

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI
NATURAL



**Composició química del aceite esencial de
Thymus Piperella L. y su variabilidad estacional**

Trabajo de fin de grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Curso 2018/2019

Autora: Natalia Escrivà Todolí

Tutor: Dr. Juan Antonio Llorens Molina

Directora experimental: Dra. Sandra Vacas González

Valencia, 22 de febrero de 2019



Composición química del aceite esencial de *Thymus Piperella* L. y su variabilidad estacional

Autora: Natalia Escrivà Todolí

Trabajo Final de Grado

Tutor: D. Juan Antonio Llorens Molina

Realizado en: Valencia

Fecha: Febrero, 2019

RESUMEN

Thymus Piperella L. es una planta silvestre considerada un endemismo valenciano y conocida popularmente como pebrella. Una de sus utilidades más populares es como aromatizante y saborizante de los alimentos por su olor característico, utilizándose para el aliño de las aceitunas y condimento para algunos embutidos y gazpachos. Observando la composición de su aceite esencial, normalmente nos podemos encontrar como compuestos mayoritarios timol, carvacrol, *p*-cimeno y γ -terpineno, que pueden utilizarse como agentes antimicrobianos por su efecto inhibidor frente a determinadas bacterias que pueden afectar a la conservación de algunos alimentos.

Uno de los principales factores de variabilidad en el rendimiento y composición de los aceites esenciales es el relacionado con los cambios estacionales, derivados del desarrollo vegetativo de la planta. En este sentido, y sobre todo cuando se pasa de la recolección al cultivo de las plantas aromáticas, el conocimiento de estas variaciones es imprescindible para optimizar la obtención de aceite esencial, así como la actividad biológica derivada de su composición. Este trabajo se centra en cuantificar la variación del rendimiento y la concentración de estos compuestos principales y otros en el aceite esencial de *Thymus Piperella* a lo largo de su desarrollo vegetativo, en este caso de invierno, primavera, verano y otoño, considerando también, al mismo tiempo, los datos meteorológicos durante dicho proceso en la zona de muestreo.

En la cuantificación nos centraremos sobre todo en el carvacrol, un fenol monoterpénico que se encuentra junto con el timol en altas cantidades en el aceite esencial de *Thymus Piperella*. Este compuesto es utilizado como aditivo alimentario para la prevención de contaminación bacteriana, por ello es de alta importancia por su utilización como antimicrobiano de origen natural para inhibir contra bacterias que afectan a los alimentos como podría ser *B. cereus*, *E. Coli* o *Salmonella*. También, en otros estudios se ha demostrado su poder antioxidante contra organismos nocivos y también hay referencias de su ensayo como anticancerígeno, siendo el resultado positivo. También se estudia la variación de otros compuestos, precursores metabólicos de los citados anteriormente, como *p*-cimeno y γ -terpineno, así como del cariofileno y el óxido de cariofileno, relativamente importante en este aceite esencial, que como el resto de sesquiterpenoides posee una actividad biológica potencialmente interesante.

Una de las principales características de este trabajo es la incorporación de una metodología cuantitativa rigurosa a los resultados del análisis por cromatografía de gases, introduciendo la aplicación de estándar interno y el cálculo de factores de respuesta.

Palabras clave: *Thymus Piperella*, aceite esencial, estaciones, composición, carvacrol, antimicrobiano



Composició química de l'oli essencial de *Thymus Piperella* L. i la seua variabilitat estacional

Autora: Natalia Escrivà Todolí

Treball Final de Grau

Tutor: D. Juan Antonio Llorens Molina

Realitzar en: València

Data: Febrer, 2019

RESUM

Thymus Piperella L. és una planta silvestre considerada un endemisme valencià i coneguda popularment com pebrella. Una de les seues utilitats més populars és com aromatitzant i saboritzant dels aliments per la seua olor característica, utilitzant-se per a l'adob de les olives i condiment per alguns embotits i gaspatxo. Observant la composició del seu oli essencial, normalment ens podem trobar com a composts majoritats timol, carvacrol, *p*-cimè i γ -terpinè, que poden utilitzar-se com agents antimicrobià pel seu efecte front a determinades bactèries que poden afectar a la conservació d'alguns aliments.

Un dels principals factor de variabilitat en el rendiment i composició dels olis essencial és el relacionat amb els canvis estacionals, derivats del desenvolupament vegetatiu de la planta. En aquest sentit, i sobre tot quan es passa de la recol·lecció al cultiu de plantes aromàtiques, el coneixement d'aquestes variacions és imprescindible per optimitzar l'obtenció d'oli essencial, així com l'activitat biològica derivada de la seua composició. Aquest treball es centra en quantificar la variació del rendiment i de la concentració d'aquests composts principals i altres en l'oli essencial de *Thymus Piperella* al llarg del seu desenvolupament vegetatiu, en aquest cas hivern, primavera, estiu i tardor, considerant també, al mateix temps, les dades meteorològiques durant el dit procés en la zona de mostreig.

En la quantificació ens centrem sobretot en el carvacrol, un fenol monoterpènic que es troba junt al timol en altes quantitats en l'oli essencial de *Thymus Piperella*. Aquest compost s'utilitza com additiu alimentari per la prevenció de contaminació bacteriana, per això es d'alta importància per la seua utilització com antimicrobià d'origen natural per inhibir contra bactèries que afecten a aliments com podria ser *B. cereus*, *E. Coli* o *Sallmonella*. També, en altres estudis s'ha demostrat el seu poder antioxidant contra organismes nocius i també hi ha referències del seu assaig com anticancerígen, sent el resultat positiu. També s'estudia la variació d'altres components, precursors metabòlics del citats anteriorment com *p*-cimè i γ -terpinè, així com el cariofilè i l'òxid de cariofilè, relativament important en l'oli essencial, que com la resta de sequiterpenoides posseïx una activitat biològica potencialment interessant.

Una de les principals característiques d'aquest treball és la incorporació d'una metodologia quantitativa rigorosa als resultats de l'anàlisi per cromatografia de gasos, introduint l'aplicació d'estàndard intern i el càlcul de factors de resposta.

Paraules claus: *Thymus Piperella*, oli essencial, estacions, composició, carvacrol, antimicrobià



Chemical composition of the essential oil of *Thymus Piperella* L. and its seasonal variability

Author: Natalia Escrivà Todolí

Final Work Degree

Tutor: D. Juan Antonio Llorens Molina

Made in: València

Date: February, 2019

ABSTRACT

Thymus Piperella L. is a wild plant considered a valencian endemism and well-known as pebrella. One of its most popular uses is as aromatic and flavouring of the food for its characteristic smell, used for olive's dressing and seasoning of some cold meat and gazpacho. Looking at the composition of its essential oil, we can find as main compounds: thymol, carvacrol, *p*-cymene and γ -terpinene, whose whole can be used as an antimicrobial agent for its inhibitory effect against certain bacteria that can affect the conservation of some foods.

One of the main factors of variability in the performance and composition of the essential oils is related to seasonal changes, derived from the vegetative development of the plant. In this way, especially when it comes to harvesting the cultivation of aromatic plants, knowing these variations is essential to optimize the obtainment of the essential oil, as well as the biological activity derived from its composition. This work focuses on the quantification of the variation of the yield and the concentration of these main compounds and others in the essential oil of *Thymus Piperella* throughout its vegetative development, in this case of winter, spring, summer and autumn, as well as, meteorological data during said process in the sampling area.

In the quantification we will focus especially on carvacrol, a monoterpene phenol that is found together with thymol in high quantities in the essential oil of *Thymus Piperella*. This compound is used as a food additive for the prevention of bacterial contamination, which is why it is of high importance for its use as a natural antimicrobial to inhibit bacteria that affect food, such as *B. cereus*, *E. Coli* or *Salmonella*. Also, in other studies, its antioxidant power against harmful organisms and there are too references of his essay as anticarcinogenic, being the result positive. We also study the variation of other compounds, the metabolic precursors of the before mentioned, such as *p*-cymene and γ -terpinene, as well as caryophyllene and caryophyllene oxide, of vital importance in this essential oil, which like the rest of the sesquiterpenoids has a biological activity that it's interesting.

One of the main characteristics of this work is the incorporation of a rigorous quantitative methodology to the results of the analysis by gas chromatography, introducing the application of internal standard and the calculation of response factors.

Key words: *Thymus Piperella*, essential oil, seasons, composition, carvacrol, antimicrobial

Agradecimientos

Por todos aquellos que han confiado en mí y me han hecho ser la persona que soy. Quería agradecer a mi tutor de este trabajo, Juan Antonio por toda la paciencia y ayuda prestada durante este trabajo y por introducirme en el mundo de los aceites esenciales. A Sandra por la ayuda proporcionada en la parte de cromatografía. Por último, quería agradecer a mi familia por todo el apoyo que me han dado durante estos años a seguir mi camino.

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. TAXONOMÍA Y CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.....	1
1.2. HÁBITAT – ÁREA DE DISTRIBUCIÓN.....	2
1.3. ASPECTOS ETNOBOTÁNICOS. USOS.....	2
1.4. APLICACIONES DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA (ANTIMICROBIANA)	3
1.5. COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	3
1.5.1. <i>Quimiotipos</i>	3
1.5.2. <i>Influencias de los factores bioclimáticos en la composición química</i>	4
1.5.3. <i>Compuestos mayoritarios. Aspectos específicos de su actividad biológica</i>	4
2. OBJETIVOS	8
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	9
3.2. SECADO DEL MATERIAL VEGETAL.....	9
3.3. EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL.....	9
3.3.1. <i>Materiales</i>	9
3.3.2. <i>Fundamentos</i>	10
3.3.3. <i>Metodología</i>	10
3.4. COMPOSICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL.....	12
3.4.1. <i>Cromatografía de capa fina (CCF)</i>	12
3.4.1.1. <i>Materiales</i>	12
3.4.1.2. <i>Fundamentos</i>	12
3.4.1.3. <i>Metodología</i>	12
3.4.2. <i>Cromatografía de gases (GC/MS)</i>	14
3.4.2.1. <i>Materiales</i>	14
3.4.2.2. <i>Fundamento</i>	14
3.4.2.3. <i>Metodología</i>	15
3.4.2.4. <i>Cálculo del factor de respuesta y cuantificación de los compuestos</i>	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1. RESULTADOS DEL SEGUIMIENTO DE LAS CONDICIONES METEOROLÓGICAS DURANTE EL PERIODO DE TIEMPO ESTUDIADO: TEMPERATURA, PRECIPITACIONES Y HUMEDAD RELATIVA.....	19
4.2. CROMATOGRFÍA DE CAPA FINA.....	19
4.3. RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL.....	22
4.4. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>THYMUS PIPERELLA</i> L.	23
4.4.1. <i>Análisis cualitativo. Identificación de la composición por espectroscopia de masas</i>	23
4.4.2. <i>Estudio y discusión de los resultados obtenidos del ANOVA comparando entre los diferentes muestreos y compuestos principales</i>	25
5. CONCLUSIONES	32
6. BIBLIOGRAFÍA	33

Índice de figuras

FIGURA 1. <i>THYMUS PIPERELLA</i> L.....	1
FIGURA 2. FLOR DE <i>THYMUS PIPERELLA</i> L. (FUENTE: PEMARLO.BLOGSPOT.COM)	1
FIGURA 3. LOCALIZACIÓN DE <i>THYMUS PIPERELLA</i> L. EN LA COMUNIDAD VALENCIANA. (HTTP://bdb.cma.gva.es/ficha.asp?id=13336).....	2
FIGURA 4. ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE LOS COMPUESTOS TIMOL, CARVACROL, P-CIMENO Y γ -TERPINENO (FUENTE: SIGMA-ALDRICH).....	3
FIGURA 5. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL CARVACROL (FUENTE: SIGMA-ALDRICH).	4
FIGURA 6. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL TIMOL (FUENTE: SIGMA-ALDRICH).	5
FIGURA 7. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL P-CIMENO (FUENTE: SIGMA-ALDRICH).	5
FIGURA 8. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL γ -TERPINENO (FUENTE: SIGMA-ALDRICH).....	6
FIGURA 9. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL B-CARIOFILENO (FUENTE: SIGMA-ALDRICH).	6
FIGURA 10. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ÓXIDO DE CARIOFILENO (FUENTE: SIGMA-ALDRICH).....	6
FIGURA 11. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL BORNEOL (FUENTE: SIGMA-ALDRICH).	7
FIGURA 12. LOCALIZACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL DE <i>THYMUS PIPERELLA</i> L. (ÁREA DE MUESTREO).....	9
FIGURA 13. PARTES DEL EQUIPO CLEVINGER.	10
FIGURA 14. SEPARACIÓN DE LAS FASES EN EL EQUIPO CLEVINGER.....	11
FIGURA 15. IMAGEN DEL PROCESO DE UNA TLC. (FUENTE: BIOMODEL.UAH.ES)	13
FIGURA 16. ESQUEMA DEL MÉTODO ANALÍTICO.	16
FIGURA 17. GRÁFICO DE TEMPERATURA, HUMEDAD RELATIVA Y PRECIPITACIONES DURANTE EL ESTUDIO. (ESCALA COMÚN PARA LAS TRES VARIABLES ESTUDIADAS).	19
FIGURA 18. CROMATOGRAMAS OBTENIDOS UTILIZANDO VAINILLINA.	20
FIGURA 19. CROMATOGRAMAS OBTENIDOS UTILIZANDO VAINILLINA.	20
FIGURA 20. CROMATOGRAMAS OBTENIDOS UTILIZANDO ANISALDEHÍDO SULFÚRICO.	20
FIGURA 21. CROMATOGRAMAS OBTENIDOS UTILIZANDO ANISALDEHÍDO SULFÚRICO.	21
FIGURA 22. CROMATOGRAMA UTILIZANDO ANISALDEHÍDO SULFÚRICO CON COMPUESTO PUROS DE γ -TERPINENO Y CARVACROL.	22
FIGURA 23. CROMATOGRAMA GC/MS CON LA IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS PRINCIPALES: (1) P-CIMENO, (2) γ - TERPINENO, (3) BORNEOL, (4) CARVACROL, (5) B-CARIOFILENO, (6) ÓXIDO DE CARIOFILENO.....	25
FIGURA 24. COMPARACIÓN DE LA MEDIA DE LOS RENDIMIENTOS OBTENIDOS DURANTE LOS MUESTREOS CON UN NIVEL DE CONFIANZA DEL 95%.....	26
FIGURA 25. COMPARACIÓN DEL CARVACROL OBTENIDO DURANTE LOS MUESTREOS CON UN NIVEL DE CONFIANZA DEL 95%. ..	26
FIGURA 26. COMPARACIÓN DEL P-CIMENO OBTENIDO DURANTE LOS MUESTREOS CON UN NIVEL DE CONFIANZA DEL 95%... ..	26
FIGURA 27. COMPARACIÓN DEL γ -TERPINENO OBTENIDO DURANTE LOS MUESTREOS CON UN NIVEL DE CONFIANZA DEL 95%.	27
FIGURA 28. COMPARACIÓN DEL γ -TERPINENO + P-CIMENO OBTENIDO DURANTE LOS MUESTREOS CON UN NIVEL DE CONFIANZA DEL 95%.....	27
FIGURA 29. COMPARACIÓN DEL BORNEOL OBTENIDO DURANTE LOS MUESTREOS CON UN NIVEL DE CONFIANZA DEL 95%. ...	28
FIGURA 30. COMPARACIÓN DEL CARIOFILENO OBTENIDO DURANTE LOS MUESTREOS CON UN NIVEL DE CONFIANZA DEL 95%.	28
FIGURA 31. COMPARACIÓN DEL ÓXIDO DE CARIOFILENO OBTENIDO DURANTE LOS MUESTREOS CON UN NIVEL DE CONFIANZA DEL 95%.....	28
FIGURA 32. COMPARACIÓN DEL CARIOFILENO Y ÓXIDO DE CARIOFILENO OBTENIDO DURANTE LOS MUESTREOS CON UN NIVEL DE CONFIANZA DEL 95%.	29
FIGURA 33. EVOLUCIÓN DEL CARVACROL, P-CIMENO Y γ -TERPINENO DURANTE LOS CUATRO MUESTREOS.	30

Índice de tablas

TABLA 1. RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL CON MEDIA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR.	23
TABLA 2. COMPOSICIÓN TOTAL DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>T. PIPERELLA</i>	23
TABLA 3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>THYMUS PIPERELLA</i> L. DURANTE LOS 4 MUESTREOS (VALORES MEDIOS Y DESVIACIONES ESTÁNDAR DE CUATRO REPETICIONES PARA CADA COMPUESTO A LO LARGO DE LOS CUATRO MUESTREOS REALIZADOS)	29
TABLA 4. MEDIA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LOS COMPUESTOS PRINCIPALES DURANTE LOS CUATRO MUESTREOS (LETRAS DIFERENTES A LO LARGO DE UNA FILA INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS SEGÚN EL MÉTODO DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA (LSD) DE FISHER CON UN NIVEL DE CONFIANZA DEL 95%	30

1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. TAXONOMÍA Y CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Thymus piperella L. (Figura 1) se clasifica en el Reino Plantae, División Magnoliophyta, Clase Magnoliopsida, Orden Lamiales, Familia Lamiaceae, Género *Thymus* L., y Especie *Thymus Piperella* L. Es conocida popularmente como tomillo pimentera o tomillo pebrella.



Figura 1. *Thymus Piperella* L.

Se trata de una planta perenne silvestre de mata leñosa, de entre 10 y 40 cm de altura, muy ramificada con hojas oval-redondas, planas y cortamente pecioladas, de 5 a 6 mm de longitud y con una nervadura bien marcada en el envés. Sus flores (Figura 2) son bilabiadas con un cáliz glanduloso entre 4-6 mm de color rosado-púrpura, con el que el tubo de la corola supera brevemente al del cáliz, que se reúnen en verticilos, de entre 6 a 10 flores, formando una inflorescencia laxa. Los dientes del labio inferior son lanceolado-subulados, ciliados y arqueados, igualando al labio superior, de dientes triangular-equiláteros, no ciliados (Adzet Porredón & Passet, 1976). Su floración tiene lugar entre los meses de junio y septiembre.



Figura 2. Flor de *Thymus Piperella* L. (Fuente: Pamarlo.blogspot.com)

1.2. HÁBITAT – ÁREA DE DISTRIBUCIÓN

Thymus Piperella L. es considerada un endemismo valenciano dado que su área de distribución se encuentra mayoritariamente en la provincia de Valencia (Figura 3), norte de la de Alicante y en algunas zonas limítrofes de Albacete y Murcia (Pellicer, 2000), extendiéndose así alrededor de 8000 km² (Boira & Blanquer, 1998). Es especialmente abundante dentro del Circo y la sierra de La Safor, en la colina del castillo de Forná y en la Sierra de Mariola.

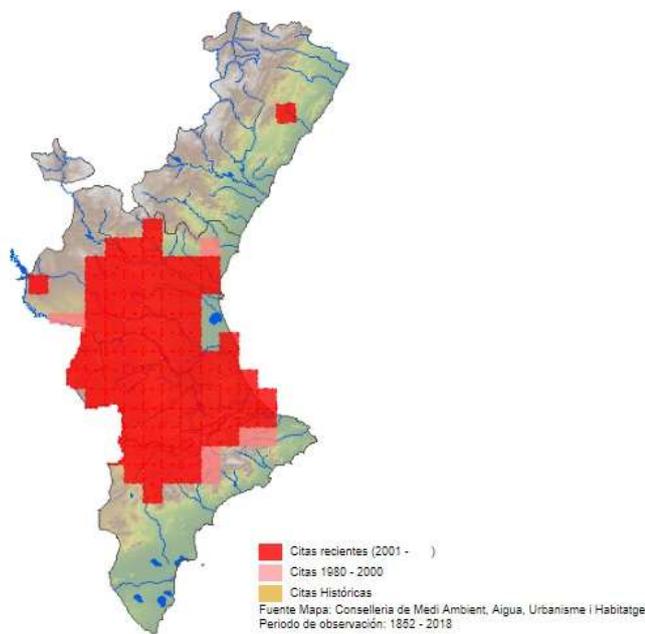


Figura 3. Localización de *Thymus Piperella* L. en la Comunidad Valenciana.
(<http://bdb.cma.gva.es/ficha.asp?id=13336>)

Habita en lugares montañosos, pedregosos y soleados con un rango de altitud entre 260 y 1170 m de altura (Boira & Blanquer, 1998), con dos cinturones de vegetación bioclimática como son la termomediterránea y mesomediterránea (Rivas Martínez, 1987) y con un carácter pionero que se evidencia tras los incendios forestales.

1.3. ASPECTOS ETNOBOTÁNICOS. USOS.

Esta planta es utilizada principalmente para propósitos culinarios como sazonar rellenos, salsas, encurtidos, guisos y sopas, debido a su aroma característico dado por el timol y el carvacrol. También se ha utilizado tradicionalmente para el aliño de las aceitunas y en la destilación de una bebida alcohólica llamada “herbero”, que es muy típica del sur de Valencia y el norte de Alicante, de la cual sus propiedades digestivas están documentadas (Martí *et al.*, 2007).

Además de sus usos culinarios también ha sido utilizada tradicionalmente como planta medicinal para la tos, la mala digestión y para limpiar y curar heridas (Fuster Lorente & Camarena Sellens, 2007).

1.4. APLICACIONES DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA (ANTIMICROBIANA)

Los aceites esenciales de hierbas aromáticas o especias están adquiriendo un gran interés por su potencial como conservantes y como agentes antimicrobianos, desde que dichas sustancias han sido reconocidas como seguras (Generally Recognized as Safe (GRAS)) y son ampliamente aceptadas por los consumidores (Burt, 2004).

En un estudio de tipo antimicrobiano realizado *in vitro* siguiendo la difusión en el método del disco de agar se observó que el aceite esencial de *Thymus Piperella* L. tiene un efecto inhibitor sobre 5 de las 11 bacterias utilizadas asociadas con el deterioro de los alimentos. Su actividad antimicrobiana fue efectiva para *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophilia*, *Alcaligenes faecalis*, *Achromobacter denitrificans* y *Listeria innocua*. No obstante, se necesita un mayor estudio dado que la adición de este aceite esencial puede producir cambios en las propiedades organolépticas de los alimentos (Ruiz-Navajas *et al.*, 2012).

En otro estudio se aplicaron películas de quitosán (biomoléculas extraídas de los exoesqueletos de los crustáceos) tratadas con el aceite esencial de *Thymus Piperella* al 2% en un jamón curado cocido y almacenado a 4°C durante 21 días, observándose una menor oxidación de lípidos y un recuento más bajo de las bacterias mesofílicas aerobias y de bacterias de ácido láctico, que las muestras de control sin recubrir. También mejoró su vida útil (Ruiz-Navajas *et al.*, 2015).

1.5. COMPOSICIÓN QUÍMICA

1.5.1. Quimiotipos

En el aceite esencial de *Thymus Piperella* L., podemos encontrar varios compuestos que pueden ser mayoritarios como el carvacrol, timol, *p*-cimeno y γ -terpineno. Dependiendo de cuales predominan pueden distinguirse diferentes quimiotipos: Quimiotipo A, cuyos compuestos mayoritarios son *p*-cimeno, γ -terpineno y carvacrol, Quimiotipo B: *p*-cimeno y timol, y Quimiotipo C: *p*-cimeno y carvacrol (Ruiz-Navajas *et al.*, 2012).

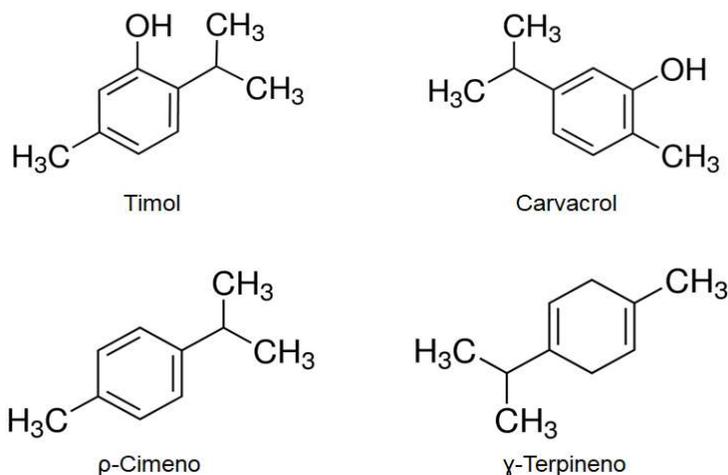


Figura 4. Estructuras químicas de los compuestos timol, carvacrol, *p*-cimeno y γ -terpineno (Fuente: Sigma-Aldrich).

1.5.2. Influencias de los factores bioclimáticos en la composición química

En un estudio sobre los factores ambientales que afectan a la variabilidad química de los aceites esenciales en *T. Piperella* (Boira *et al.*, 1998) se observó que no se encuentran diferencias significativas intrapoblacionales, pero que existe una relación entre la presencia de los diferentes quimiotipos y factores bioclimáticos tales como la altitud y el índice de aridez, que mide el grado de sequía de un clima, y por lo tanto están muy relacionados con los índices de precipitación (Andrés, A. (s.f.)).

Como se ha citado anteriormente, existe una relación entre los quimiotipos y los factores bioclimáticos, lo que hace que predomine un quimiotipo sobre los otros. Los hábitats característicos donde podemos encontrar el quimiotipo A (*p*-cimeno, γ -terpineno y carvacrol) están relacionados positivamente con un mayor índice de aridez (I_{ar})¹ y altitud. En cuanto al quimiotipo B (*p*-cimeno y timol) se encuentra más relacionado con los factores bioclimáticos que afectan al balance hídrico en plantas y suelos (mayor media anual de evapotranspiración y mayor precipitación anual en mm de los meses con temperatura promedio superior a 0°C.). Finalmente, con el quimiotipo C (*p*-cimeno y carvacrol) está relacionado positivamente con un mayor índice de aridez (I_{ar}), elevadas altitudes en su distribución topográfica y mayor duración del día, pero la influencia sobre este quimiotipo es menos evidente (Boira y Blanquer, 1998), por lo que el quimiotipo A y el quimiotipo C se podrían encontrar en una misma zona como consecuencia de la influencia de los factores bioclimáticos.

1.5.3. Compuestos mayoritarios. Aspectos específicos de su actividad biológica

El **carvacrol** (2-metil-5-(1 metiletil) fenol) es un fenol monoterpénico con alto poder hidrofóbico que se encuentra en aceites esenciales de *T. Piperella* (en un 45%) y de orégano (entre 60-70%).

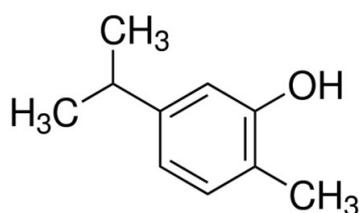


Figura 5. Estructura química del carvacrol (Fuente: Sigma-Aldrich).

De acuerdo con Arunasree (2010), se ha demostrado que el carvacrol tiene efectos antitumorales que acelera la muerte de las células de cáncer de mama, por lo que el compuesto podría tener un potencial terapéutico significativo en el tratamiento de dicha enfermedad.

En cuanto a su efecto antimicrobiano, Bagamboula *et al.* (2003) menciona que existe una actividad antibacteriana contra *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri* con el carvacrol a concentraciones de 0,5% y 1%, con lo que García-García *et al.* (2008) comprobó su efecto con

¹ (I_{ar}) = PE/P (P: valor medio de precipitaciones; PE: promedio anual de evapotranspiración.)

B. cereus y la toxina generada por éste, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Sallmonella* y *Saccaromyces cerevisiae*.

También está demostrado que el carvacrol es un inhibidor más fuerte contra las bacterias nombradas anteriormente que el alcanfor (Ruiz-Navajas *et al.*, 2012).

El **timol** (2-isopropil-5-metilfenol) es un fenol, con una estructura química similar al del carvacrol cambiando únicamente la posición del grupo hidroxilo, siendo por tanto un isómero de posición (García-García & Palou-García, 2008). Se encuentra presente en el aceite esencial del tomillo, del orégano y en otras fuentes naturales como los aceites naturales de mandarina y tangerina, ampliamente utilizados en refrescos y confitería (Falcone *et al.*, 2005). Es reconocido como un aditivo alimentario sintético como saborizante con un límite en comida de 50 mg/kg y en bebidas de 10 mg/kg (Falcone *et al.*, 2005). Posee una actividad antifúngica y antibacteriana demostrada en diversos estudios (García-García & Palou-García, 2008).

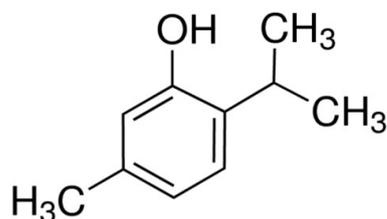


Figura 6. Estructura química del timol (Fuente: Sigma-Aldrich).

Su actividad antibacteriana ha sido confirmada sobre las células de *B. cereus* y *Clostridium botulinum*, pudiendo inhibir algunos procesos involucrados en la transición de espora a célula, como la germinación, crecimiento y multiplicación celular (Chaibi *et al.*, 1997).

La acción antimicrobiana y la sensibilidad al timol es dependiente de ciertos factores como el tipo de microorganismo, pH del medio y temperatura de incubación (Falcone *et al.*, 2005).

El **p-cimeno** es un hidrocarburo aromático monoterpénico, natural y biodegradable, que se encuentra en el aceite esencial de numerosas plantas aromáticas como distintas especies del género *Thymus* o el comino (*Cuminum cyminum* L.). Se trata de un precursor biológico del carvacrol, es hidrofóbico y causa mayor turgencia en la membrana citoplasmática que el carvacrol. Este compuesto, por sí solo, carece de actividad microbiana, pero al combinarse con el carvacrol, presenta sinergismo, facilitando el transporte de este último a través de la membrana citoplasmática (Gómez-Sánchez & López-Malo, 2009).

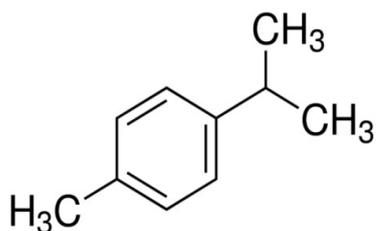


Figura 7. Estructura química del p-cimeno (Fuente: Sigma-Aldrich).

El **γ -terpineno** pertenece a un grupo de isómeros que son clasificados como hidrocarburos monoterpénicos. Es un componente principal de los aceites esenciales con una fuerte actividad antioxidante. En la industria alimentaria es utilizado como un agente aromatizante por su aroma a limón y su sabor amargo.

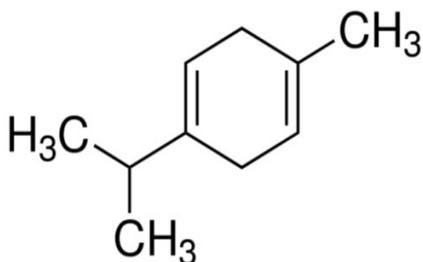


Figura 8. Estructura química del γ -terpineno (Fuente: Sigma-Aldrich).

El **β -cariofileno** es un sesquiterpenoide volátil y se utiliza mayoritariamente como saborizante dado que es uno de los componentes principales del aceite de clavo. Se ha estudiado su actividad anestésica local, por ahora en conejos, obteniendo un resultado positivo (Ghelardini *et al.*, 2001) así también en su actividad antiinflamatoria con tratamiento oral en ratones y ratas junto con el α -humuleno (Fernandes *et al.*, 2007).

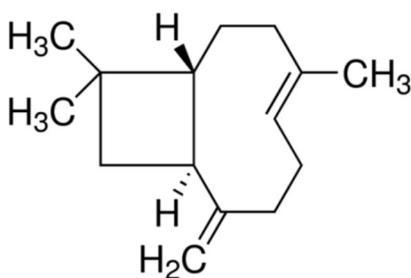


Figura 9. Estructura química del β -cariofileno (Fuente: Sigma-Aldrich).

El **óxido de cariofileno** es un sesquiterpenoide utilizado como conservante en alimentos, medicamentos y cosméticos. Se ha estudiado su actividad analgésica y antiinflamatoria en ratones presentando un resultado estadísticamente significativo (Singh *et al.*, 2014).

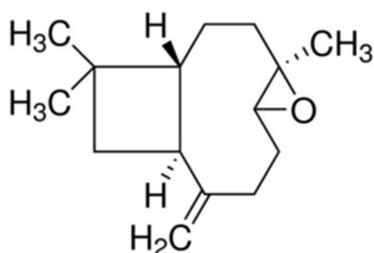


Figura 10. Estructura química del óxido de cariofileno (Fuente: Sigma-Aldrich).

El **borneol** es un alcohol monoterpénico bicíclico que se encuentra en los aceites esenciales de numerosas hierbas medicinales, como la valeriana. Es utilizado como anestésico en la medicina tradicional china y japonesa (Granger *et al.*, 2005). También se han estudiado sus actividades anticonceptivas y antiinflamatorias en ratones (Almeida *et al.*, 2013).

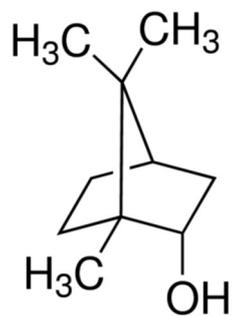


Figura 11. Estructura química del borneol (Fuente: Sigma-Aldrich).

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo ha sido cuantificar la variación estacional del rendimiento y de la concentración de los compuestos mayoritarios en el aceite esencial del endemismo valenciano *Thymus Piperella* L. Como objetivos específicos, pueden enumerarse los siguientes:

- La cuantificación rigurosa de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de dicha planta, aplicando el cálculo del factor de respuesta a los resultados del análisis por cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (Tissot *et al.*, (2012)).
- La variación estacional del rendimiento y la composición del aceite esencial de *Thymus Piperella* procedente de una población localizada en el macizo del Mondúver, en la comarca valenciana de La Safor.
- Estudio mediante Cromatografía de capa fina (CCF) para observar si existe uniformidad en la población en cuanto a la composición del aceite esencial (*screening* preliminar).

3. Material y métodos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Las muestras de *Thymus Piperella* L. utilizadas durante el trabajo fueron recogidas en la zona de Parpalló-Borrell situado al lado de la población de La Drova, en la vertiente SO del macizo del Mondúver, situado en la comarca valenciana de La Safor.



Figura 12. Localización del material vegetal de *Thymus Piperella* L. (área de muestreo).

Las muestras fueron recogidas a partir de 50 plantas individuales distribuidas aleatoriamente de modo uniforme en la zona de muestreo, separadas como mínimo a 10 m unas de otras, y cuidando de que el material seleccionado correspondiera a un estado fenológico similar.

3.2. SECADO DEL MATERIAL VEGETAL

Las muestras de *Thymus Piperella* L. fueron dejadas a secar hasta peso constante en las condiciones habituales del laboratorio con un control temporal de la temperatura y la humedad (método de secado utilizado generalmente en los estudios sobre aceites esenciales). Para estudiar la duración del proceso se separaron tras la primera recolección tres muestras pesándose cada cierto tiempo para controlar el peso hasta que éste fuera constante.

3.3. EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

3.3.1. Materiales

- Equipo Clevenger (Vitrafoc)
- Manta calefactora (Ibs-Instruments)
- Balanza analítica (Instrumentos científicos S.A.)
- Matracas balón (Vidrafoc)
- Viales de 30 mL

- Parafilm
- Equipo de refrigeración (PolyScience Inc.)
- Agua destilada
- Algodón
- Pipetas Pasteur

3.3.2. Fundamentos

La extracción del aceite esencial en los tres muestreos se realizó por hidrodestilación con el equipo Clevenger. Se trata de una técnica de destilación por arrastre con vapor de agua en la que mediante la ebullición de ésta junto al material vegetal, tiene lugar la separación de los componentes más volátiles que constituyen el aceite esencial. La extracción de estos componentes se basa en la aditividad de las presiones de vapor de líquidos inmiscibles. Al calentar el material vegetal junto con el agua, se produce la ebullición cuando la presión de vapor es igual a la presión atmosférica externa, con lo que los componentes volátiles del material vegetal pasan a estado de vapor a una temperatura inferior a la de su temperatura de ebullición como sustancias puras. Cuando el vapor generado se condensa, por su inmiscibilidad, queda separada la fase oleosa en la parte superior (lo que sería el aceite esencial) dado que generalmente es menos denso, y la fase acuosa en la parte inferior. Puede considerarse cuantitativa la separación del aceite esencial si este proceso tiene lugar con la duración adecuada (ordinariamente, 3-4 h) (Barrow, 1972).

3.3.3. Metodología

La estructura del equipo Clevenger viene descrita en la figura 13:

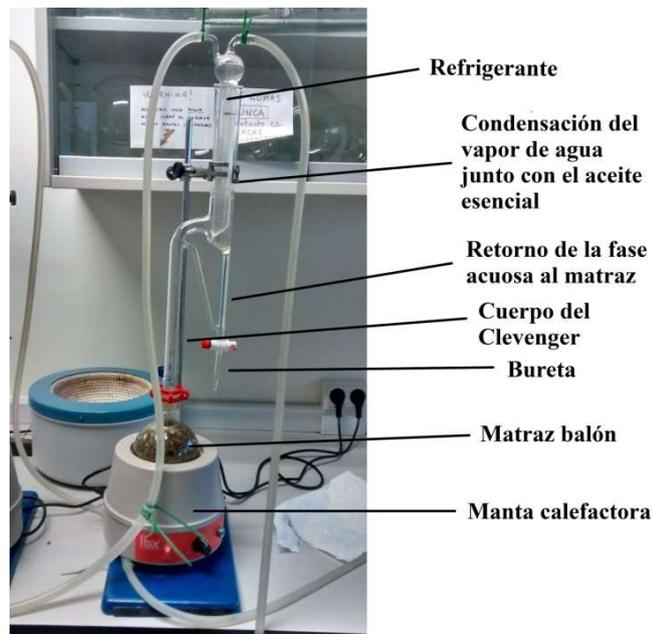


Figura 13. Partes del equipo Clevenger.

El equipo de hidrodestilación Clevenger consta de una manta calefactora, de un matraz de balón donde se introduce el material vegetal junto con el agua destilada, un tubo colector y un refrigerante a través del cual circula agua fría. El agua y el material vegetal del matraz de balón se calientan con la manta calefactora entrando en ebullición dando lugar a una corriente de vapor de agua que arrastra el aceite esencial de la muestra, de naturaleza volátil, condensando conjuntamente en el refrigerante y depositándose en el cuerpo del destilador Clevenger. En él se separan creando la fase acuosa en la parte inferior y la fase orgánica (aceite esencial) en la parte superior (Figura 14). Ambas fases se separan dejándolas fluir al abrir una llave, al igual que en las buretas ordinarias, de modo que, enrasando convenientemente el aceite esencial, puede determinarse el volumen obtenido. Todo este proceso tiene una duración total de 3 horas.

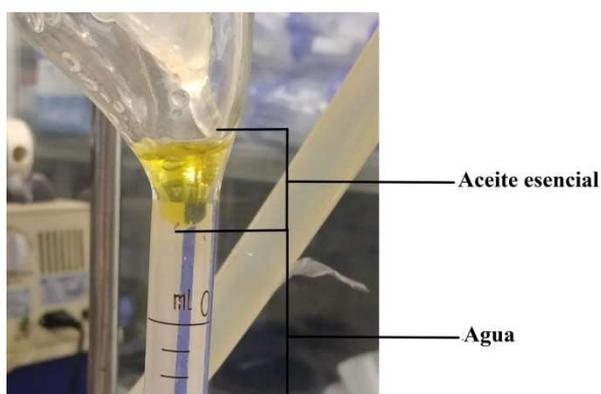


Figura 14. Separación de las fases en el equipo Clevenger.

Conociendo el volumen obtenido y la masa de material vegetal procesada, puede calcularse el rendimiento de aceite esencial extraído, como $[V(\text{mL})/m(\text{g})]$. No obstante, también puede determinarse, con mayor precisión, como % en masa, que es la opción adoptada en este trabajo.

Para ello es necesario separar cuidadosamente el aceite esencial, deshidratarlo mediante la adición de sulfato de sodio anhidro, filtrando posteriormente. El rendimiento se expresa entonces según:

$$\% = \frac{mEO}{mTP} \cdot 100$$

Donde:

mEO es la cantidad de aceite esencial extraído.

mTP es la cantidad de *Thymus Piperella* L. seca utilizada.

3.4. COMPOSICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

3.4.1. Cromatografía de capa fina (CCF)

3.4.1.1. Materiales

- Balanza analítica (Instrumentos científicos S.A.)
- Viales de vidrio
- Parafilm
- Algodón
- Vitrina de gases
- Capilares 10 µL (BlaubrandintraMark)
- Tolueno: acetato de etilo (93:7) (ALDRICH, pureza ≥99%)
- Placa de gel de sílice de 20 x 20 cm (DC-Fertigfolien Alugram Sil G/UV 254)
- Estufa
- Cubeta cromatográfica
- Lámpara UV con cabina de visualización
- Disolvente: Diclorometano (Scharlau)
- Reactivos: Vainillina sulfúrica A (1%) (Sigma-Aldrich, pureza ≥97%) y Anisaldehído sulfúrico B (10%) (Sigma-Aldrich, pureza 98%)

3.4.1.2. Fundamentos

La cromatografía en capa fina es una técnica que permite la separación de los componentes de una mezcla por la influencia de dos efectos contrapuestos como son la retención (afinidad por la fase estacionaria) y el desplazamiento (afinidad por la fase móvil) (Martínez & Csáky, 2008). En esta técnica, el eluyente (fase móvil) ha sido tolueno-acetato de etilo 93:7 y el absorbente (fase estacionaria) fue gel de sílice.

3.4.1.3. Metodología

Preparación de los extractos

En la Cromatografía de Capa Fina (CCF), más conocida por sus siglas en inglés TLC (Thin Layer Chromatography) se aplicó la metodología descrita por Wagner y Bladt (1996) para llevar a cabo el “screening” preliminar. Se añadió una pequeña cantidad de material procedente de cada individuo (0,2 g) y se sometió a extracción en viales de 5 ml añadiendo 1 mL de diclorometano a 0,1 g de material fresco. Posteriormente, se colocaron en un agitador orbital durante 15 minutos. Se filtró cada extracto succionando a través de una pequeña cantidad de algodón con una pipeta Pasteur para recuperar la totalidad del extracto sin ninguna impureza, transfiriéndolos a otros viales. Estos se llevaron a sequedad colocándolos abiertos en vitrina de gases hasta la evaporación total del disolvente. A continuación, se agregaron 100 µL de tolueno en cada vial. Finalmente, los viales fueron sellados con Parafilm y almacenados en el refrigerador a 4°C hasta el análisis por CCF. Este proceso se aplicó a un total de 30 muestras individuales de *Thymus Piperella* L.

Preparación y aplicación de los reactivos reveladores

Los reactivos utilizados para este experimento para la TLC fueron la vainillina y el anisaldehído sulfúrico, ambos utilizados para el revelado de los cromatofolios, observando así las distintas manchas correspondientes a los componentes del aceite esencial de *T. Piperella*.

El reactivo anisaldehído sulfúrico es utilizado para la detección de terpenoides, fenilpropanoides, principios amargos y saponinas. Para su preparación se utilizaron 0,5 ml de anisaldehído sulfúrico mezclado con 10 ml de ácido acético glacial, seguido de 85 ml de metanol y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, todo siguiendo este orden.

El reactivo vainillina es utilizado para la detección de componentes de aceites esenciales como son los terpenoides y los fenilpropanoides. Para su preparación se utilizaron dos disoluciones, la disolución A, constituida por un 1% de vainillina etanólica y la disolución B, de ácido sulfúrico en etanol al 10%. Para la aplicación de este reactivo primero la placa es rociada con un pulverizador con la disolución A y a continuación, rápidamente, con la B.

Para el desarrollo cromatográfico, las muestras a analizar se depositan con capilares de 20 μ l a 1 cm de distancia del borde inferior del cromatofolio del tamaño apropiado y una separación entre ellas de 1 cm. Posteriormente, el cromatofolio se coloca en una cubeta cerrada que contiene el eluyente. El desarrollo puede durar entre 20 minutos y 1 hora. A medida que ascienden por capilaridad a través de la fase estacionaria, se produce un reparto diferencial de los productos presentes en la muestra entre las fases móvil y estacionaria, quedando separados los compuestos que forman la mezcla. Estas manchas no son visibles, por lo que se utilizaron los reactivos vainillina y anisaldehído sulfúrico como agentes reveladores. Tras calentar el cromatofolio a una temperatura de 100°C durante 3-5 minutos, aparecieron reveladas las manchas, con diferentes colores tanto bajo la luz visible o ultravioleta, observándose fluorescencia de distintos colores. Dadas las características de la cámara de visualización, es posible fotografiar los cromatofolios bajo estas condiciones.

Se desarrollaron un total de 4 placas, dos de ellas numeradas del 1 al 16 y las otras dos del 17 al 30. En todas las placas también se depositaron muestras de *Thymus Vulgaris* y *Satureja montana* para comparar con las muestras de *Thymus Piperella*, dado que estas dos especies comparten hábitat con la población de *T. Piperella* estudiada y son las que podrían dar lugar a alguna confusión en la toma de muestras.

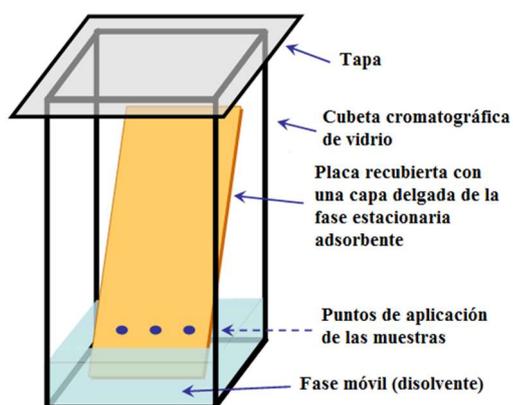


Figura 15. Imagen del proceso de una TLC. (Fuente: biomodel.uah.es)

Una vez el eluyente llega a unos pocos centímetros del final de las placas, y una vez extraídas éstas de la cubeta, se marca rápidamente con lápiz el límite superior al que ha llegado la fase móvil para, posteriormente, poder calcular el factor R_f . El valor de R_f (factor de migración) es la relación entre la distancia recorrida por la sustancia y la distancia recorrida por el frente de la fase móvil, ambas medidas desde el punto de siembra al centro de la mancha si esta es redonda o al centro del área de más intensidad si la mancha tiene cola (Quiroga, 2013).

El factor R_f tiene un valor aproximadamente constante para cada compuesto, comprendido entre 0 y 1, en unas condiciones cromatográficas determinadas, (para una fase estacionaria y un eluyente específicos). Este factor es de gran utilidad en la identificación de los compuestos. Para su cálculo se aplica la siguiente expresión:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto (X)}}{\text{Distancia recorrida por el eluyente (Y)}}$$

3.4.2. Cromatografía de gases (GC/MS)

3.4.2.1. Materiales

- Equipo GC/MS (Clarus 500 GC-MS)
- Viales cromatográficos de 2 mL

3.4.2.2. Fundamento

La cromatografía de gases junto con la espectrometría de masas son técnicas que constituyen una herramienta para separar, identificar y cuantificar componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas (Gutiérrez y Droguet, 2002), como es en nuestro caso de un aceite esencial.

La cromatografía de gases es un método físico de separación en el que los componentes de una mezcla, disueltos en una fase móvil gaseosa, se van desplazando con diferente velocidad a través de una fase estacionaria, produciéndose una separación de los diferentes componentes, de forma que puedan separarse y en cierta medida identificarse atendiendo a su particular velocidad de avance, dando lugar a una diferencia en los denominados “tiempos de retención”. No solo la fase móvil ha de ser un gas, también debe serlo la mezcla a separar; por ello, la cromatografía de gases requiere la volatilización previa de la muestra (García Segura *et al.*, 1996). Según la naturaleza de la fase estacionaria y el programa de temperatura empleado, los distintos compuestos son retenidos en mayor o menor medida por la fase estacionaria de modo que salen de la columna y entran en el detector a diferentes tiempos, tal como ya se indicó anteriormente.

En este trabajo se han utilizado dos detectores diferentes, el detector por espectroscopia de masas cuya finalidad es la identificación de los componentes y el detector de ionización de flama (FID) con la finalidad de la cuantificación de los componentes.

El detector de ionización de llama emite una señal que es proporcional a la cantidad de átomos de carbono presentes en cada uno de los compuestos que a través de la columna llegan

al detector. El resultado es un cromatograma en el que el porcentaje del área de cada pico puede considerarse una estimación aceptable del porcentaje de cada compuesto de la muestra.

La detección por espectrometría de masas es una técnica en la que los iones obtenidos de una sustancia, en general orgánica, se separan según su relación masa-carga iónica por impacto electrónico con un haz de electrones a 70 eV, dando a lugar a un espectro de masas característico de la citada sustancia. En la actualidad, la combinación directa de la cromatografía de gases con la espectrometría de masas se reconoce como uno de los sistemas más eficaces para el estudio de mezclas complejas de productos orgánicos. Conectando la salida del cromatógrafo de gases a la cámara de ionización de un espectrómetro de masas se puede obtener información estructural para cada uno de los componentes de la mezcla original, a medida que estos son eluidos en serie a la columna cromatográfica (Dabrio *et al.*, 1973).

3.4.2.3. Metodología

Para el análisis cuantitativo por GC-FID se utilizó un cromatógrafo Clarus 500 GC ((Perkin-Elmer Inc. Wellesley, PA, EE.UU.) equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar ZB-5 (30 m x 0.25 mm id x 0.25 µm de espesor de película; Phenomenex Inc. Torrance CA. EE.UU.). El volumen de inyección fue de 1 µL mientras que la temperatura del horno GC se programó de 50°C a 250°C a una velocidad de 3°C min⁻¹. El gas portador fue el helio (1,2 mL min⁻¹). Las temperaturas del inyector y del detector se ajustaron a 250°C. El porcentaje de composición del aceite esencial se calculó a partir de las áreas de picos de GC sin factores de corrección mediante el software Total Chrom 6.2 (Perkin-Elmer Inc. Wellesley, PA, EE.UU.).

Para el análisis cualitativo de GC-MS se realizó con un Clarus 500 GC-MS equipado con la misma columna capilar, soporte y condiciones de operación descritas anteriormente para el análisis de GC-FID. La temperatura de la fuente de ionización se ajustó a 200°C y se empleó el modo de impacto electrónico de 70 eV. Los espectros de MS se obtuvieron mediante el modo de exploración iónica total (TIC) (rango de masa m/z 45-500 uma). Los cromatogramas de iones totales y los espectros de masas se procesaron con el software Turbomass 5.4 (Perkin-Elmer Inc.). Los índices de retención lineales se determinaron mediante la inyección de patrones de n-alcenos (C8-C25) (Supelco. Bellefonte. PE, EE.UU.) en las mismas condiciones. La identificación de los resultados se realizó combinando el cálculo de los índices de retención lineal para cada pico y el análisis mediante GC-EM. Para ello se llevó a cabo la comparación automática de los espectros de masas de cada pico con los procedentes de la biblioteca de espectros de masas (NIST MS 2.0), mediante las aplicaciones informáticas AMDIS y Turbomass 2.0. Al mismo tiempo, fueron también calculados los índices de retención lineales mediante la expresión:

$$IRL = \left[\frac{t_r(\text{desconocido}) - t_r(n)}{t_r(N) - t_r(n)} \right] \cdot (100 \cdot z) + (100 \cdot n)$$

Donde:

n es el número de átomos de carbono del n-alceno que eluye antes del pico analizado

N es el número de átomos de carbono del n-alceno que eluye después del pico analizado

z es la diferencia del número de átomos de carbono de n-alceno entre el que eluye antes del pico analizado y el de después del pico analizado

t_{Rx} es el tiempo de retención del pico analizado

t_{Rn} es el tiempo de retención del n-alcano anterior al pico analizado

t_{RN} es el tiempo de retención del n-alcano posterior al pico analizado

Los índices calculados fueron posteriormente comparados con los referidos en la bibliografía (Adams, 2007). La identificación de los siguientes compuestos también se confirmó mediante la comparación de su índice de retención lineal experimental (LRI) con los estándares de referencia auténticos (Sigma-Aldrich. Madrid. España): α -pineno, β -pineno, canfeno, mirceno, limoneno, (Z) - β -ocimeno, alcanfor, terpinoleno y terpinen-4-ol.

El proceso analítico queda esquematizado en el siguiente diagrama:

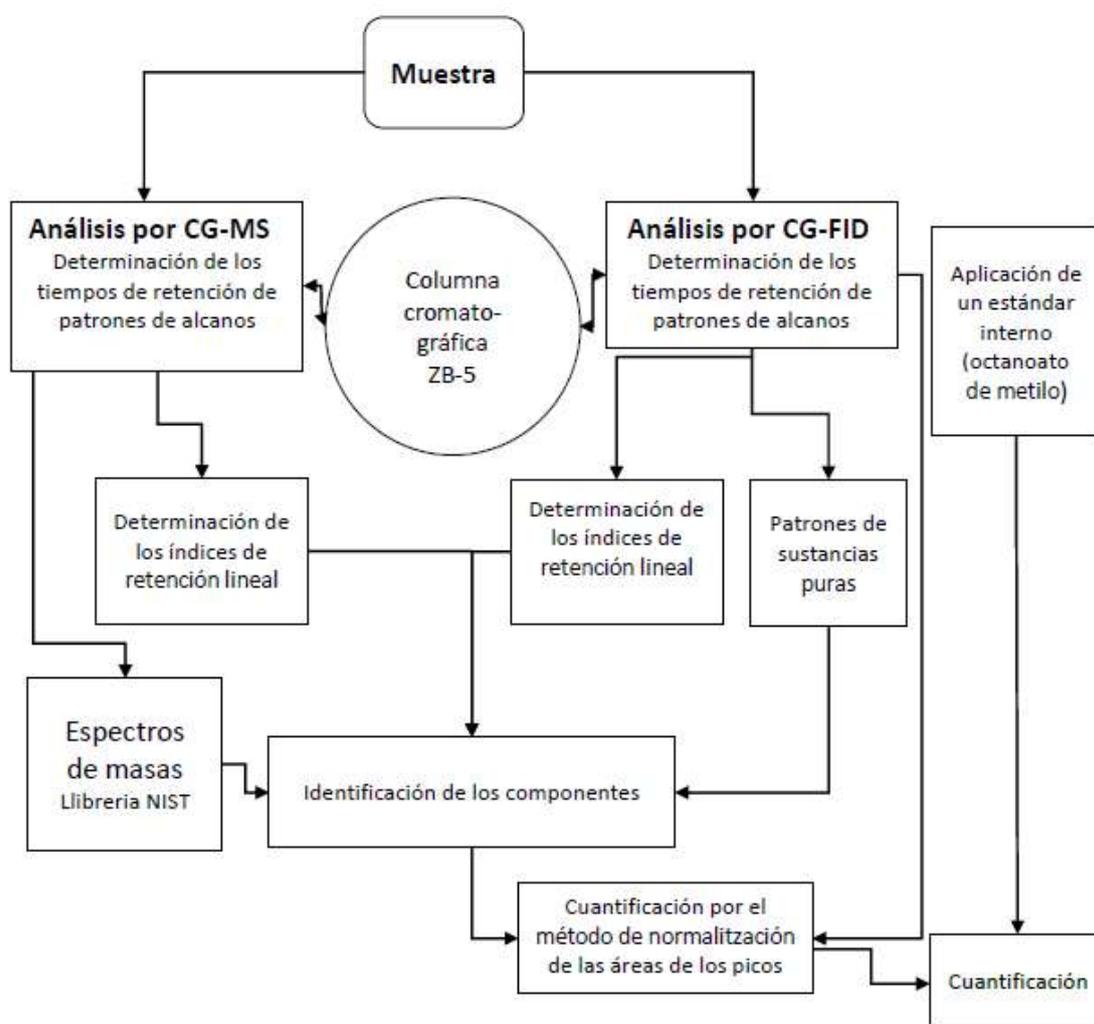


Figura 16. Esquema del método analítico.

3.4.2.4. Cálculo del factor de respuesta y cuantificación de los compuestos

Principio

La cuantificación de los compuestos mayoritarios se realizó de acuerdo con las orientaciones propuestas en el reciente Simposio Internacional de Aceites Esenciales (ISEO 2016), mediante el protocolo experimental propuesto por Cachet et al. (2016) en el que se aplica a los % de las áreas de los picos la corrección correspondiente al factor de respuesta de cada compuesto, calculado mediante la aplicación de ecuaciones empíricas basadas en la estructura molecular de cada compuesto. Para cada muestra, 1 μL de una disolución en hexano que contiene masas conocidas de aceite esencial y de estándar interno, es inyectada en el cromatógrafo. En este caso, el estándar interno utilizado fue el octanoato de metilo (MO) (Sigma-Aldrich) con una pureza del 99%.

Tal como se ha indicado, los factores de respuesta pueden predecirse a partir de la fórmula molecular de compuestos que contengan los átomos C, H, O, N, S, F, Cl, Br, I y Si, siempre que la fórmula y el número de anillos bencénicos sea conocido.

Esta técnica, también se puede usar para estimar la pureza de sustancias aromatizantes o estándares cromatográficos definidos químicamente utilizando estos factores de respuesta relativos (RRF) predichos (Cachet *et al.*, 2016).

Predicción del RRF

La predicción del factor de respuesta del analito (RRF_i^{Pred}) se calcula con utilizándola fórmula molecular:

$$RRF_i^{Pred} = 10^3 \cdot \left(\frac{MW_i}{MW_{ISTD}} \right) \cdot (-61,3 + 88,8 \cdot n_C + 18,7 \cdot n_H - 41,3 \cdot n_O + 6,4 \cdot n_N + 64 \cdot n_S - 20,2 \cdot n_F - 23,5 \cdot n_{Cl} + 51,6 \cdot n_{Br} - 1,75 \cdot n_I + 39,9 \cdot n_{Si} + 127 \cdot n_{Benz})^{-1}$$

Donde:

n_C es el número de átomos de carbono en el compuesto

n_H es el número de átomos de hidrógeno en el compuesto

n_O es el número de átomos de oxígeno en el compuesto

n_N es el número de átomos de nitrógeno en el compuesto

n_S es el número de átomos de azufre en el compuesto

n_F es el número de átomos de flúor en el compuesto

n_{Cl} es el número de átomos de cloro en el compuesto

n_{Br} es el número de átomos de bromo en el compuesto

n_I es el número de átomos de yodo en el compuesto

n_{Si} es el número de átomos de silicio en el compuesto

n_{Benz} es el número de anillos de benceno

MW_i es el peso molecular del analito

MW_{ISTD} es peso molecular del estándar interno

Cuantificación

Para la cuantificación de la masa de los compuestos (m_i) que queremos saber se utiliza la fórmula:

$$m_i = RRF_i^{Pred} \cdot m_{MO} \cdot \frac{A_i}{A_{MO}}$$

Donde:

RRF_i^{Pred} es el factor de respuesta calculado anteriormente

m_{MO} es la masa del estándar interno agregada a la muestra

A_i es el área del pico del compuesto

A_{MO} es área del pico del estándar interno

Procesamiento estadístico de datos

Se aplicó un análisis ANOVA seguido de una prueba de rango múltiple para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en el rendimiento y la composición entre las muestras realizadas en cada de una de las estaciones del año utilizando Statgraphics Centurion XVI® (Statpoint Technologies Inc.). El criterio adoptado para evaluar la significación de las diferencias fue la prueba LSD de Fisher ("Least Significant difference", $P < 0.05$). Para cumplir con el requisito de homocedasticidad, los datos de porcentaje originales se sometieron

a la transformación $arcsin = \sqrt{\frac{\%}{100}}$.

4. Resultados y discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS DEL SEGUIMIENTO DE LAS CONDICIONES METEOROLÓGICAS DURANTE EL PERIODO DE TIEMPO ESTUDIADO: TEMPERATURA, PRECIPITACIONES Y HUMEDAD RELATIVA

En la figura siguiente se pueden observar las temperaturas máximas y mínimas, la humedad relativa y como así también las precipitaciones diarias en período de enero a agosto de 2018, el cual abarca la fase de toma de muestras. La gráfica presenta irregularidades correspondientes a episodios muy comunes en nuestro ámbito geográfico, principalmente, la alternancia de periodos de extremada sequía, sobre todo estival, y precipitaciones intensas o incluso torrenciales como la de agosto de 2018, cuando en un solo día cayeron más de 100 mm, algo un poco inusual en esa época del año para esta zona geográfica. Este seguimiento puede ayudar a interpretar la influencia de los factores meteorológicos en el desarrollo de la planta y, por tanto, en la composición del aceite esencial.

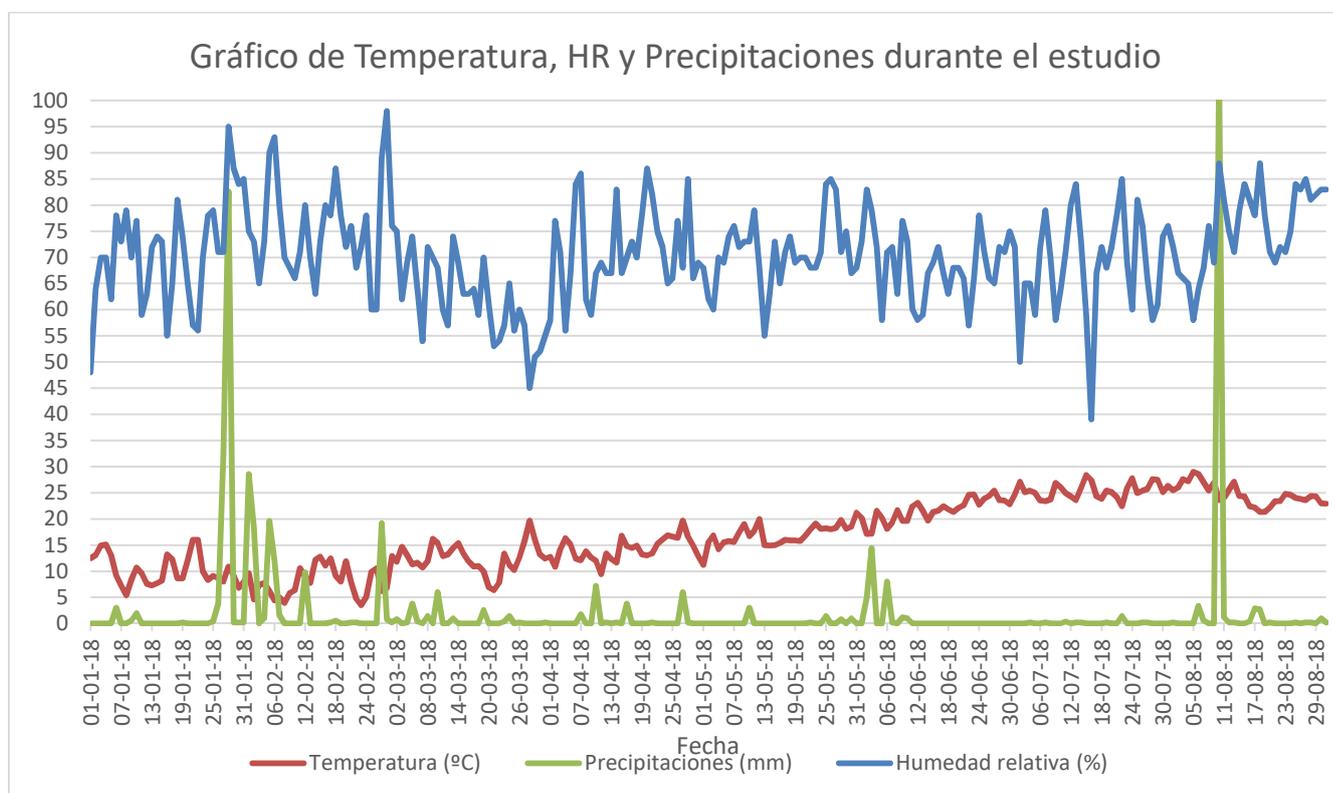


Figura 17. Gráfico de temperatura, humedad relativa y precipitaciones durante el estudio. (Escala común para las tres variables estudiadas).

4.2. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

A continuación se muestran cuatro figuras que corresponden a los cromatofolios con las 30 muestras diferentes de *T. Piperella* y la comparación con *T. Vulgaris* y *Satureja montana* con el revelador pulverizado de vainillina (Figuras 18 y 19) observado a luz visible y con el revelador pulverizado de anisaldehído sulfúrico (Figuras 20 y 21) observado a luz ultravioleta.

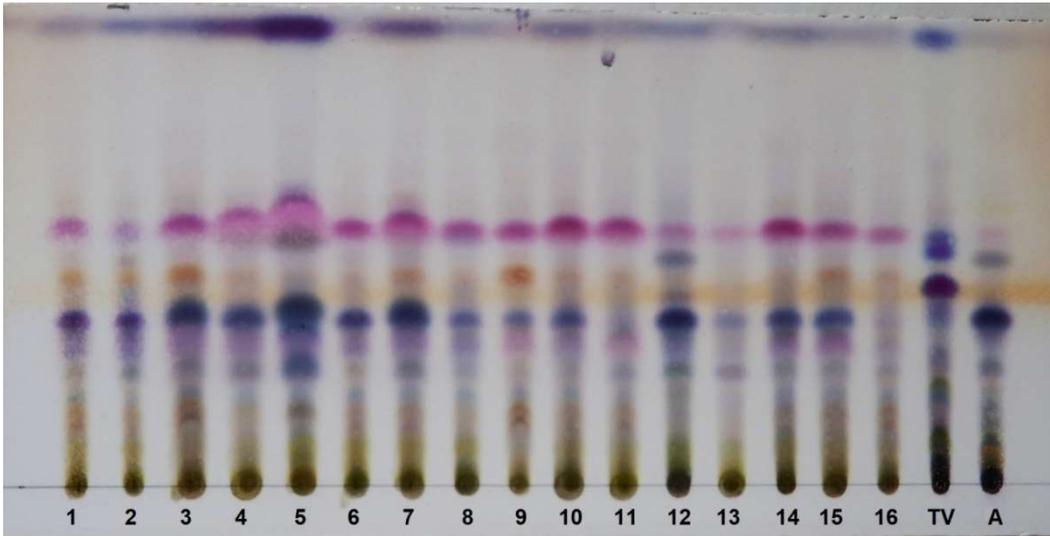


Figura 18. Cromatogramas obtenidos utilizando vainillina.

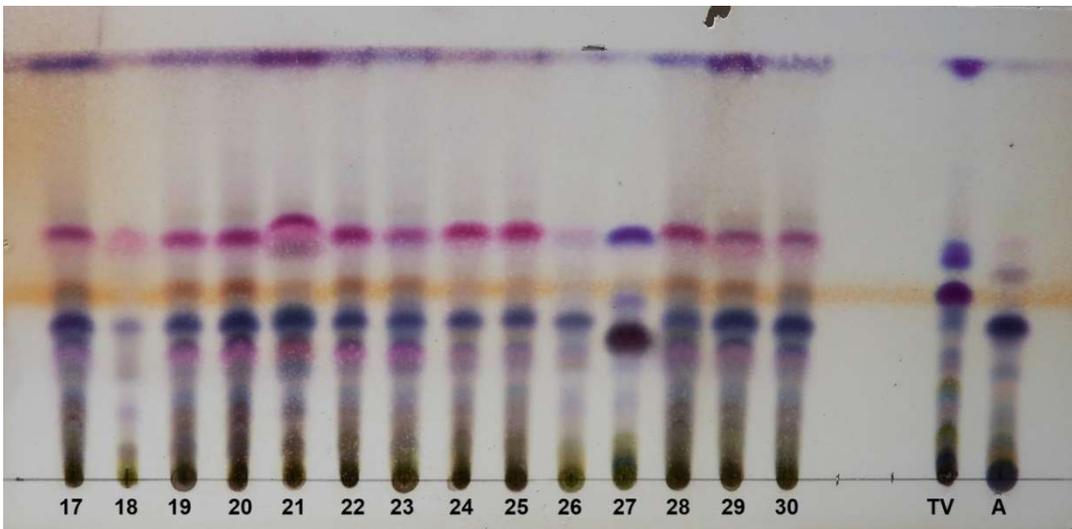


Figura 19. Cromatogramas obtenidos utilizando vainillina.

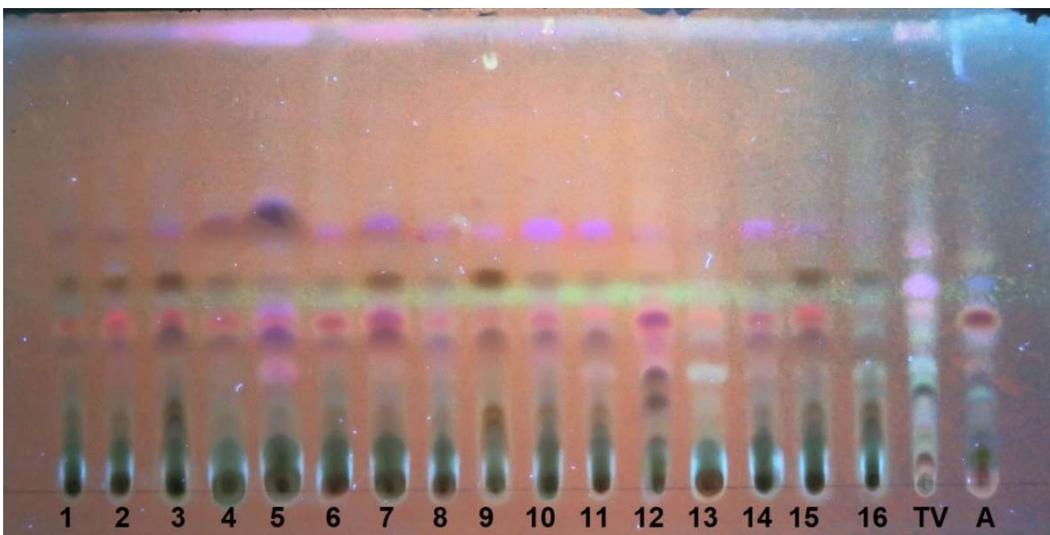


Figura 20. Cromatogramas obtenidos utilizando anisaldehído sulfúrico.

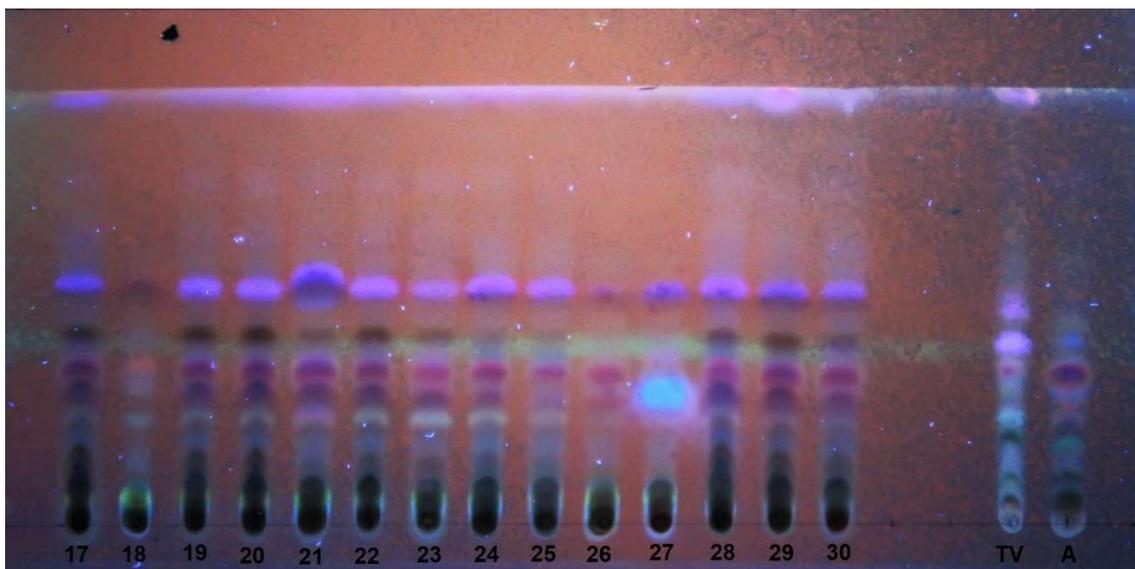


Figura 21. Cromatogramas obtenidos utilizando anisaldehído sulfúrico.

Como se puede observar en estas cuatro figuras, los perfiles cromatográficos de las 30 muestras son prácticamente similares tanto con los reveladores de vainillina como de anisaldehído sulfúrico. A excepción de las muestras 5, 12 y 27, en que se observa un desarrollo de las manchas cualitativamente diferente a las demás, el resto puede considerarse uniforme. Por otra parte, el perfil de la muestra nº 27 tampoco coincide con los de *Thymus Vulgaris* y *Satureja montana*, por lo que cabe descartar una posible confusión con estas especies.

Existen otras muestras, como la 13, 18 y 26 en las que se observa una menor intensidad de color. Esto puede ser debido simplemente a una menor concentración de aceite esencial, ya que pueda depender del estado vegetativo en el que se encontraba ese individuo. Tratándose, consecuentemente, de diferencias cuantitativas pero no cualitativas. Éstas son claramente evidentes solo cuando aparecen manchas con diferente coloración y distinto R_f , tal como ocurre en las ya citadas (5, 12 y 27).

En todas las figuras, se observa una línea continua de color naranja en el revelador de vainillina y una línea continua de color verde en el revelador de anisaldehído sulfúrico. Ambas líneas son comunes a todas las muestras, esto se trata de una impureza del disolvente dado que ha subido de forma uniforme independientemente de las manchas.

La figura 22 con el revelador anisaldehído sulfúrico y visto bajo la luz ultravioleta se pueden observar las manchas que corresponden al γ -terpineno y carvacrol, por lo que se puede comparar con las figuras 20 y 21 y ver si todas contienen estos compuestos en sus perfiles.

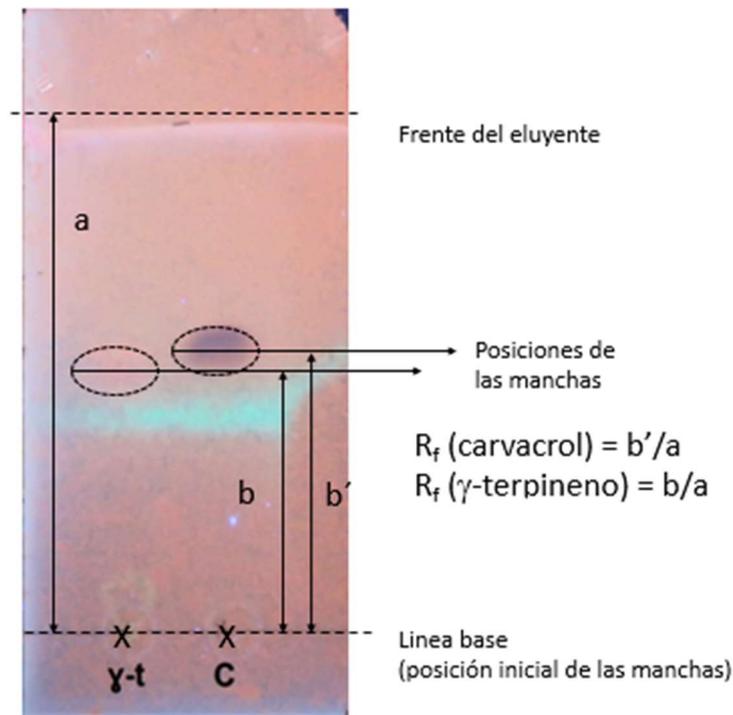


Figura 22. Cromatograma utilizando anisaldehído sulfúrico con compuesto puros de γ -terpineno y carvacrol.

Comparando las figuras 3 y 4 con la figura x, se puede observar que casi todas las muestras contienen Carvacrol en mayor o menor concentración, no apreciándose claramente en las muestras 5, 13, 18, 26 y 27.

Pese a que la población muestra una aceptable uniformidad, es evidente la presencia de individuos con composiciones diferentes. Ello no es una excepción, ya que en otros estudios realizados con *Thymus vulgaris*, en esta misma zona, basados en el análisis de plantas individuales, ya se observó este hecho (Llorens-Molina y Vacas, 2017). También se ha observado en otras especies como *Artemisia absinthium* L. (Llorens-Molina *et al.*, 2017) o *Mentha longifolia* L. (Llorens-Molina *et al.*, 2017).

Estos resultados muestran que el *screening* cualitativo de la población puede ser una alternativa para mejorar la fiabilidad de los resultados en este tipo de investigaciones, frente al método tradicional de muestreo, utilizado en este trabajo, basado en la mezcla de material vegetal obtenido de un cierto número de individuos escogidos al azar.

4.3. RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL

A continuación, en la tabla 1 podemos observar la cantidad de material secado de *Thymus Piperella* L. utilizado en cada muestra como también la cantidad de aceite esencial extraído y su rendimiento.

En la tesis doctoral de Antonio Blanquer (1996), se observó que el máximo rendimiento cuantitativo del aceite esencial de *Thymus Piperella* L. se producía en el periodo de floración, durante el cual se llegaba a duplicar el contenido esencial de la planta. En nuestro caso, también se observa dicho aumento en el rendimiento y en la cantidad extraída del aceite esencial

conforme la planta se prepara para la floración, es decir, cuando mayor es el desarrollo vegetativo.

Tabla 1. Rendimiento de la extracción de aceite esencial con media y desviación estándar.

	Muestra	Cantidad (g)	Cantidad (mL)	Rendimiento (%)
PRIMER MUESTREO	A	38,18	0,70	1,83
	B	40,03	0,60	1,50
	C	21,38	0,40	1,87
	D	22,65	0,45	1,99
	Media±SD	30,56	0,54	1,80±0,21
SEGUNDO MUESTREO	A	25,14	0,50	1,99
	B	25,33	0,50	1,97
	C	25,23	0,55	2,18
	D	25,75	0,60	2,33
	Media±SD	25,36	0,54	2,12±0,17
TERCER MUESTREO	A	30,57	0,90	2,94
	B	20,75	0,55	2,65
	C	20,72	0,35	1,69
	D	30,70	0,80	2,61
	Media±SD	25,69	0,65	2,47±0,54
CUARTO MUESTREO	A	50,00	1,10	2,20
	B	30,00	0,65	2,17
	C	30,00	0,67	2,23
	D	32,00	0,70	2,19
	Media±SD	35,50	0,78	2,20±0,03

4.4. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *THYMUS PIPERELLA* L.

4.4.1. Análisis cualitativo. Identificación de la composición por espectroscopia de masas

En la tabla siguiente (Tabla 2), podemos observar la composición total del aceite esencial de *T. Piperella* con el tiempo de retención, el índice de retención lineal calculado y el bibliográfico.

Tabla 2. Composición total del aceite esencial de *T. Piperella*.

tr	Compuesto	IRL ²	IRL (BIB) ³	% (GC/MS-TIC)
4.158	(2E)-Hexenal	859	855	0,02
6.174	Triciclono	921	926	0,02

²IRL: Índice de retención lineal experimental.

³IRL (BIB): índice de retención lineal bibliográfico.

6.344	α -Tuyeno	925	930	0,24
6.594	α -Pineno	932	939	0,70
7.145	Canfeno	946	954	1,23
7.345	Tuya-2,4(10)-dieno	951	960	0,00
8.105	Sabineno	971	975	0,02
8.220	β -Pineno	974	979	0,15
8.410	3-Octanona	979	983	0,13
8.850	Mirceno	991	990	0,52
9.385	α -Felandreno	1.004	1.002	0,03
9.641	δ -3-Careno	1.010	1.011	0,02
9.936	α -Terpineno	1.016	1.017	0,40
10.481	<i>p</i> -Cimeno	1.028	1.024	16,81
10.566	Limoneno	1.030	1.029	0,76
10.626	1,8-Cineol	1.031	1.031	0,54
10.951	(<i>Z</i>)- β -Ocimeno	1.038	1.037	0,01
11.416	(<i>E</i>)- β -Ocimeno	1.048	1.050	0,05
11.966	γ -Terpineno	1.060	1.059	7,94
12.252	(<i>Z</i>)-Hidrato de sabineno	1.066	1.070	0,31
12.482	(<i>Z</i>)-Óxido de linalool (furanoide)	1.072	1.072	0,10
12.942	Canfenilona	1.082	1.082	0,03
13.222	(<i>E</i>)-Óxido de linalol	1.088	1.086	0,46
13.717	(<i>E</i>)-Hidrato de sabineno	1.098	1.098	0,11
13.912	Linalool	1.103	1.096	3,83
14.047	Hotrienol	1.105	1104 ⁴	0,08
14.808	Ment-2-en-1-ol	1.122	1.121	0,05
14.978	α - Canfolenal	1.125	1.126	0,04
15.928	Alcanfor	1.145	1.146	11,27
16.673	Pinocarvona	1.161	1.164	0,02
16.983	Borneol	1.168	1.169	3,31
17.464	Terpinen-4-ol	1.178	1.177	1,24
17.864	<i>p</i> -Cimen-8-ol	1.186	1.182	0,24
18.089	α -Terpineol	1.191	1.188	0,15
18.349	(<i>Z</i>)-Dihidrocarvona	1.196	1.192	0,09
18.669	(<i>E</i>)-Dihidrocarvona	1.203	1.200	0,05
20.095	(<i>E</i>)-Ocimenona <trans>	1.234	1.238	0,01
20.360	Cuminaldehído	1.240	1.241	0,02
20.560	Carvacrol metil eter	1.244	1.244	0,10
22.441	Acetato de bornilo	1.285	1.285	0,10
22.866	Timol	1.295	1.290	0,20
23.146	Timol	1.301	1.290	1,22
23.946	Carvacrol	1.319	1.299	40,17
25.320	α -Cubebeno	1.351	1.351	0,00
25.650	Acetato de timol	1.358	1.352	0,00
26.432	Acetato de carvacrol	1.376	1.372	0,19
26.827	β -Bourboneno	1.385	1.388	0,17
27.182	β -Elemeno	1.393	1.390	0,01
28.368	β -Cariofileno	1.422	1.419	2,76
28.733	β -Copaeno	1.430	1.432	0,02

⁴ Javidnia *et al.*, 2002.

29.133	Aromadendreno	1.440	1.441	0,03
29.743	α -Humuleno	1.455	1.454	0,11
30.054	Allo-aromadendreno	1.462	1.460	0,04
30.784	γ -Muuroleno	1.480	1.479	0,02
30.934	Germacreno-D	1.483	1.481	0,25
31.294	Exileno (γ -elemeno)	1.492	1.436	0,01
31.599	Biclogermacreno	1.499	1.500	0,37
31.804	α -Muuroleno	1.504	1.500	0,01
32.339	γ -Cadideno	1.518	1.513	0,03
32.760	δ -Cadideno	1.528	1.523	0,07
35.060	Espatuleno	1.586	1.578	0,47
35.201	Óxido de cariofileno	1.590	1.583	2,21
35.551	Viridiflorol	1.599	1.592	0,01
36.201	Epóxido de humuleno (II)	1.616	1.608	0,02
37.081	α -Acorenol	1.638	1.633	0,01
37.932	β -Eudesmol	1.660	1.650	0,02
38.187	α -Cadinol	1.667	1.654	0,02

A continuación, en la Figura 23, se muestra un cromatograma GC/MS donde se identifican los picos más representativos de los compuestos durante este estudio.

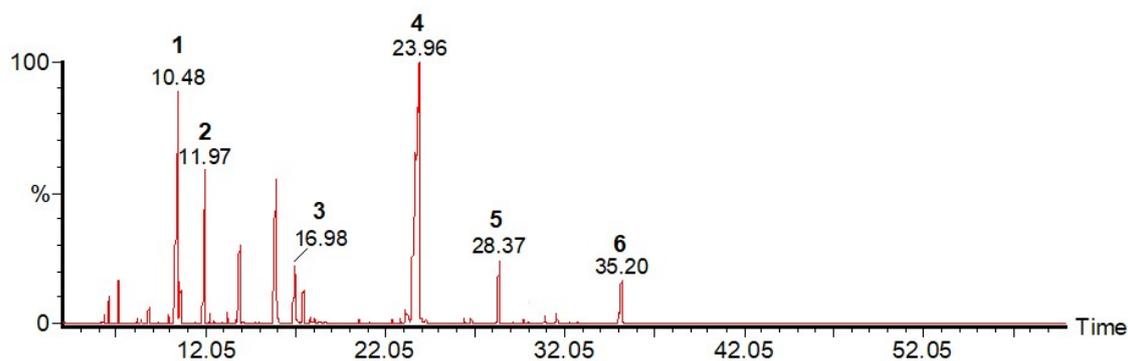


Figura 23. Cromatograma GC/MS con la identificación de los compuestos principales: (1) *p*-Cimeno, (2) γ -Terpineno, (3) Borneol, (4) Carvacrol, (5) β -Cariofileno, (6) Óxido de cariofileno.

Los compuestos mayoritarios encontrados fueron: carvacrol, γ -terpineno, *p*-cimeno, borneol, cariofileno y óxido de cariofileno. Con ello podemos identificar el quimiotipo al que pertenecen estas muestras. Al ser los compuestos mayoritarios en la etapa de plena floración el carvacrol, terpineno y *p*-cimeno, podemos decir que pertenece al quimiotipo A.

4.4.2. Estudio y discusión de los resultados obtenidos del ANOVA comparando entre los diferentes muestreos y compuestos principales

A continuación podemos observar una serie de gráficas que muestran las medias de los diferentes compuestos principales a lo largo de los 4 muestreos realizados con una confianza del 95% (Fisher LSD test).

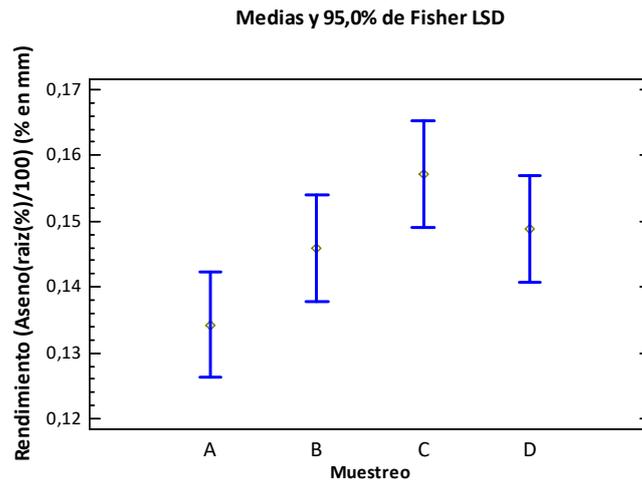


Figura 24. Comparación de la media de los rendimientos obtenidos durante los muestreos con un nivel de confianza del 95%.

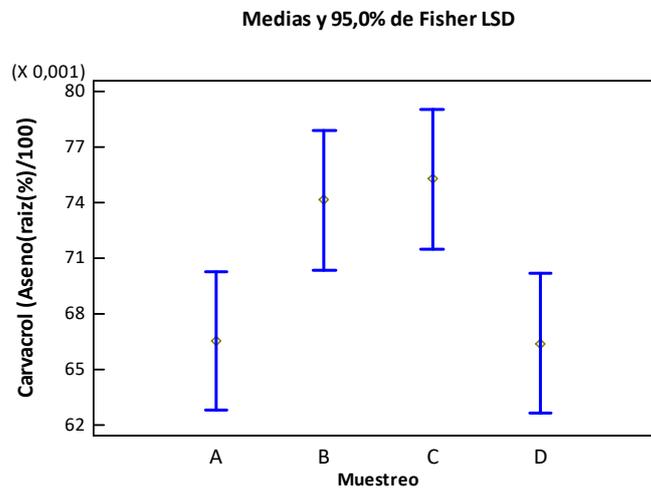


Figura 25. Comparación del carvacrol obtenido durante los muestreos con un nivel de confianza del 95%.

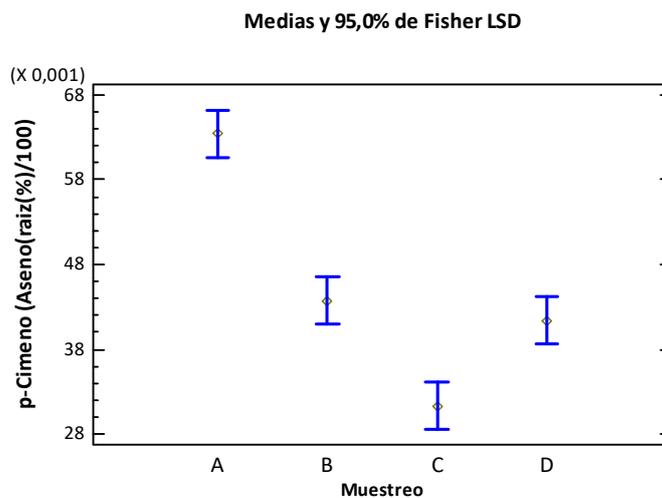


Figura 26. Comparación del *p*-cimeno obtenido durante los muestreos con un nivel de confianza del 95%.

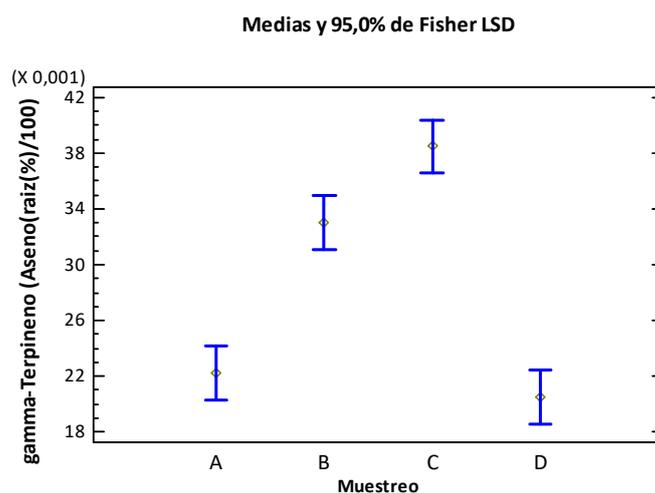


Figura 27. Comparación del γ -terpineno obtenido durante los muestreos con un nivel de confianza del 95%.

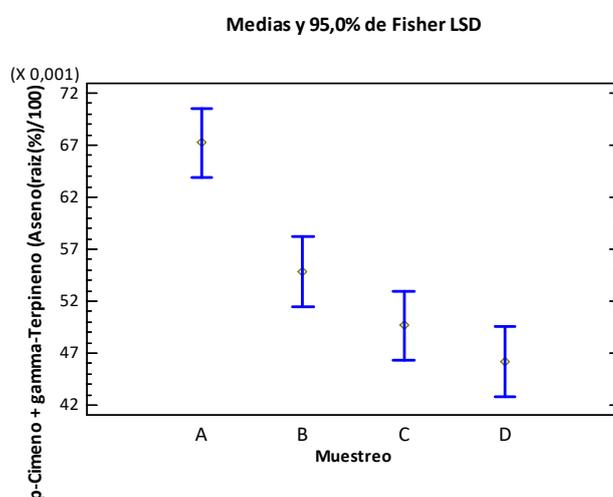


Figura 28. Comparación del γ -terpineno + p -cimeno obtenido durante los muestreos con un nivel de confianza del 95%.

En la figura 28, podemos observar la suma de p -cimeno y γ -terpineno, precursores metabólicos del carvacrol. A pesar del aumento de γ -terpineno durante los tres primeros muestreos de (Figura 27), la suma de ambos compuestos experimenta un claro descenso, que podemos interpretar teniendo en cuenta su transformación progresiva en carvacrol.

Aun así, observando las tres figuras en conjunto del carvacrol (Figura 25), p -cimeno (Figura 26) y γ -terpineno (Figura 27), se observa que en el último muestreo ha habido un descenso del carvacrol y γ -terpineno y un aumento del p -cimeno, por lo que basándonos en la ruta metabólica tradicional (Thompson *et al.*, 2003) podemos decir que ha habido una paralización en la transformación entre p -cimeno y carvacrol.

Medias y 95,0% de Fisher LSD

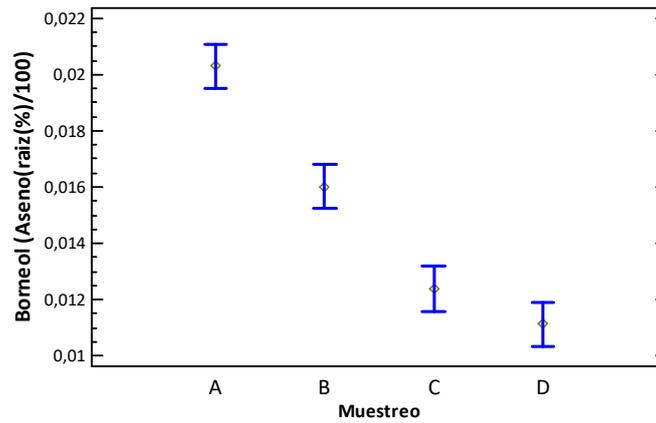


Figura 29. Comparación del borneol obtenido durante los muestreos con un nivel de confianza del 95%.

Medias y 95,0% de Fisher LSD

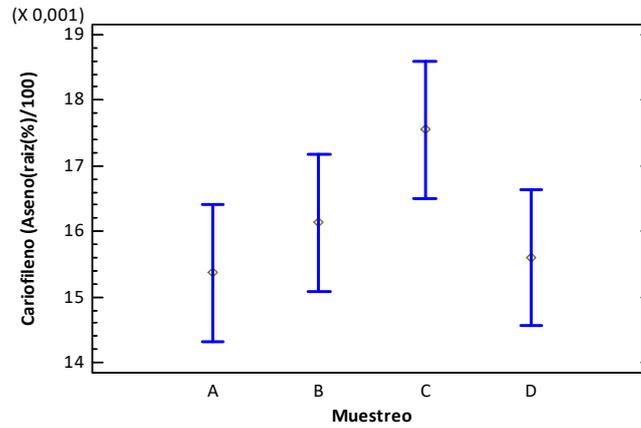


Figura 30. Comparación del cariofileno obtenido durante los muestreos con un nivel de confianza del 95%.

Medias y 95,0% de Fisher LSD

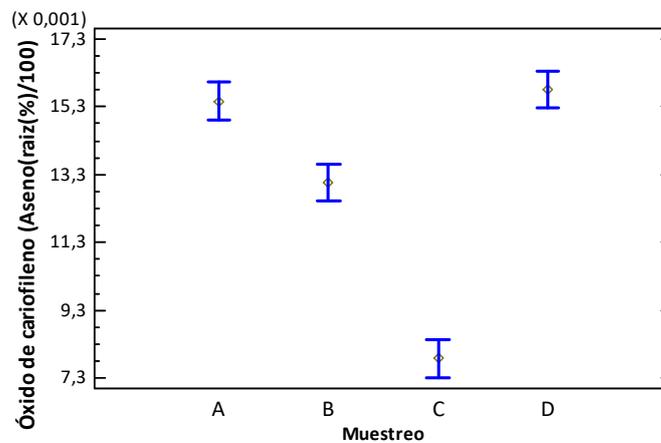


Figura 31. Comparación del óxido de cariofileno obtenido durante los muestreos con un nivel de confianza del 95%.

Medias y 95,0% de Fisher LSD

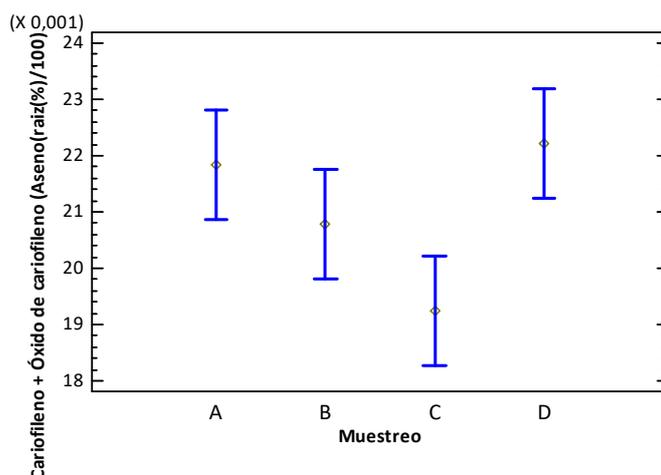


Figura 32. Comparación del cariofileno y óxido de cariofileno obtenido durante los muestreos con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 3. Composición química del aceite esencial de *Thymus Piperella* L. durante los 4 muestreos (valores medios y desviaciones estándar de cuatro repeticiones para cada compuesto a lo largo de los cuatro muestreos realizados)

MUESTREO	COMPUESTO	Muestra				MEDIA ± SD
		1	2	3	4	
1	Carvacrol	42,56%	36,93%	48,64%	49,31%	42,46±0,07
	p-cimeno	40,50%	38,83%	40,08%	41,26%	40,86±0,02
	γ-terpineno	5,52%	4,49%	4,98%	4,75%	5,04±0,005
	Borneol	4,11%	3,81%	4,18%	4,38%	4,15±0,002
	Cariofileno	3,24%	1,81%	2,78%	2,65%	2,54±0,005
	Óxido de cariofileno	2,70%	2,63%	3,31%	2,98%	2,80±0,004
2	Carvacrol	52,73%	46,68%	56,97%	63,70%	54,20±6,47
	p-cimeno	21,63%	18,34%	17,57%	19,14%	18,96±1,60
	γ-terpineno	11,34%	11,46%	9,27%	11,66%	10,87±0,98
	Borneol	3,08%	2,34%	2,33%	2,56%	2,42±0,47
	Cariofileno	3,24%	3,17%	3,44%	3,53%	2,68±1,50
	Óxido de cariofileno	2,33%	2,00%	2,74%	2,70%	1,95±1,13
3	Carvacrol	70,89%	56,41%	50,38%	49,63%	59,59±10,54
	p-cimeno	9,20%	8,15%	11,87%	10,23%	10,69±2,30
	γ-terpineno	14,34%	12,79%	17,11%	15,17%	16,04±3,07
	Borneol	1,89%	1,21%	1,42%	1,65%	1,68±0,39
	Cariofileno	3,85%	3,17%	4,38%	2,90%	2,86±1,70
	Óxido de cariofileno	1,06%	0,79%	0,72%	0,63%	0,64±0,39
4	Carvacrol	46,29%	46,40%	31,11%	46,12%	41,53±6,9
	p-cimeno	23,36%	18,23%	14,32%	17,71%	16,83±4,79
	γ-terpineno	5,55%	4,66%	3,35%	4,91%	4,13±1,35
	Borneol	1,42%	1,46%	0,59%	1,20%	1,12±0,37
	Cariofileno	2,09%	2,87%	1,87%	2,95%	1,96±1,19
	Óxido de cariofileno	2,81%	3,11%	2,21%	2,92%	2,21±1,28

Tabla 4. Media y desviación estándar de los compuestos principales durante los cuatro muestreos (letras diferentes a lo largo de una fila indican diferencias significativas según el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de confianza del 95%)

COMPUESTO	Muestreo			
	1	2	3	4
Carvacrol	42,46±0,07 a	54,20±6,47 b	59,59±10,54 b	41,53±6,90 a
<i>p</i> -cimeno	40,86±0,02 c	18,96±1,60 b	10,69±2,30 a	16,83±4,79 b
γ -terpineno	5,04±0,005 a	10,87±0,98 b	16,04±3,07 c	4,13±1,35 a
Borneol	4,15±0,002 c	2,42±0,47 b	1,68±0,39 a	1,12±0,37 a
Cariofileno	2,54±0,005 a	2,68±1,50 ab	2,86±1,70 b	1,96±1,19 ab
Óxido de cariofileno	2,80±0,004 c	1,95±1,13 b	0,64±0,39 a	2,21±1,28 c

En síntesis, en las figuras anteriores podemos distinguir tres pautas de variación para el carvacrol y sus dos precursores en las que se observan diferencias significativas aplicando como criterio los intervalos LSD de Fisher ($P < 0.05$): el γ -terpineno aumenta hasta el tercer muestreo y en el cuarto disminuye notablemente; el *p*-cimeno muestra una evolución inversa, aunque el aumento final no es tan acusado como la disminución del γ -terpineno. Estas variaciones vienen asociadas a un aumento de carvacrol al principio del ciclo vegetativo y su disminución al final.

Estas variaciones quedan expresadas en la figura siguiente, en la que observamos conjuntamente la evolución del carvacrol, *p*-cimeno y γ -terpineno durante los 4 muestreos. Hay algunos estudios que relacionan la abundancia de compuestos fenólicos con las características del clima mediterráneo (temperaturas benignas, precipitaciones relativamente escasas y sobre todo, sequía estival), frente a los quimiotipos no fenólicos, asociados a otras condiciones bioclimáticas (Bruneton, 1995).

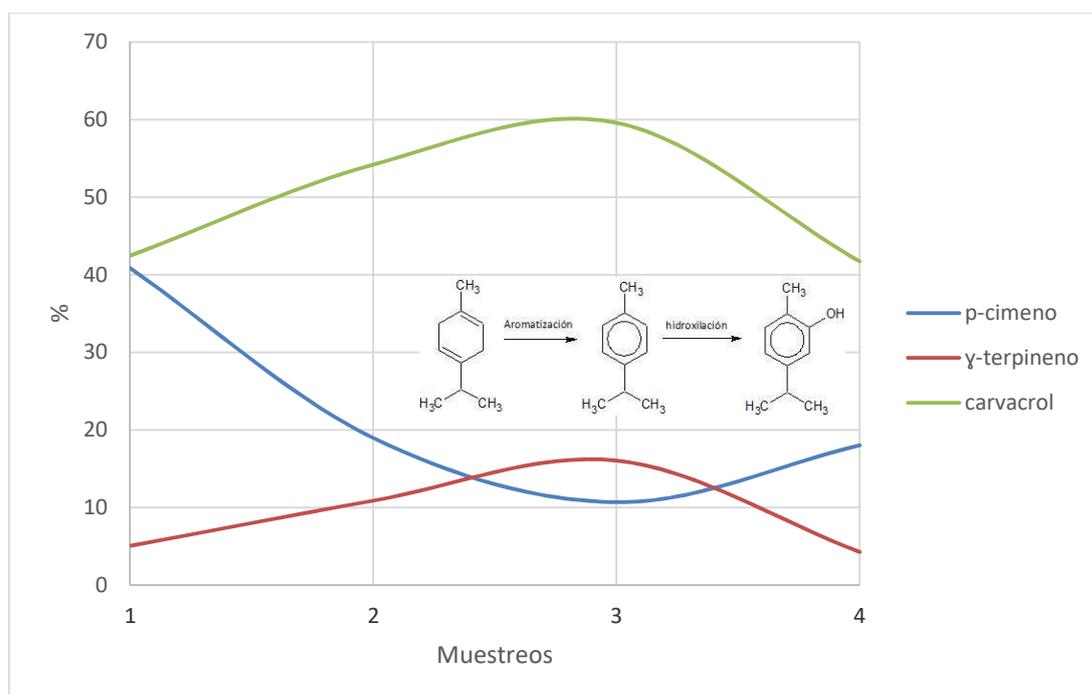


Figura 33. Evolución del carvacrol, *p*-cimeno y γ -terpineno durante los muestreos.

A la hora de definir los quimiotipos, los precursores biosintéticos de los compuestos fenólicos son comúnmente tomados en cuenta (Boira & Blanquer, 1998). Las correlaciones entre las cantidades de compuestos fenólicos y sus precursores biosintéticos tienden a confirmar la ruta tradicional en la que el *p*-cimeno es el precursor inmediato del carvacrol (Thompson *et al.*, 2003), aunque recientemente, se ha propuesto que la formación de carvacrol es catalizada directamente a partir de γ -terpineno mediante oxidación en dos etapas, mientras que el *p*-cimeno es un producto secundario resultante de su liberación prematura por la actividad enzimática (Crocoll *et al.*, 2010).

En los otros compuestos mayoritarios como el borneol (Figura 29) observamos que se produce un descenso progresivo durante los cuatro muestreos, en cambio, si comparamos el cariofileno (Figura 30) con el óxido de cariofileno (Figura 31) muestran un comportamiento opuesto, es decir, conforme aumenta la cantidad de cariofileno disminuye el óxido de cariofileno menos en el último muestreo en que ocurre lo contrario. Por el contrario, tal como se observa en la figura 32, que representa la evolución de la suma de ambos compuestos podemos apreciar que sigue el mismo patrón que el óxido de cariofileno.

5. Conclusiones

5. CONCLUSIONES

Durante este estudio estacional del aceite esencial de *Thymus Piperella* L. se ha observado un aumento progresivo del rendimiento del aceite esencial extraído obteniendo su valor más elevado en el tercer muestreo en vez del cuarto que es cuando la planta se encontraría con su floración avanzada. Este hecho lo podemos relacionar con la disminución del carvacrol, que puede asociarse a las altas precipitaciones que hubo a principios agosto del 2018, invirtiéndose la tendencia que cabría esperar, según la cual el aumento de compuestos fenólicos correspondería al progresivo estrés hídrico experimentado por la planta.

La aplicación de la cromatografía en capa fina en este estudio nos ha ayudado a determinar si se trataba de una población homogénea, así como a detectar posibles errores a la hora de la recolección. Los resultados obtenidos han mostrado un grado aceptable de homogeneidad, aunque la presencia de algunas muestras de composición diferente aconsejaría en posteriores investigaciones realizar el *screening* preliminar propuesto. Esta práctica no es habitual en el estudio de poblaciones silvestres, sin embargo, tal como ya se indicó en 4.2., el resultado de éste y otros indican claramente su conveniencia.

La asignación de un quimiotipo a una población exige indicar el estado fenológico de la planta, por ello es importante conocer las variaciones estacionales que puede haber ya que puede afectar a la composición química del aceite esencial. En nuestro caso, al observar los datos obtenidos, en el primer y último muestreo la composición observada podría considerarse como quimiotipo C, dado que hay un % alto de *p*-cimeno y carvacrol pero en el segundo y tercer muestreo como quimiotipo A ya que hay un aumento de γ -terpineno junto con *p*-cimeno y carvacrol, basándonos en la clasificación de Ruiz-Navajas, 2012.

Los resultados del cuarto muestreo pueden considerarse, en principio, contradictorios con la evolución observada en el tercero y con la tendencia general descrita en la bibliografía acerca de la variación de los compuestos fenólicos ya que la sequía estival típicamente mediterránea favorece su síntesis. Posiblemente la precipitación intensa observada 20 días antes puede haber sido decisiva en la evolución del carvacrol, por lo que se prevé continuar este estudio en años sucesivos para evaluar con mayor fiabilidad la influencia de los factores climatológicos.

6. Bibliografía

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adzet Porredón, T., & Passet, J. (1976). Estudio quimiotaxonomico del *Thymus piperella* L. *Collectanea Botanica*, 1976, vol. X, num. 1, p. 5-11.
- Almeida, J. R. G. D. S., Souza, G. R., Silva, J. C., Saraiva, S. R. G. D. L., Júnior, R. G. D. O., Quintans, J. D. S. S., ... & Junior, L. J. Q. (2013). Borneol, a bicyclic monoterpene alcohol, reduces nociceptive behavior and inflammatory response in mice. *The Scientific World Journal*, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/808460>
- Andrés, A. (s.f.). Bioclimatología: Índices climáticos y bioclimáticos. Recuperado el 13 de Septiembre de 2018, de <http://biogeografia.net.au.net/bioclima2.html>
- Arunasree, K. M. (2010). Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine*, 17(8-9), 581-588. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.12.008>
- Bagamboula, C. F., Uyttendaele, M., & Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food microbiology*, 21(1), 33-42. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00046-7)
- BANCOS DE DATOS BIODIVERSIDAD COMUNIDAD VALENCIANA. (2013). Recuperado el 15 de 01 de 2018, de *Thymus Piperella*: <http://bdb.cma.gva.es/ficha.asp?id=13336>
- Barrow, G. (1972). *Química Física*, vols. 1 e 2. Ed. Reverté S.A., Barcelona, 491 pp.
- Boira, H., & Blanquer, A. (1998). Environmental factors affecting chemical variability of essential oils in *Thymus piperella* L. *Biochemical systematics and Ecology*, 26(8), 811-822. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(98\)00047-7](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(98)00047-7)
- Bruneton, J. (1995). *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*. Acribia, Zaragoza.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Cachet, T., Brevard, H., Chaintreau, A., Demyttenaere, J., French, L., Gassenmeier, K., ... & Loesing, G. (2016). IOFI recommended practice for the use of predicted relative-response factors for the rapid quantification of volatile flavouring compounds by GC-FID. *Flavour and fragrance journal*, 31(3), 191-194. <https://doi.org/10.1002/ffj.3311>
- Chaibi, A., Ababouch, L. H., Belasri, K., Boucetta, S., & Busta, F. F. (1997). Inhibition of germination and vegetative growth of *Bacillus cereus* and *Clostridium botulinum* 62A spores by essential oils. *Food Microbiology*, 14(2), 161-174. <https://doi.org/10.1006/fmic.1996.0075>
- Chang, C. P., Leung, T. K., Lin, S. M., & Hsu, C. C. (2006). Release properties on gelatin-gum arabic microcapsules containing camphor oil with added polystyrene. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 50(2), 136-140. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.04.008>

- Crocoll, C., Asbach, J., Novak, J., Gershenzon, J., & Degenhardt, J. (2010). Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant molecular biology*, 73(6), 587-603. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9636-1>
- Dabrio, M.V., Albaigués, J., Clemente, A.E., Gascó, L., García, J.A., Gelpí, E. & Martínez R. (1973). *Cromatografía de gases* (vol. II) Ed. ALHAMBRA. 223 pp.
- Doroteo, V. H. (1998). Análisis cuantitativo de mentol en aceite esencial de menta. *Revista de Química*, 12(2), 77-78.
- Falcone, P., Speranza, B., Del Nobile, M. A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2005). A study on the antimicrobial activity of thymol intended as a natural preservative. *Journal of food protection*, 68(8), 1664-1670. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.8.1664>
- Fernandes, E. S., Passos, G. F., Medeiros, R., da Cunha, F. M., Ferreira, J., Campos, M. M., ... & Calixto, J. B. (2007). Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European journal of pharmacology*, 569(3), 228-236. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.04.059>
- Fuster Lorente, S., & Camarena Sellens, V. (2007). *Plantas Silvestres del nostre entorn: 100 fitxes de plantes de la safor y voltants* (Vol. 2). Beniarjó: Projectes gràfics.
- García-García, R. M., & Palou-García, E. (2008). Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 2(2), 41-51.
- García-Segura, J.M., Gavilanes, J.G., Martínez del pozo, A., Montero, F., Oñaderra, M. & Vicanco F. (1996). *Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica*. Ed. SÍNTESIS, SA. Madrid. 398 pp.
- Ghelardini, C., Galeotti, N., Mannelli, L. D. C., Mazzanti, G., & Bartolini, A. (2001). Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. *Il Farmaco*, 56(5-7), 387-389. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(01\)01092-8](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(01)01092-8)
- Gómez, A., & López, M. (2009). Potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*). *Temas selectos de Ingeniería en Alimentos*, 3(1), 33-45.
- Granger, R. E., Campbell, E. L., & Johnston, G. A. (2005). (+)-And (-)-borneol: efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABAA receptors. *Biochemical pharmacology*, 69(7), 1101-1111. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.01.002>
- Gutiérrez Bouzán, M., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín intexter*, 122, 35-41.
- Javidnia, K., Miri, R., Kamalinejad, M., & Nasiri, A. (2002). Composition of the essential oil of *Salvia mirzayanii* Rech. f. & *Esfand* from Iran. *Flavour and fragrance journal*, 17(6), 465-467. <https://doi.org/10.1002/ffj.1128>

- Llorens-Molina, J. A., & Vacas, S. (2017). Effect of drought stress on essential oil composition of *Thymus vulgaris* L. (Chemotype 1, 8-cineole) from wild populations of Eastern Iberian Peninsula. *Journal of Essential Oil Research*, 29(2), 145-155. <https://doi.org/10.1080/10412905.2016.1211561>
- Llorens-Molina, J. A., Castell-Zeising, V., Vacas, S., & Verdeguer, M. (2017). TLC-GC/MS Method for Identifying and Selecting Valuable Essential Oil Chemotypes from Wild Populations of *Mentha longifolia* L. *Natural Volatiles & Essential Oils*, 4(4), 49-61.
- Llorens-Molina, J. A., Vacas, S., Castell, V., & Németh-Zámboriné, É. (2017). Variability of essential oil composition of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) affected by plant organ. *Journal of Essential Oil Research*, 29(1), 11-21. <https://doi.org/10.1080/10412905.2016.1202152>
- Martí, D., Pérez-Gracia, M. T., Blanquer, A., Villagrasa, V., Sanahuja, M. A., & Moreno, L. (2007). *Thymus piperella* (L.) essential oil: an alternative in the treatment of diarrhoea. *Flavour and fragrance journal*, 22(3), 201-205. <https://doi.org/10.1002/ffj.1783>
- Pellicer, J. (2000). *Costumari Botainc: recerques Etnobotaniques a les comarques Centrals Valencianes*, vol 1. Valencia: Edicions del Bullent.
- Quiroga, P. (2013). Cromatografía en capa fina (TLC). *Análisis farmacéutico*, 56
- Rivas Martínez, S. (1987). *Memoria del Mapa de Vegetación de España*. Madrid: ICONA.
- Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Barber, X., Sendra, E., Perez-Alvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2015). Effect of chitosan edible films added with *Thymus moroderi* and *Thymus piperella* essential oil on shelf-life of cooked cured ham. *Journal of food science and technology*, 52(10), 6493-6501. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1733-3>
- Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2012). Chemical characterization and antibacterial activity of *Thymus moroderi* and *Thymus piperella* essential oils, two *Thymus* endemic species from southeast of Spain. *Food Control*, 27(2), 294-299. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.04.005>
- Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2013). In vitro antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. *Food Control*, 30(2), 386-392. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.07.052>
- Singh, T. P., Singh, R. K., & Malik, P. (2014). Analgesic and anti-inflammatory activities of *Annona squamosa* Linn bark. *J. Scientific and Innov. Res*, 3, 60-64.
- Thompson, J. D., Chalchat, J. C., Michet, A., Linhart, Y. B., & Ehlers, B. (2003). Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemical Ecology*, 29(4), 859-880. <https://doi.org/10.1023/A:1022927615442>

Tissot, E., Rochat, S., Debonneville, C., & Chaintreau, A. (2012). Rapid GC-FID quantification technique without authentic samples using predicted response factors. *Flavour and fragrance journal*, 27(4), 290-296. DOI: 10.1002/ffj.3098

Torres Juan, M. (2017) Composición química y actividad antifúngica de los aceites esenciales de Artemisa herba-alba Asso, Artemisa obsinthium L. y Mentha longifolia L. Trabajo fin de grado. Univ. Politècnica de València, 40 pp.

Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Springer Science & Business Media.

Yang, D., Michel, L., Chaumont, J. P., & Millet-Clerc, J. (2000). Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an in vitro experimental model of onychomycosis. *Mycopathologia*, 148(2), 79-82. <https://doi.org/10.1023/A:1007178924408>