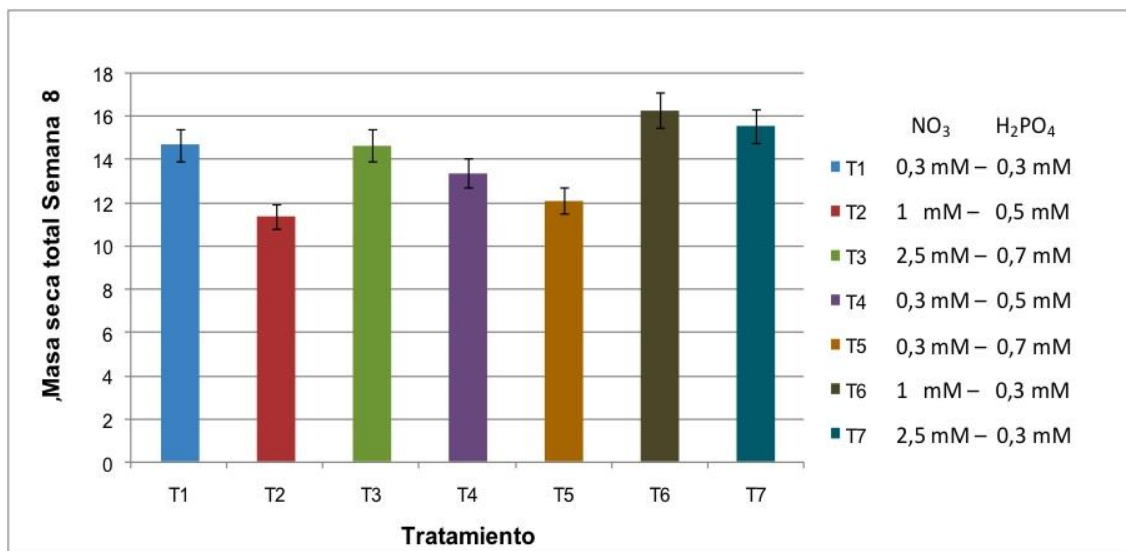


Figura 2.4. Relación masa seca total en los diferentes tratamientos con nitrógeno y fósforo.

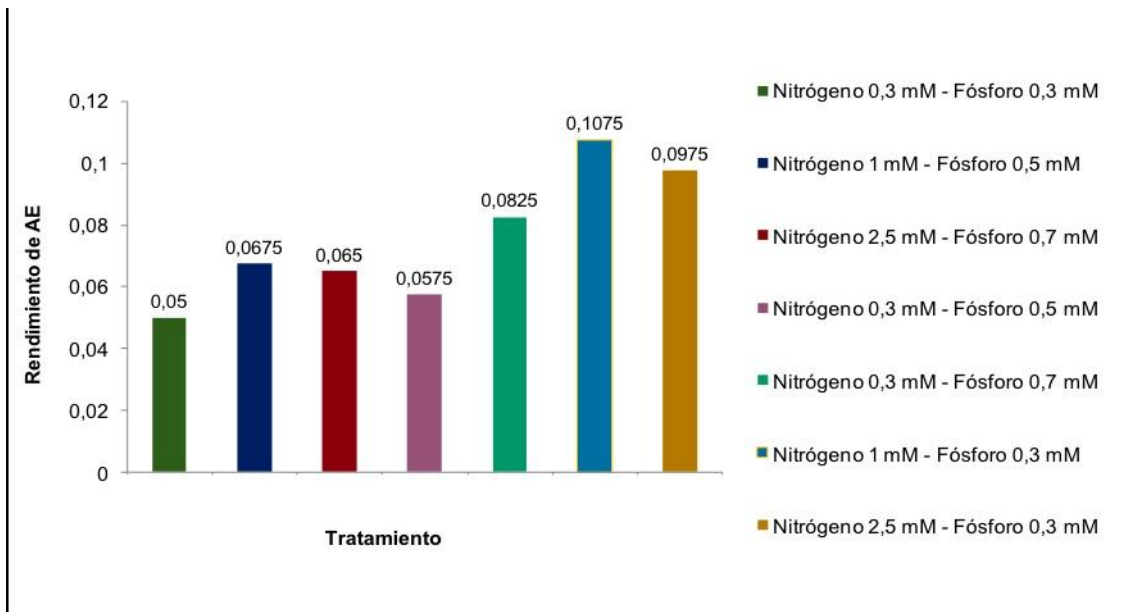


Figura 3.1. Relación rendimiento % (p/p) del aceite esencial con los diferentes tratamientos de nitrógeno y fósforo.

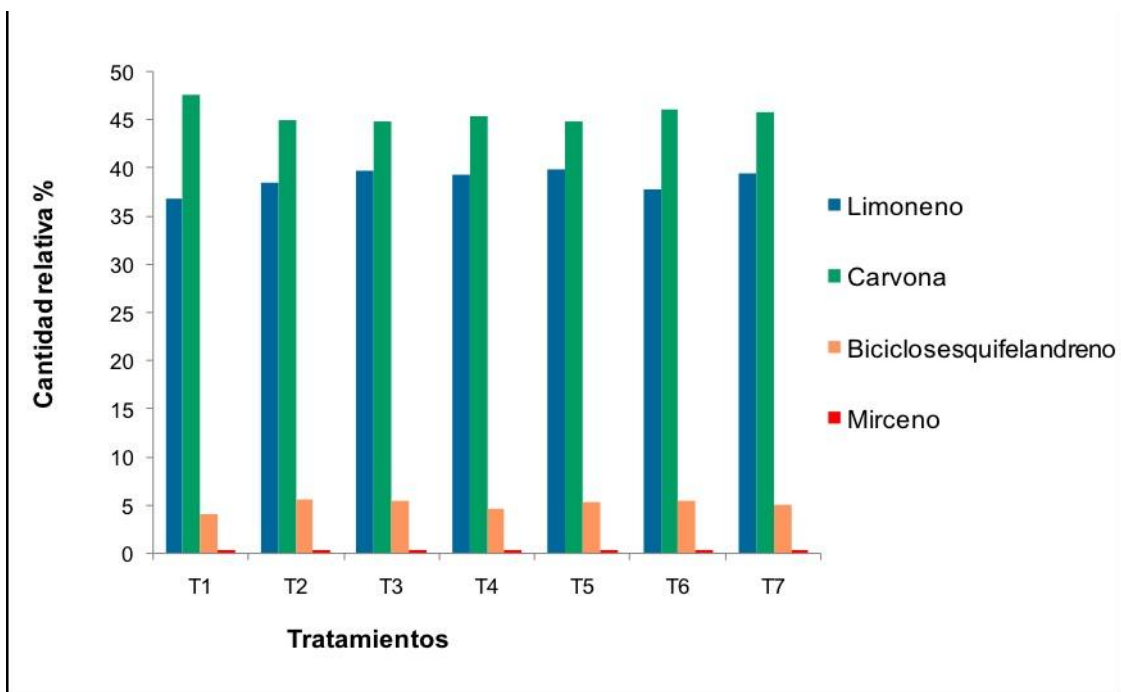


Figura 3.2. Relación cantidad relativa de los componentes mayoritarios en el aceite esencial en plantas cultivadas bajo los diferentes tratamientos con nitrógeno y fósforo

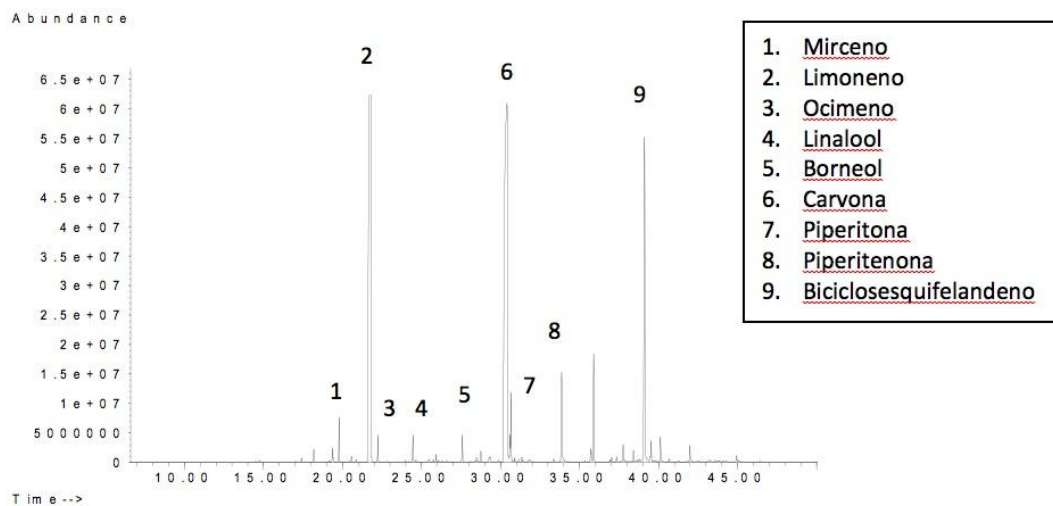


Figura 3.3. Perfil Cromatográfico del AE de *Lippia alba*.

Tabla 3.1 Contenido Relativo de los componentes mayoritarios del AE de *Lippia alba*

Tabla 3.1 Contenido relativo (%) e identificación de los componentes principales del AE de *Lippia alba*, aislado por MWHD, de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos con nutrientes.

Nº Pico	Compuesto	IRex ¹	IRt ²	Contenido relativo (%)						
				T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1	<u>Mirceno</u>	991	988	0,42	0,42	0,43	0,445	0,446	0,43	0,456
2	Limoneno	1029	1024	36,9	38,6	39,8	39,3	39,9	37,89	39,5
3	<u>Trans-β-Ocimeno</u>	1049	1044	0,227	0,234	0,237	0,243	0,255	0,243	0,239
4	<u>Linalool</u>	1100	1095	0,3	0,287	0,289	0,3	0,315	0,27	0,29
5	<u>Borneol</u>	1176	1165	0,3	0,29	0,3	0,31	0,3	0,32	0,325
6	<u>Carvona</u>	1243	1239	47,6	45	44,9	45,42	44,9	46,16	45,8
7	<u>Piperitona</u>	1262	1249	1,19	1,07	1,17	1,16	1,15	1,17	1,16
8	<u>Piperitenona</u>	1354	1340	0,9	0,9	1,13	1,08	1,2	1,26	1,43
9	<u>Biciclosesquifelandeno</u>	1485	1500	4,2	5,6	5,5	4,76	5,4	5,46	5,06

1. Índice de retención lineal experimental.

2. Índice de retención lineal teórico.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abad J., Bermejo P., Villar A., Sanchez S. & Carrasco L. (1997) Antiviral activity of medicinal plant extracts. *Phytotherapy Research*, 2, 198-202.
- Adams R. (2007) Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry. 4thed. Allured Publishing Corporation. 804p.
- Abbes J. (1998) Population, clonal and nitrogen effect on secondary compounds in *Salvia fruticosa* Mill. Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Mediterraneennes, Chania. 85-98.
- Abd-El-Gawad A., El-Tabbakh A., Abo-Shetaia A. & El-Baz A. (1990) Effect of nitrogen, phosphorus and potassium fertilization on the yield and yield components of rape plant (Egypt). *Annals of Agriculture Science, AinShams University, Cairo*, 35, 279-293.
- Aiyanna B., Farooqi A., Shivashankar K. & Khan M. (1998) Effect of fertilization methods on biomass, oil yield and economics in geranium (*Pelargonium sp.*) in India. *Journal of essential oil research*, 10, 51-56.
- Akbarinia A., Ghalavand A., Sefidcon F., Rezaee M. & Sharifi A. (2004) Study on the effect of different rates of chemical fertilizer, manure and mixture of them on seed yield and main, composition of essential oil of Ajowan (*Trachyspermum copticum*). *Pajouhesh and Sazandegi (In Agronomy and Horticulture)*, 16, 32-41.
- Andreeva T., Maevskaya S. & Voevudskaya S. (1992) Interrelation between photosynthesis and nitrogen metabolism in mustard plants under various phosphorus and nitrogen nutrition. *Fiziologiya rastenij*, 39, 680-686.
- Ara N. & Nur H. (2009) In Vitro Antioxidant Activity of Methanolic Leaves and Flowers Extracts of *Lippia alba*. *Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, 4, 107-110.
- Araya T., Noguchi K. & Terashima I. (2010) Effect of nitrogen on the carbohydrate repression of photosynthesis in leaves of *Phaseolus vulgaris L.* *Journal of Plant Research*, 123, 371-379.
- Bakr M. (2005) A new software for measuring leaf area, and area damaged by *Tetranychus urticae* Koch. *Journal of Applied Entomology*, 129, 173-175.

Benjeddou M. (1994) Effect of phosphorus concentration on growth, nutrient uptake, essential oil content and essential oil composition of *Salvia fruticosa* Mill. And *Satureja thymbra* L. in solution culture. Corporate author Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Mediterraneennes, Chania. 65-81.

Braga M., Ehlert P., Ming L., & Merles A. (2005) Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: Global yields, kinetic data, and extract chemical composition. J. Supercrit. Fluids, 34, 149-156.

Causin H., Tremmel D., Rufty T. & Reynolds J. (2004) Growth, Nitrogen uptake, and Metabolism in two semiarid shrubs grown at ambient and elevated atmospheric CO₂ concentrations: effects of nitrogen supply and source. American Journal of Botany, 91, 565-572.

Chae Y., Ohk H. & Song J. (2001) Effects of forms and levels of nitrogen fertilizer on plant growth and essential oil content of *Agastache rugosa*. Asian Agriculture Congress, 260.

Castro L., Deschamps C., Biasi L., Scheer A & Bona C. (2010) Development and essential oil yield and composition of mint chemotypes under nitrogen fertilization and radiation levels. World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing world.

Chaudhary M. (1998) Responses of dinitrogen fixation and photosynthetic activity in mashbean (*Vigna aconitifolia*) cultivars under low P conditions. Soil Science and Plant Nutrition, 44, 31-41.

Chen H., Mendelssohn A., Lorenzen B., Brix H. & Miao S. (2005) Growth and nutrient responses of *Eleocharis cellulose* (Cyperaceae) to phosphate level and redox intensity. American Journal of Botany, 92, 1457-1466.

Degenhardt J. (2009) Indirect Defense Responses to Herbivory in Grasses. Plant Physiology, 149, 96-102.

Delgado A. & Rodríguez N. (2008) Plasticidad Fenotípica en *Lippia alba* y *Lippia organoides* (Verbenaceae): Respuesta a la disponibilidad de Nitrógeno. Acta Biológica Colombiana, 13, 53-64.

Diatloff E. (1990) Effects of applied nitrogen fertiliser on the chemical composition of the essential oil of three *Leptospermum* spp. (*L. petersonii*; *L. flavescens*; *L. luehmannii*). Australian Journal of Experimental Agriculture, 30, 681-685.

- Di Stasi L., Oliveira G., Carvalhaes M., Queiroz M., Tien O., Kakinami S. & Reis M. (2002) Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia*, 73, 69-91.
- Dudareva N., Pichersky E & Gershenzon J. (2004) Biochemistry of plant volátiles. *Plant physiology*, 135, 1893-1902.
- Emongor V., Chweya J., Keya S. & Munavu R. (1990) Effect of nitrogen and phosphorus on the essential oil yield and quality of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) flowers. *East African Agricultural and Forestry Journal*, 55, 261-264.
- Gershenzon J., Maffei M. & Croteau R. (1989) Biochemical and Histochemical Localization of Monoterpene Biosynthesis in the Glandular Trichomes of Spearmint (*Mentha Spicata*). *Plant Physiology*, 89, 1351-1357.
- Gershenzon J., Murtagh G. & Croteau R. (1993) Absence of rapid terpene turnover in several diverse species of terpene accumulating plants. *Oecología*, 96, 583-592.
- Golcz A. & Bosiacki M. (2008) Effect of nitrogen fertilization doses and mycorrhization on the yield and essential oil content in thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 53, 72-74.
- Goodman P., Fothergill M & Hughes M. (1973) Variation in Nitrate Reductase, Nitrite, and Nitrite Reductase in Some Grasses and Cereals. *Oxford Journals*, 38, 31-37.
- Hansen C. & Lynch J. (1998) Response to phosphorus availability during vegetative and reproductive growth of chrysanthemum. II. Biomass and phosphorus dynamics. *American Society for Horticultural Science*, 123, 223-229.
- Hennebelle T., Sahpaz S., Joseph H. & Bailleul F. (2008) Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 221-222.
- Hernández G., Ramírez M., López O., Tesfaye M., Graham M., Czechowski T., Schlereth A., Wandrey M., Erban A., Cheung F., Wu H., Lara M., Town C., Kopka J., Udvardi M. & Vance C. (2007) Phosphorus Stress in Common Bean: Root Transcript and Metabolic Responses. *Plant Physiology*, 144, 752-767.
- Hongtao D., Wuhuan F. & Hongxi X. (2009) Effect of cultivated measure on yield and quality of the essential oil from peppermint (*Mentha piperita* L.). *Journal of Northwest Africulture and Forestry University*, 37, 111-117.

- Jain A., Poling M., Karthikeyan A., Blakeslee J., Peer W., Titapiwatanakun B., Murphy A. & Raghothama K. (2007) Differential effects of sucrose and auxin on localized Pi deficiency induced modulation of different traits of root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 144, 232-247.
- Gonzalez R. & Nardillo M. (1999) Retention index in temperature-programmed gas chromatography. *Journal of Chromatography*, 842, 29-49.
- Kavanová M., Lattanzai F., Grimoldi A. & Schnyder H. (2006) Phosphorous Deficiency Decreases Cell Division and Elongation in Grass Leaves. *Plant physiology*, 141, 766-775.
- Kirschbaum M., Bellingham D. & Cromer R. (1992) Growth analysis of the effect of phosphorus nutrition on seedlings of *Eucalyptus grandis*. *Australian Journal of Plant Physiology*, 19, 55-66.
- Leivar P., Gonzáles V., Castel S., Trelease R., López C., Arró M., Boronat A., Campos N., Ferrer A. & Busquets X. (2005) Subcellular Localization of *Arabidopsis* 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase. *Plant Physiology*, 137, 57-69.
- López K. & Rodríguez N. (2008) Plasticidad Fenotípica en *Lippia alba* (Verbenaceae) en respuesta a la disponibilidad Hídrica en dos Ambientes Lumínicos. *Acta Biológica Colombiana*, 13, 1.
- Lou Y. & Baldwin I. (2004) Nitrogen supply influences herbivore induced direct and indirect defenses and transcripcional responses in *Nicotiana attenuate*. *Plant Physiology*, 135, 496-506.
- Mahmoud S. & Croteau R. (2001) Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 8915-8920.
- Mahmoud S. & Croteau R. (2002) Strategies for Transgenic Manipulation of Monoterpene Biosynthesis in Plants. *Trends in Plant Science*, 7, 366-373.
- Maksimovic S. & Ristic M. (1999) Effect of fertilization and the stage of development on the content and chemical composition of mint oil. *Zemljiste i biljka*, 48, 77-83.
- Marchise C., Yehudai S., Germain A., Fei z., Jiang X., Judkins J., Wu H., Fernie A., Fait A. & Stern D. (2009) Abnormal Physiological and Molecular Mutant

Phenotypes Link Chloroplast Polynucleotide Phosphorylase to the Phosphorus Deprivation Response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 151, 905-942.

Martins F., Santos M., Polo M. & Barbosa L. (2007) Effects of the interactions among macronutrients, plant age and photoperiod in the composition of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit essential oil from Alfenas (MG), Brazil. *Flavour and Fragrance Journal*, 22, 123-129.

Marks N., Szmigiel A., Krzysztofik B., Sobol Z. & Baran D. (1998) Effect of phosphorus fertilization on leaf assimilation area, yields and mechanical damages of potato tubers. *Inzynieria Rolnicza*, 5, 123-132.

Matos F., Machado M., Craveiro A. & Alencar J. (1996) Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in northeast Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, 8, 695-698.

McConkey M., Gersehnzon J. & Croteau R. (2000) Developmental Regulation of Monoterpene Biosynthesis in the Glandular Trichomes of Peppermint. *Plant Physiology*, 122, 215-223.

Oliveira D., Leitão G., Santos S., Bizzo H., Lopes D., Alviano C., Alviano D. & Leitão S. (2006) Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 103-108.

Osone Y. & Tateno M. (2005) Applicability and Limitations of Optimal Biomass Allocation Models: A Test of Two Species from Fertile and Infertile Habitats. *Annals of Botany*.

Qui J. & Israel D. (1994) Carbohydrate accumulation and utilization in soybean plants in response to altered phosphorus nutrition (sink activity). *Physiologia Plantarum*, 90, 722-728.

Ramachandra S. & Ravishankar G. (2002) Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20, 101-153.

Raval K., Hellwing S., Prakash G., Ramos A., Srivastava A. & Büch J. (2003) Necessity of two stage process for the production of azadirachtin related limonoids in suspension cultures of *Azadirachta indica*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93, 16-22.

Rubio G., Zhu J. & Lynch J. (2003) A critical test of the two prevailing theories of plant response to nutrient availability. *American Journal of Botany*, 90, 143-152.

Sauret S., Botella P., Flores U., Martínez J., Román C., León P., Boronat A. & Concepción M. (2006) Plastid Cues Posttranscriptionally Regulate the Accumulation of Key Enzymes of the Methylerythritol Phosphate Pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 141, 75-84.

Singh M., Rao R. & Ramesh S. (1997) Steud Wats on a red sandy loam soil under semiarid tropical conditions. *Journal of essential oil research*, 9,569-574.

Sokal R. & Rohlf F. (1995) *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. 3rd ed. W.H. Freeman, New York, 887p.

Schmelz E., Alborn H., Engelberth J. & Tumlinson J. (2003) Nitrogen Deficiency Increases Volatility induced volatile emission, Jasmonic Acid accumulation, and Ethylene sensitivity in Maize. *Plant Physiology*, 133, 295-306.

Stashenko E., Jaramillo B. & Martínez J. (2003) Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Revista Académica Colombiana*, 27, 579-597.

Stashenko E., Jaramillo B. & Martínez J. (2004) Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. *Journal of Chromatography*, 1025, 93-103.

Shukla R., Kumar A., Singh P. & Kishore N. (2009) Efficacy of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its monoterpene aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B1 production. *International Journal of Food Microbiology*, 135, 165-170.

Torres E. & Rodríguez N. (2007) Plasticidad Fenotípica de *Lippia alba* y *Lippia organoides* (Verbenaceae) en respuesta a la disponibilidad de luz. *Acta Biológica Colombiana*, 12, 91-102.

Turner G., Gershenzon J., Nielson E., Froehlich J. & Croteau R. (1999) Limonene Synthase, the Enzyme Responsible for Monoterpene Biosynthesis in Peppermint, Is Localized to Leucoplasts of Oil Gland Secretory Cells. *Plant Physiology*, 120, 879-886.

Vale T., Matos A., Lima M. & Viana G. (1999) Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. *Journal of Ethnopharmacology*, 167, 127-133.

Venkatachalam V., Kjonaas R & Croteau R. (1984) Development and Essential Oil content of Secretory Glands of Sage (*Salvia officinalis*). *Plant Physiology*, 76, 148-150.

Yamamoto P., Colombo C. & Andelino J. (2008) Performance of Ginger grass (*Lippia alba*) for traits related to the production of essential oil. *Scienza Agricola*, 65, 481-489.

Zoghbi M., Andrade E., Santos A., Silva M. & Maia J. (1998) Essential Oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br Growing wild in the Brazilian Amazon. *Flavour and Fragrance Journal*, 13, 47-48