



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial
del *Thymus serpyllum* y su aplicación en diferentes
cultivos.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: Peiró Collado, Carles

Tutor/a: Llorens Molina, Juan Antonio

Cotutor/a: Santamarina Siurana, M^a Pilar

Director/a Experimental: ROSELLO CASELLES, JOSEFA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL
MEDIO NATURAL



COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE LA PLANTA AROMÁTICA *Thymus serpyllum L.*

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Trabajo de Final de Grado

Autor: Carles Peiró Collado

Tutores: D. Juan Antonio Llorens Molina

Cotutora: Dña. M. Pilar Santamarina Siurana

Cotutora experimental: Dña. Josefa Roselló Caselles

Curso académico 2022 – 2023

Valencia, Julio 2023



Composición química y actividad antifúngica del aceite esencial de la planta aromática *Thymus serpyllum*

Autor: Carles Peiró Collado

Trabajo Final de Grado

Tutor: Juan Antonio Llorenç Molina

Realizado en: Valencia

Cotutora: M. Pilar Santamaría Siurana

Fecha: Julio, 2023

RESUMEN

La contaminación fúngica es un problema grave en la gran mayoría de cultivos. Esta provoca pérdidas de productividad y calidad del producto, dando lugar a importantes pérdidas económicas.

Se sabe que los aceites esenciales de diferentes plantas aromáticas poseen propiedades antifúngicas y antimicrobianas e incluso medicinales. Por este motivo son muy interesantes como alternativa a productos de síntesis química.

En este estudio se analiza la composición química del aceite esencial comercial de *Thymus serpyllum* y su actividad antifúngica frente a diferentes hongos fitopatógenos, causantes de enfermedades en las plantas y del deterioro de los productos agrícolas en cultivo y de los alimentos, como son *Alternaria alternata*, *Bipolaris spicifera*, *Curvularia hawaiiensis*, *Fusarium oxysporum sp lycopersici* y *Penicillium italicum*.

El análisis de la composición química se ha realizado acoplada a un detector por espectrometría de masas (GC-MS), para la identificación de los componentes y por detección mediante ionización de llama (FID) para su cuantificación aproximada. La actividad antifúngica in vitro de los aceites esenciales se evaluó siguiendo la metodología de Singh y col. (2008) modificada.

Por consiguiente, con el aceite esencial del *Thymus serpyllum* se han llevado a cabo varias pruebas en el laboratorio para determinar el grado de inhibición micelial (MGI) del aceite esencial en los diferentes hongos nombrados anteriormente.

Los primeros resultados del estudio realizado muestran la presencia de compuestos de conocida actividad antifúngica, concretamente compuestos fenólicos como timol y carvacrol, dos compuestos con propiedades fungicidas ampliamente conocidas.

En este estudio se pone de manifiesto el gran potencial del aceite esencial de *Thymus serpyllum* como una clara alternativa para el tratamiento de los hongos fitopatógenos en cultivos y de esta manera poder alargar la vida útil de los productos agrícolas.

Palabras clave: *Thymus serpyllum*, aceite esencial, composición química, carvacrol, actividad antifúngica.



Composición química y actividad antifúngica del aceite esencial de la planta aromática *Thymus serpyllum*

Author: Carles Peiró Collado

Final work degree

Tutor: Juan Antonio Llorenç Molina

Made in: Valencia

Date:

Cotutora: M. Pilar Santamaría Siurana

Julio, 2023

ABSTRACT

Fungal contamination is a serious problem in the vast majority of crops. It causes productivity and product quality losses, resulting in significant economic losses.

It is known that essential oils from different aromatic plants possess antifungal, antimicrobial, and even medicinal properties. For this reason, they are highly interesting as an alternative to chemically synthesized products.

This study analyzes the chemical composition of the commercial essential oil of *Thymus serpyllum* and its antifungal activity against different phytopathogenic fungi, which cause diseases in plants and deterioration of agricultural and food products. The fungi studied include *Alternaria alternata*, *Bipolaris spicifera*, *Curvularia hawaiiensis*, *Fusarium oxysporum* sp *lycopersici* y *Penicillium italicum*.

The analysis of the chemical composition was performed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) for component identification and flame ionization detection (FID) for approximate quantification. The in vitro antifungal activity of the essential oils was evaluated following the modified methodology of Singh et al. (2008).

Consequently, several laboratory tests were conducted with the essential oil of *Thymus serpyllum* to determine the miceliar grade of inhibition (MIG) against the aforementioned fungi.

The initial results of the study show the presence of compounds with known antifungal activity, specifically phenolic compounds such as thymol and carvacrol, two widely recognized fungicidal compounds.

This study highlights the great potential of *Thymus serpyllum* essential oil as a clear alternative for the treatment of phytopathogenic fungi in crops, thus extending the shelf life of agricultural products.

Palabras clave: *Thymus serpyllum*, essential oil, contamination, chemical composition, carvacrol, antifungal activity.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a Juan Antonio, Pilar y Pepa por confiar en mí. Gracias Pilar y Juan Antonio, por estar siempre pendientes de mi trabajo y corregirme en todo lo que pudieran, por su paciencia conmigo y porque sin ellos no pudiera haber hecho este trabajo como lo he hecho. Me acuerdo cuando contacté por primera vez con Juan Antonio, fue el único profesor al que hablé y siempre fue mi primera opción por como me marcó su actitud, docencia y entusiasmo en clase. Después conocí a Pilar y Pepa, unas maravillosas personas que me han enseñado mucho y que transmiten profundamente su pasión por la botánica. Ojalá algún día marcar tanto a la gente como vosotros marcáis a vuestros alumnos. De corazón, muchísimas gracias.

Por último, agradecer a mis amigos y sobretodo a mi familia, mi madre, mi padre y mi hermano, quienes me han apoyado en absolutamente todo y han sido un pilar fundamental. Y que sin ellos no sería el que soy ahora.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Descripción y ecología de la especie <i>Thymus serpyllum</i>	2
1.2. Aceites esenciales.....	3
1.2.1. Propiedades antibacterianas y antifúngicas de los aceites esenciales.....	4
1.2.2. Aceite esencial de <i>Thymus serpyllum</i>	4
1.3. Los hongos.....	5
1.3.1. Características generales	5
1.3.2. Género <i>Alternaria</i>	5
1.3.3. Género <i>Bipolaris</i>	6
1.3.4. Género <i>Curvularia</i>	8
1.3.5. Género <i>Fusarium</i>	9
1.3.6. Género <i>Penicillium</i>	11
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL Y MÉTODOS	16
3.1. Material vegetal	16
3.2. Composición del aceite esencial	16
3.2.1. Materiales y equipos.....	16
3.2.2. Fundamento.....	16
3.2.3. Metodología: parámetros de funcionamiento en el análisis cromatográfico.....	17
3.3. Determinación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales	19
3.3.1. Materiales.....	19
3.3.2. Hongos.....	19
3.3.3. Cálculo de la inhibición del crecimiento micelar (MGI).....	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
4.1. Caracterización química de los aceites esenciales	21
4.2. Determinación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales sobre el crecimiento micelar	23
4.3. Cálculo de la inhibición del crecimiento micelar (MGI).....	24
4.4. Discusión	27
5. CONCLUSIONES	30
6. BIBLIOGRAFÍA	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Thymus serpyllum</i> . Flora de Galicia.....	3
FIGURA 2. Conidios de <i>Alternaria alternata</i>	6
FIGURA 3. <i>Alternaria alternata</i> en medio PDA.....	6
FIGURA 4. <i>Alternaria alternata</i> en naranjo	6
FIGURA 5. Conidios de <i>Bipolaris spicifera</i>	8
FIGURA 6. <i>Bipolaris spicifera</i> en medio PDA.....	8
FIGURA 7. <i>Bipolaris spicifera</i> en planta	8
FIGURA 8. Conidios de <i>Curvularia hawaiiensis</i>	9
FIGURA 9. <i>Curvularia hawaiiensis</i> en medio PDA.....	9
FIGURA 10. <i>Curvularia hawaiiensis</i> en planta	9
FIGURA 11. Conidios de <i>Fusarium oxysporum lycopersici</i>	11
FIGURA 12. <i>Fusarium oxysporum lycopersici</i> en medio PDA.....	11
FIGURA 13. <i>Fusarium oxysporum lycopersici</i> en arándanos.....	11
FIGURA 14. Patrones de ramificación observados en <i>Penicillium</i> . Adaptada de Visagie y col., 2014.....	11
FIGURA 15. Conidios de <i>Penicillium italicum</i>	12
FIGURA 16. <i>Penicillium italicum</i> en medio PDA	12
FIGURA 17. <i>Penicillium italicum</i> en naranja	12
FIGURA 18. Diagrama del proceso analítico cromatográfico	18
FIGURA 19. Diagrama de un cromatógrafo de gases.....	18
FIGURA 20. Cromatograma del aceite esencial del <i>Thymus serpyllum</i> con los compuestos mayoritarios	21
FIGURA 21. Representación gráfica del MGI (%) de <i>Thymus serpyllum</i> a las dosis de 300 µg/mL y 150 µg/mL para las distintas especies ensayadas.....	24
Figura 22. Crecimiento de <i>Alternaria alternata</i> en PDA (control) y en PDA con aceite esencial de <i>Thymus serpyllum</i> a las dosis de 300 µg/mL y 150 µg/mL, a los 7 días de incubación.	25
FIGURA 23. Crecimiento de <i>Bipolaris spicifera</i> en PDA (control) y en PDA con aceite esencial de <i>Thymus serpyllum</i> a las dosis de 300 µg/mL y 150 µg/mL, a los 7 días de incubación.	25
FIGURA 24. Crecimiento de <i>Curvularia hawaiiensis</i> en PDA (control) y en PDA con aceite esencial de <i>Thymus serpyllum</i> a las dosis de 300 µg/mL y 150 µg/mL, a los 7 días de incubación.	26
FIGURA 25. Crecimiento de <i>Fusarium oxysporum lycopersici</i> en PDA (control) y en PDA con aceite esencial de <i>Thymus serpyllum</i> a las dosis de 300 µg/mL y 150 µg/mL, a los 7 días de incubación.	26
FIGURA 26. Crecimiento de <i>Penicillium italicum</i> en PDA (control) y en PDA con aceite esencial de <i>Thymus serpyllum</i> a las dosis de 300 µg/mL y 150 µg/mL, a los 7 días de incubación.	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Composición química del aceite de <i>Thymus serpyllum</i> . Compuestos en orden de elución en columna zb-5.	22
TABLA 2. Agrupación de los diferentes compuestos que componen el aceite esencial del <i>Thymus serpyllum</i>	23
TABLA 3. Diámetro medio (mm) del crecimiento de los distintos hongos ensayados en PDA-control y PDA- <i>Thymus serpyllum</i> a distintas dosis a los 7 días de incubación.	23
TABLA 4. Cálculo del MGI (porcentaje de inhibición) para cada especie en el medio de cultivo PDA con <i>Thymus serpyllum</i>	24

1. INTRODUCCIÓN

PRÓLOGO

Las enfermedades de las plantas, causadas por los hongos fitopatógenos, son los factores más importantes que limitan la producción de los cultivos a nivel mundial, especialmente en los países en desarrollo (Agrios, 1996). A nivel mundial, los hongos fitopatógenos son la principal causa de pérdidas en la agricultura, las cuales ascienden a miles de millones de dólares al año. Se sabe que más de 8000 especies de hongos pueden causar enfermedades en las plantas. Todas las plantas superiores pueden ser infectadas y dañadas por más de una especie de hongo fitopatógeno atacando así mismo a más de una especie de planta (Guzmán, 2001).

Además, de las pérdidas en el rendimiento de los cultivos y el deterioro de los alimentos, muchos de estos hongos representan un serio riesgo para los consumidores debido a los metabolitos secundarios que producen (Fletcher y col., 2006). Algunos de estos pueden ser las micotoxinas, que aun en concentraciones muy bajas se distribuyen fácilmente y pueden llegar a ser perjudiciales, lo que pone en entredicho su inocuidad. Dado que, una gran parte de las cosechas de alimentos a nivel mundial están contaminadas con algún tipo de micotoxinas, este problema representa un fuerte riesgo para la salud de la población (FAO, 2001).

El uso indiscriminado y excesivo de distintos agentes fungicidas, representa un riesgo para la salud humana y animal debido a la contaminación de los alimentos y a la acumulación de residuos tóxicos en el medio ambiente. Como consecuencia de la globalización de los mercados y el cambio climático, este problema está creciendo a un ritmo acelerado (Pergomet y col., 2018), por lo que existe un consenso generalizado en ámbitos académicos y productivos que intenta buscar otras soluciones ambientalmente amigables. Los productos naturales de las plantas ofrecen un conjunto de agentes antifúngicos estructuralmente diferentes que podrían representar una alternativa a los fungicidas sintéticos para el control de hongos fitopatógenos (Singh y col., 2003).

Por todos estos motivos entran en juego los aceites esenciales, los cuales han despertado un gran interés debido a su efectiva actividad antimicrobiana y antifúngica demostrando que podrían utilizarse de forma segura como alternativas deseadas a los fungicidas químicos (Sokolić-Mihalak y col., 2012).

En este trabajo se va a valorar la capacidad antifúngica del aceite esencial de *Thymus serpyllum* frente a hongos fitopatógenos que causan alteraciones en postcosecha relacionándolo así con su composición química.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción y ecología de la especie *Thymus serpyllum*.

Thymus serpyllum L. se clasifica en el Reino Plantae, División Magnoliophyta, Clase Magnoliopsida, Orden Lamiales, Familia Lamiaceae, Género *Thymus*, y especie *Thymus serpyllum* L.

Thymus serpyllum L. es un arbusto perenne, nativo de regiones del norte y centro de Europa. Se conoce como tomillo de Breckland, tomillo silvestre o tomillo rastrero; sin embargo, su nombre específico "*serpyllum*" proviene de la palabra griega que significa "arrastrarse", debido al hábito rastrero del tomillo silvestre. Tiene un tallo largo, leñoso en la base, pero con una roseta de hojas estériles en la parte superior (Diklić, 1974).

Las hojas son ovaladas (redondeadas en la parte superior, estrechadas en la base), de 4-6 mm de largo, 2-4 mm de ancho, y sin vellosidades en la cara superior e inferior, mientras que en la base a lo largo del borde tienen tricomas largos, una vena central prominente y venas laterales menos prominentes. Las inflorescencias tienen entre 4 y 7 cm de altura y se forman en una serie a lo largo de un tallo bajo, con una capa uniforme de tricomas en todos los lados. Las flores se encuentran en la parte superior de los tallos y forman un verticilastro esférico (o raramente alargado) (Diklić, 1974). Florece desde mayo hasta septiembre. El tomillo silvestre crece mejor en terrenos secos y pedregosos, brezales arenosos abiertos y praderas.

Las propiedades medicinales del tomillo silvestre se han utilizado ampliamente tanto en la medicina oficial como en la tradicional durante muchos años y siglos, respectivamente. Las hierbas frescas y secas, especialmente la parte superior de la porción aérea del tomillo silvestre recolectada cuando la planta está en flor, poseen ciertas propiedades curativas debido a la presencia de cantidades significativas de aceites esenciales. En años recientes, ha habido un aumento en el interés por investigaciones etnobotánicas, fitoquímicas y farmacológicas sobre las propiedades medicinales de la especie *T. serpyllum*, que sirve como una fuente de alta calidad para muchas formulaciones diferentes en las industrias farmacéutica y química.

La hierba se utiliza en la preparación de remedios herbales naturales, como jarabes, tinturas, infusiones, decocciones, té y aceite. El aumento en la presencia de cepas de microorganismos patógenos resistentes a múltiples fármacos ha llevado a extensos estudios fitoquímicos y farmacológicos de *T. serpyllum* como una fuente importante de sustancias medicinales con propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antitumorales y citotóxicas, y su aplicación medicinal efectiva, así como su uso en las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética. Además, la creciente presión de los consumidores por la demanda de productos naturales como suplementos y su aplicación clínica en lugar de productos químicos sintéticos, que generalmente se perciben como más tóxicos por el público, también ha estimulado la investigación sobre muchas plantas medicinales y aromáticas. En este sentido el *T. serpyllum* ocupa un lugar muy importante, como producto natural, sobretodo en actividades agrícolas (Jarić y col., 2015).



Figura 1: *Thymus serpyllum*. Flora de Galicia. España. Lugo, Os Ancares (Cervantes) 20-08-2014.
Autor de la foto: Suso S.M.

1.2. Aceites esenciales.

Los aceites esenciales (AE) se definen como el producto de la destilación por arrastre de vapor de material procedente de distintos órganos: hojas, flores y raíces de numerosas especies vegetales. Los componentes de los aceites esenciales constituyen una fracción relativamente volátil de los metabolitos secundarios de las plantas (Molina y col., 2012).

Dado que los aceites esenciales se encuentran en muy pequeña concentración en la planta, generalmente son difíciles de obtener, por lo que es necesaria una gran cantidad de material vegetal (que hay que cosechar o recolectar) y si a esto añadimos su carácter volátil y susceptible de fácil alteración, es comprensible el porqué de su elevado precio (Sánchez, 2006).

Los aceites esenciales no son compuestos puros sino mezclas de multitud de sustancias (es fácil que un aceite esencial sea una mezcla de más de 100 sustancias químicas distintas) que se encuentran en distintas proporciones y que en conjunto proporcionan al aceite esencial sus características propias. Conviene indicar que los productos que detectamos con nuestro sentido del olfato forman parte de la esencia de la planta que se trate, precisamente por su carácter volátil o semivolátil (Sánchez, 2006).

Desde el punto de vista químico y a pesar de su composición compleja, los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de sustancias que son los componentes mayoritarios. De este modo están los aceites esenciales ricos en monoterpenos, en los que predominan los compuestos ricos en monoterpenos y sus derivados oxigenados: alcoholes, fenoles, ésteres, aldehídos, cetonas o éteres, denominados también “monoterpenoides” (p.ej. hierbabuena, albahaca, salvia, etc.). También podemos distinguir los aceites ricos en sesquiterpenos y sus derivados “sesquiterpenoides”, que son compuestos tales como cariofileno, germacreno D, etc., que mantienen la estructura de los hidrocarburos sesquiterpénicos pudiendo presentar distintas funciones orgánicas (p.ej. copaiba, pino, junípero, etc.). Por último, cabe citar también los ricos en fenilpropanoides, compuestos tales como el cinamaldehído, derivados de la estructura básica del fenilpropano (p.ej. clavo, canela, anís, etc.) (Martínez, 1996). Sin embargo, la composición de los aceites en algunos tipos de plantas puede variar según la época y la situación geográfica, incluso según las partes de una misma planta. En general, los aceites de plantas cosechadas durante o inmediatamente después de la floración, poseen una mayor actividad antimicrobiana (Santamarina y col., 2015).

1.2.1. Propiedades antibacterianas y antifúngicas de los aceites esenciales.

Los aceites esenciales de plantas aromáticas poseen un fuerte potencial antimicrobiano y antioxidante, por lo que su uso como conservantes naturales satisface la demanda de los consumidores de alimentos seguros, sanos y nutritivos; debido a su gran potencial, pueden actuar contra los microorganismos patógenos que causan enfermedades en los consumidores y así mismo la vida útil de los alimentos se alargará y la calidad se mantendrá. Los aceites esenciales tienen una amplia variedad de compuestos químicos que actúan estableciendo relaciones de sinergismo para realizar las actividades antimicrobianas, antioxidantes, antifúngicas, antivirales, insecticidas, entre otras que los caracterizan.

Desde la antigüedad, los aceites esenciales se han utilizado por su potencial plaguicida contra una amplia variedad de plagas agrícolas como parte de las prácticas tradicionales. Sin embargo, su aplicación como agente antimicrobiano y antifúngico es una tendencia creciente y reciente que refleja el interés hacia el "consumismo verde" (Prakash y col., 2016). Tal como ya se indicó anteriormente, los aceites esenciales suelen caracterizarse por su elevada complejidad química pudiendo contener más de 200 constituyentes, muchos de ellos con una contrastada actividad biológica (Adelakun y col., 2016; Miladi y col., 2016). Numerosos estudios revelan que los componentes fenólicos son mayormente responsables de los efectos conservadores de los aceites esenciales en términos de propiedades antibacterianas y antifúngicas (Starliper y col., 2015; Adelakun y col., 2016). Sin embargo, la gran eficacia de estos aceites esenciales no se atribuye a un compuesto específico sino que viene dada por la diversidad de componentes (Miladi y col., 2016). Por lo que se ha sugerido que dicha actividad se trata más bien de un efecto sinérgico de todos los constituyentes contenidos (Radaelli y col., 2016).

Debido a estas propiedades, los aceites esenciales han revolucionado la agricultura agrícola, y los pesticidas cada vez son menos efectivos por el riesgo de resistencia de los hongos o bacterias a estos fármacos. Es por eso, que es importante buscar nuevos agentes antimicrobianos, principalmente entre los extractos de plantas, donde encontramos el aceite esencial, con el objetivo de descubrir nuevas estructuras químicas que superen esta desventaja (Carrillo y col., 2015).

Como vemos, muchos estudios destacan el alto poder antifúngico y antimicrobiano de algunos aceites esenciales. Por este motivo junto con los beneficios y respetuosos que son con el medio ambiente, es cada vez más deseable su aplicación, por diferentes empresas, como medida preventiva o curativa frente a hongos y bacterias causantes del deterioro de los alimentos.

1.2.2. Aceite esencial de *Thymus serpyllum*.

El tomillo silvestre (*Thymus serpyllum*) es una planta aromática que pertenece a la familia Lamiaceae. Esta hierba se utiliza ampliamente debido a sus actividades biológicas, como su actividad antiséptica, antitusiva, analgésica, antihelmíntica, diaforética, expectorante, espasmolítica, carminativa y diurética (Boros y col, 2010). Tradicionalmente, se ha utilizado con mayor frecuencia en problemas relacionados con el tracto digestivo, respiratorio y urogenital (Jaric y col, 2015).

Se han realizado numerosos estudios sobre la composición química y los rendimientos de los aceites esenciales de plantas pertenecientes al género *Thymus*, incluyendo aquellas de *T. serpyllum*. Se considera que la composición química y el rendimiento del aceite esencial de *T. serpyllum* se ven afectados por la región geográfica, la etapa de desarrollo de la planta, la temporada de cosecha, el hábitat y las condiciones climáticas (Galovičová y col., 2021).

1.3. Los hongos.

1.3.1. Características generales.

Los hongos son organismos eucariotas y cada uno tiene al menos un núcleo y una membrana nuclear, un retículo endoplásmico, mitocondrias y un aparato secretor. Muchos son aerobios obligados o facultativos. Son quimiótrofos secretores de enzimas que degradan una amplia variedad de sustratos orgánicos en nutrientes solubles que luego son absorbidos pasivamente o integrados a la célula por transporte activo (Agrios, 2005). Además, son uni o pluricelulares, de paredes rígidas (por la presencia de quitina), son heterótrofos (no poseen clorofila), se reproducen sexual y asexualmente, o solo asexualmente.

De igual manera “se han descrito alrededor de 70.000 especies de hongos, pero se considera que puede haber 1.5 billones de ellas. De toda esta gran biodiversidad, aproximadamente el 10% constituye el grupo de hongos estudiados dentro de la Micología Médica” (Uribarren y col., 2016, p. 1) y se considera que “más de 8.000 especies de hongos producen enfermedades en las plantas. Todas las plantas son atacadas por algún tipo de hongo y cada uno de los hongos parásitos ataca a uno o más tipos de plantas” (Agrios, 2005,). Los hongos varían en su habilidad para ocasionar enfermedad, así como en su hábitad parasítico y son los principales agentes fitopatógenos debido a que son los microorganismos más numerosos, de ahí que la economía mundial sufra anualmente pérdidas considerables por causas asociadas con ellos (Castaño, 2005).

Respecto al efecto nocivo de los hongos, se debe a su capacidad para destruir físicamente los tejidos de la planta, alterar la fisiología vegetal reduciendo el crecimiento de toda la planta o de órganos determinados, o producir toxinas que afectan tanto a plantas como animales. Algunos hongos pueden ser biótrofos, es decir, pueden crecer y multiplicarse manteniéndose durante todo su ciclo vital en la planta huésped, viviendo y obteniendo nutrientes sin causar la muerte. Otros son necrótrofos, los cuales si que pueden causar la muerte de la planta (Vichicela & Elisabeth, 2014).

Madigan y col. (2003) afirman que los hongos producen enfermedades mediante tres mecanismos principales. Inducción de respuestas inmunitarias. Pueden producir reacciones de hipersensibilidad por la exposición a los hongos, lo que puede causar alergia. Producción y acción de micotoxinas. Son exotoxinas, entre las cuales están las aflatoxinas que son muy tóxicas e inducen tumores en algunos animales, especialmente aves (al alimentarse de granos contaminados). E infección denominada micosis; estos pueden variar entre enfermedades superficiales inocuas y graves, que ponen la vida en peligro.

Por otro lado, muchas especies de hongos son beneficiosas para el género humano. Están en la naturaleza y son esenciales para degradar y reciclar materia orgánica. Algunos realmente mejoran la calidad de vida de los seres humanos al contribuir a la producción de alimentos y bebidas, como quesos, pan y cerveza. Otros hongos han aportado metabolitos bioactivos secundarios y útiles en la medicina como antibióticos e inmunosupresores. Los genetistas y biólogos moleculares han aprovechado los hongos como modelos para investigar diversos fenómenos eucariotas y los hongos ejercen su máximo impacto económico como fitopatógenos (Mader & Windelspecht, 2013).

1.3.2. Género *Alternaria*.

Alternaria alternata

TAXONOMÍA

Reino: Fungi; **Filo:** Ascomycota; **Clase:** Euascomycetes; **Orden:** Pleosporales; **Familia:** Pleosporaceae; **Género:** *Alternaria* (Index Fungorum, 2016).

DESCRIPCIÓN

Es un hongo filamentoso con conidióforos, tabicados, en cuyo extremo se forman conidios muriformes de color pardo con septos transversales y verticales de disposición irregular, característicos del género. Por gemación de la célula apical se genera un nuevo conidio formándose largas cadenas de diez o más de ellos. Presenta colonias de crecimiento rápido (tres o cuatro días) ahieltradas, de color gris al principio con una zona central que se toma más oscura mientras los bordes permanecen grisáceos. El reverso de la colonia es de color negro. Es tolerante al fungicida benomilo (Bial-Aristegui, 2002).

FISIOLOGÍA

El potencial hídrico óptimo para el crecimiento de este hongo es de actividades de agua (a_w) superiores a 0.90, pudiendo crecer con a_w mínimas entre 0.85-0.88 (a_w). También puede crecer en un amplio rango de temperaturas de 2°C a 33°C, y amplio rango de pH entre 2-8 (Samson y col., 2004).

PATOLOGÍAS Y MICOTOXINAS PRODUCIDAS

Respecto a las especies fitopatógenas, *A. alternata* contiene siete patotipos, que producen toxinas que causan síntomas en diferentes plantas (fitotoxinas). Estos patotipos presentan similitud morfológica, pero diferencias patológicas (Thomma, 2003). Entre ellas, la toxina AF (Aflatoxina) causa síntomas en frutilla, la toxina AK (Ácido Kójico) afecta pera, la toxina ACT (ACT-Toxin II) afecta específicamente mandarinas, tangores (híbridos de mandarina y naranja) y tangelos (híbridos de mandarina y pomelo), AM (AM-toxin) afecta manzana (Walton, 1996) y la toxina ACR o ACRL (ACR-toxin) afecta limones (Isshiki y col., 1997; Akimitsu y col., 2003). Se conoce que la toxina ACT y la toxina ACR actúan a diferente nivel celular (Walton, 1996).

ECOLOGÍA

Este hongo, cuando ocurren periodos prolongados de follaje mojado debido a rocíos, lluvia o alta humedad relativa, los conidios del hongo germinan en respuesta a nutrientes solubles presentes en la superficie de los frutos invadiendo hasta un 50% de ellos. También se caracteriza porque su enfermedad es endémica y su severidad varía de acuerdo con las condiciones prevalecientes durante la madurez de los frutos y el retraso de la cosecha. (Sánchez-Domínguez y col. 2007). Esta es una especie cosmopolita que se encuentra como saprofito o fitopatógeno en un amplio rango de hospedantes y en subproductos (Flores y col. 2013).

La enfermedad causada por *Alternaria alternata* se nombra mancha negra del fruto y se caracteriza por depresiones, de ovales a circulares, y lesiones que eventualmente llegan a tornarse de color negro (como resultado de la esporulación masiva del patógeno). La pulpa se oscurece y ablanda a medida que las manchas penetran (López-Mora y col. 2013).



Figura 2: Conidios de *Alternaria alternata*.



Figura 3: *Alternaria alternata* en medio PDA



Figura 4: *Alternaria alternata* en naranjo

1.3.3. Género *Bipolaris*.

Bipolaris spicifera

TAXONOMÍA

Reino: Fungi; Filo: Ascomycota; Clase: Dothyeomycetes; Orden: Pleosporales; Familia: Pleosporaceae; Género: *Bipolaris* (Index Fungorum, 2016).

DESCRIPCIÓN

Bipolaris spicifera se caracteriza por sus colonias oscuras, de crecimiento rápido, generalmente con abundante micelio aéreo, conidióforos geniculados y conidios subcilíndricos, cafés, con tres septos y extremos redondeados, más pálidos que las células intermedias, 20–40 × 9–14 µm. Este hongo se encuentra en el ambiente en material vegetal, especialmente pastos, restos vegetales y suelo, y es un patógeno oportunista relativamente frecuente, asociado a sinusitis alérgica o invasoras, abscesos cerebrales, queratitis e infecciones cutáneas y pulmonares (Hoog y col, 2000).

FISIOLOGÍA

La especie *Bipolaris spicifer* presenta conidios gruesos y templados (de 9-14 µm) y siempre tienen 3 distoseptos. Los conidióforos alcanzan más de 300 µm de largo. Es una especie fitopatógena y se encuentra principalmente en áreas tropicales y subtrópicas pudiéndose aislar del suelo, aire, materia orgánica, plantas y animales, incluidos humanos (Travis y col., 1991). La temperatura óptima para el crecimiento in vitro e infección en campo varía entre 24 y 30°C y se requiere que para la infección exitosa de la planta por el huésped la superficie esté húmeda (Nelson, 1964).

PATOLOGÍAS Y MICOTOXINAS PRODUCIDAS

Este hongo se encuentra en el ambiente en material vegetal, especialmente pastos, restos vegetales y suelo, y es un patógeno oportunista en humanos relativamente frecuente, asociado a sinusitis alérgica o invasoras, abscesos cerebrales, queratitis e infecciones cutáneas y pulmonares. Los cuadros superficiales y sinusitis alérgica comúnmente afectan a personas inmunocompetentes, mientras que los invasores involucran predominantemente a pacientes inmunocomprometidos (Hoog y col., 2000).

ECOLOGÍA

El hongo pasa el invierno en el suelo y los residuos de los cultivos e infecta las plántulas jóvenes durante la primavera. La supervivencia en los residuos de los cultivos y en el suelo infectado son más o menos similares y la población aumenta inicialmente durante 2 meses (tanto en los suelos como en los residuos de los cultivos) y luego disminuye (Malaker y col., 2007). Sin embargo, los conidios pueden sobrevivir en el suelo durante más de 2 años. Se ha observado que los conidios en residuos pueden formar conidios agregados, los cuales son morfológicamente similar a los esclerocios. Una infección secundaria puede ser causada por conidios en el aire (Duveiller y col., 2005) y esto aumenta la gravedad de la enfermedad.



Figura 5: conidios de *Bipolaris spicifera*.



Figura 6: *Bipolaris spicifera* en medio PDA.



Figura 7: *Bipolaris spicifera* en planta.

1.3.4. Género *Curvularia*.

Curvularia hawaiiensis

TAXONOMÍA

Reino: Fungi; **Filo:** Ascomycota; **Clase:** Dothideomycetes; **Orden:** Pleosporales; **Familia:** Pleosporaceae; **Género:** *Curvularia* (Index Fungorum, 2016).

DESCRIPCIÓN

EL género *Curvularia* se caracteriza porque sus colonias cuando se desarrollan en Agar Patata Dextrosa (PDA) presentan un crecimiento moderadamente rápido, alcanzando un diámetro de 3-4 cm en una semana a 25°C, de color negro pardusco, aterciopeladas, llegando a ser, a veces, ligeramente algodonosas. El reverso es de color marrón. Los conidióforos son erectos, septados, pigmentados cada vez más cerca de la punta, a veces geniculados. Los conidios generalmente septados en 4, sobre todo más curvados unilateralmente en la célula central más amplia y más pigmentada, la célula adyacente menos pigmentada e hialina en las células finales, 18-35(37) x 8-14 µm.. La esporulación se induce con longitudes de onda próximas a las del ultravioleta (Samson y col., 2004).

Las especies dentro del género *Curvularia* se caracterizan por presentar conidios largos y elipsoidales, con tres o cuatro septos transversales. Como su nombre indica, los conidios están a menudo curvados debido a una célula central hinchada y asimétrica. La mayoría de las especies son patógenas de plantas (Samson y col., 2004).

FISIOLOGÍA

Su rango de temperatura de crecimiento óptima es 24-30°C.

PATOLOGÍAS Y MICOTOXINAS PRODUCIDAS

Los generos *Bipolaris* y *Curvularia* están estrechamente relacionados por su patogenicidad en plantas, y también como patógenos oportunistas en humanos (Manamgoda y col., 2014). Sin embargo, no existen estudios que registren la producción de micotoxinas para estas especies.

ECOLOGÍA

Las especies de *Curvularia* son causantes de enfermedades de gran importancia económica en cereales como trigo, maíz y cebada. Causan enfermedades tales como manchas foliares, pudriciones de corona y pudriciones de raíz. Es invasor de plantas monocotiledóneas. (Pitt & Hocking, 2009)



Figura 8: conidios de *Curvularia hawaiiensis*.



Figura 9: *Curvularia hawaiiensis* en medio PDA.



Figura 10: *Curvularia hawaiiensis* en planta.

1.3.5. Género *Fusarium*.

Fusarium oxysporum lycopersici

TAXONOMÍA

Reino: Fungi; Filo: Ascomycota; Clase: Sordariomycetes; Orden: Hypocreales; Familia: Nectriaceae; Género: *Fusarium* (Index Fungorum, 2016).

DESCRIPCIÓN

Los hongos del género *Fusarium* son habitantes del suelo con muchas especies que causan serias enfermedades de plantas alrededor del mundo (Agrios, 2005), adaptándose a un amplio rango de condiciones climáticas, hábitats ecológicos, y plantas hospedantes (Backhouse, 2001).

Las especies de *Fusarium* podrían ser consideradas como hemibiotróficas, debido a que son hongos que infectan tejidos vivos como biótrofos, pero después tienen un periodo de latencia de días a semanas en el cual pueden llegar a causar la muerte del tejido del hospedero y comportarse como necrótrofos (Schulz y col. 2006).

Este hongo produce una colonia de rápido crecimiento, con una tasa diaria cercana a un centímetro en medio papa-dextrosa agar (PDA) a 25°C. La morfología de las colonias es muy variable y puede presentar dos tipos: una de tipo micelial caracterizada por la producción de abundante micelio aéreo, algodonoso, con una coloración variable, de blanco a rosado y pocas microconidias y una de tipo pionatal con la formación de poco o ningún micelio aéreo y abundantes microconidias (De Granada y col., 2001).

Es un agente causal de la marchitez vascular en el cultivo. Este patógeno es responsable de numerosas pérdidas económicas y actualmente se encuentra distribuido por todos los continentes (González y col., 2012). Se conoce que hasta el momento *Fusarium oxysporum lycopersici* (FOL) ha sido agrupado en tres razas fisiológicas (Raza 1, 2 y 3) (Arie, 2010). FOL ingresa por el sistema radicular y se desplaza a través del tejido vascular para habitar y obstruir los vasos del xilema, lo que conlleva al estrés hídrico severo en la planta, cuya sintomatología se manifiesta en el amarillamiento de las hojas, iniciando por la parte del tercio inferior de un solo lado en los folíolos, acompañado de una decoloración vascular, marchitez y finalmente la muerte de la planta (Srinivas y col., 2019).

Durante la infección FOL secreta algunas enzimas que degradan la pared celular de la planta, tal es el caso de las poligalacturonasas (PG) a partir de las cuales se han diseñado oligonucleótidos basadas sobre las diferencias nucleotídicas de los genes de la exopoligalacturonas (pgx4) y endopoligalacturonas que poseen los tipos patogénicos (Hirano & Arie, 2006).

FISIOLOGÍA

Este género se caracteriza por poseer macroconidios y microconidios como estructuras de propagación. Los macroconidios pueden producirse tanto en esporodoquios como en el micelio aéreo, mientras que los microconidios solo se producen en el micelio aéreo. Dependiendo de la especie, los macro y microconidios que crecen en el micelio aéreo pueden diferenciarse a partir de células conidiógenas monofialídicas o polifialídicas, mientras que los macroconidios que crecen en esporodoquios solo se producen a partir de monofialídes.

Algunas especies forman clamidosporas como estructuras de resistencia y de propagación. Estas pueden presentarse solitarias, en cadenas, o en grupos y también formarse en los conidios. De todas las estructuras mencionadas, la morfología de los conidios es la principal característica utilizada para la identificación de especies *Fusarium*. Muchas de las especies son cosmopolitas, de amplia distribución. Comúnmente colonizan tejidos aéreos y subterráneos de muchas plantas y pueden ser tanto invasores primarios como secundarios (Nelson y col, 1983).

En cuanto a los factores ambientales que mayor influencia tienen en el desarrollo de la enfermedad y la expresión de los síntomas; la temperatura óptima para el desarrollo está entre 25 y 30°C; la esporulación óptima ocurre entre 20 y 25°C, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad; el pH óptimo es de 7.7 y puede desarrollarse entre 2.2 y 9.0 (De Granada y col., 2001).

PATOLOGÍAS Y MICOTOXINAS PRODUCIDAS

Las toxinas más comunes que son originadas por el género *Fusarium* son los tricotecenos, la zearalenona, la moniliformina y las fumonisinas (Soriano del Castillo, 2007).

ECOLOGÍA

Las especies de *Fusarium* pueden infectar el cultivo en todas las etapas y no es posible detectar su presencia en su estado inicial ya que los síntomas aparecen al mes de la infección (Ochoa y col., 2004). En ausencia de tejidos hospedantes vivos, el patógeno es capaz de sobrevivir como clamidosporas en tejidos previamente colonizados y en suelo donde puede persistir por largos períodos, latente o como endófito en hospedantes alternativos.

La infección se produce como repuesta a exudados de raíces primarias y secundarias. Después de la germinación, las hifas se adhieren y penetran directamente en la epidermis. Las especies patógenas de *Fusarium* poseen la capacidad de penetrar al igual que otros fitopatógenos por heridas autogénicas, antrópicas o por nemátodos. FOL una vez dentro de la planta se mueve hacia el tejido vascular por colonización intercelular de los vasos del xilema y los invade cuando están maduros y se sitúa en ellos. Coloniza los vasos del xilema por crecimiento del micelio o por medio del transporte pasivo de los microconidios producidas en dichos vasos, lo cual ocasiona una colonización rápida y discontinua. Este patógeno a menudo penetra en una sola raíz y se extiende por toda la planta. Puede atacar solamente una parte o todo el sistema radicular provocando la muerte del hospedante (Shew y Lucas, 1991).



Figura 11: conidios de *Fusarium oxysporum lycopersici*.



Figura 12: *Fusarium oxysporum lycopersici* en medio PDA.



Figura 13: *Fusarium oxysporum* en arándanos

1.3.6. Género *Penicillium*.

Penicillium italicum

TAXONOMÍA

Reino: Fungi; Filo: Basidiomycota; Clase: Hyphomycetes; Orden: Agonomycetales; Familia: Agonomycetaeae; Género: *Rhizoctonia* (Index Fungorum, 2016).

DESCRIPCIÓN

Esta especie de *Penicillium* se caracteriza por la presencia de una estructura en forma de pincel conocida como conidióforo. Los conidióforos pueden ser simples o ramificados y están terminados por racimos de fiálides con forma de botella (Agrios, 2005).

El género *Penicillium* debe su nombre a la morfología de esta estructura, que se asemeja a un pincel pequeño (del latín "Penicillus"). Los conidios se agrupan en cadenas y se originan a partir de una célula especializada llamada fiálide. El conidióforo está conectado al micelio a través del estípite. Entre el estípite y las fiálides pueden encontrarse diferentes tipos de células. Estas células se agrupan desde el mismo punto de origen. Además de las fiálides, el conidióforo puede presentar uno, dos o, en casos excepcionales, tres puntos de ramificación a lo largo de su estructura. La célula que sostiene la fiálide se llama métula y la célula que sostiene la métula se denomina rama en aquellas especies que las poseen. Estas nueve ramas se originan desde el estípite, aunque también pueden originarse a partir de otras ramas (Agrios, 2005).

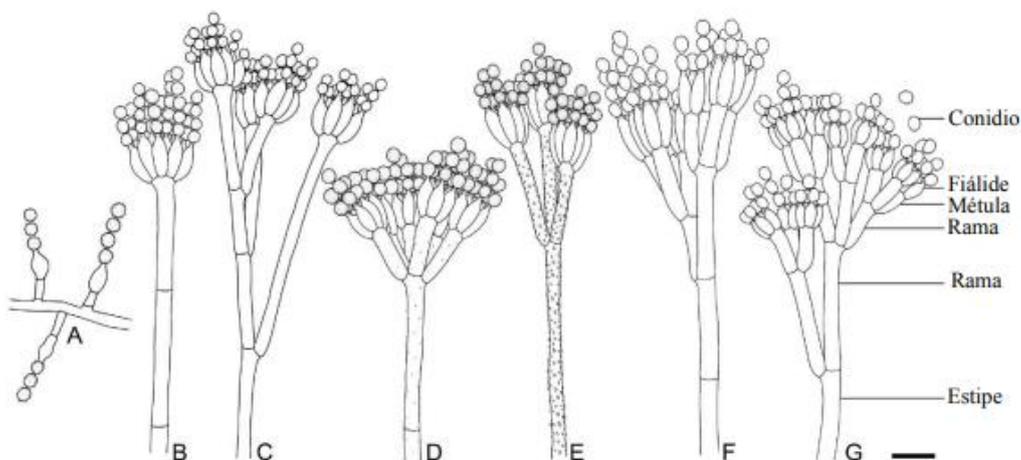


Figura 14: Patrones de ramificación observados en *Penicillium*. A. Conidióforos con fiálides solitarias. B. Monoverticilado. C. Bifurcado. D, E. Biverticilado. F. Triverticilado. G. Cuatrvetricilado. Barra de escala = 10 μ m. Adaptada de Visagie y col., 2014.

FISIOLOGÍA

Las condiciones para su desarrollo son una humedad relativa elevada y una temperatura de 20 a 25°C. Su crecimiento puede parecer más lento por el crecimiento de otras especies de *Penicillium* que se superponen y lo ocultan. Aunque a temperaturas inferiores a 10°C, la situación se invierte (Agrios,2005).

PATOLOGÍAS Y MICOTOXINAS PRODUCIDAS

No existen estudios que hayan registrado la producción de micotoxinas para esta especie.

ECOLOGÍA

Su difusión y multiplicación se lleva a cabo por medio de sus esporas que se encuentran dispersas en el aire. Las esporas no se desarrollan en frutas sanas, penetran en la fruta a través de los golpes y heridas ocasionados durante la recolección, transporte y manejo de la fruta. Los primeros síntomas se manifiestan por la aparición de una mancha en la superficie de la piel que con posterioridad se transforma en blanquecina, desarrollando una esporulación de color verde azulado dependiendo de la especie de *Penicillium*. La fruta pierde su consistencia, desprendiendo un olor característico, perdiendo por completo su aptitud para el consumo humano (Agrios, 2005).

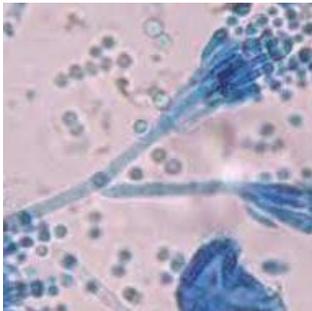


Figura 15: conidios de *Penicillium italicum*.



Figura 16: *Penicillium italicum* en medio PDA.



Figura 17: *Penicillium italicum* en naranja.

2. OBJETIVOS

2.OBJETIVOS

En el Instituto Agroforestal Mediterráneo y en el Departamento de Ecosistemas Agroforestales de la EscuelaTécnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural de la Universitat Politècnica de València son llevados a cabo diferentes estudios donde están relacionados los aceites esenciales. Uno de los campos de investigación se enfoca en evaluar el potencial de los aceites esenciales como agentes de control contra diversos hongos patógenos que afectan los cultivos y/o almacenes.

En el presente trabajo se estudia:

- La composición química del aceite esencial de *Thymus serpyllum*.
- La capacidad antifúngica “*in vitro*” del aceite esencial de *Thymus serpyllum* frente a *Alternaria alternata*, *Bipolaris spicifera*, *Curvularia hawaiiensis*, *Fusarium oxysporum* sp *lycopersici* y *Penicillium italicum*.
- La efectividad del aceite a distintas concentraciones

El objetivo principal es determinar si el aceite esencial de *Thymus serpyllum* podría ser una opción viable para el control de los hongos mencionados anteriormente. El propósito último es desarrollar biofungicidas ecológicos que puedan emplearse en cultivos de campo, almacenamiento de productos, así como en la conservación de alimentos y granos. Esto se debe a la creciente prohibición de productos químicos sintéticos utilizados tradicionalmente para combatir los hongos patógenos.

3.MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

El aceite esencial de *Thymus serpyllum* es comercial, y fue suministrado por Terpenic lab S.L. La Garriga Barcelona con número de lote L7562.

3.2. Composición del aceite esencial.

3.2.1. Materiales y equipos.

En este estudio, se empleó la cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-EM) como método analítico para la identificación inicial de los componentes de las muestras. Además, se utilizó el detector de ionización de llama (CG-FID) para una cuantificación aproximada basada en el método de normalización de las áreas de los picos.

La cromatografía de gases se seleccionó como la técnica adecuada para llevar a cabo el análisis cuantitativo del aceite esencial obtenido. Esta técnica permite estimar el grado de complejidad de un aceite esencial, la naturaleza química de sus componentes y, principalmente, la proporción en la que se encuentran, incluso si algunos de estos compuestos no han sido identificados previamente.

El equipo utilizado consta de un cromatógrafo de gases con detector de masas Clarus 500 GC-MS de Perkin-Elmer Inc. (Wellesley, EEUU), el cual estaba equipado con una columna capilar ZB-5 (5% fenil - 95% dimetilpolisiloxano) de Phenomenex Inc. (Torrance, EEUU) con dimensiones de 30 m x 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de película. Para la cuantificación de las muestras, se utilizó un cromatógrafo de gases Clarus 500GC de Perkin-Elmer Inc. (Wellesley, MA, EEUU), equipado con una columna capilar ZB-5 con las mismas características mencionadas anteriormente.

3.2.2. Fundamento.

La cromatografía de gases es un método físico utilizado para separar los componentes de una muestra vaporizada. Este método se basa en la distribución de los componentes entre una fase gaseosa móvil y una fase estacionaria líquida o sólida presente en una columna. La muestra a analizar se introduce en la fase gaseosa y se inyecta en una de las entradas de la columna cromatográfica (Skoog y col, 2001).

La separación de los componentes se logra mediante el flujo de una fase gaseosa móvil que, a diferencia de otros métodos cromatográficos, es inerte y no interactúa con las moléculas de la muestra. Su función es simplemente transportar los componentes a través de la columna. Existen dos tipos principales de cromatografía de gases: la de gas-líquido y la de gas-sólido. La primera, conocida comúnmente como cromatografía de gases, es la más ampliamente utilizada en diversos campos científicos. Por otro lado, la cromatografía de gas-sólido tiene menos aplicaciones debido a que muchas moléculas reactivas o polares tienen tiempos de retención prolongados, lo que genera colas en los picos de elución que no son aceptables en muchos casos (Sharapin, 2000).

Para identificar los componentes del aceite, la cromatografía de gases se utilizó con detector de espectroscopía de masas. Esta se basa en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo con su masa y su carga, y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado.

Un espectro de masas será, en consecuencia, una información bidimensional que representa un parámetro relacionado con la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la relación masa/carga de cada uno de ellos.

3.2.3. Metodología: parámetros de funcionamiento en el análisis cromatográfico.

En el análisis de espectroscopía de masas, se utilizó gas Helio como fase móvil con un flujo de 1.2 mL/min. La temperatura del inyector se mantuvo a 250°C, mientras que la temperatura del horno fue programada desde 50°C hasta 250°C a una velocidad de aumento de 3°C/min. La detección se llevó a cabo en modo de ionización de impacto electrónico utilizando un método de impacto electrónico a 70 eV, y la temperatura de la fuente de ionización se estableció en 200°C.

Los espectros fueron adquiridos utilizando el modo de escaneo total de iones, en un rango de masas de m/z 45-500 uma. Tanto los cromatogramas como los espectros fueron procesados utilizando el software Turbomass 5.4 de Perkin-Elmer Inc. Los datos obtenidos fueron registrados y comparados con la base de datos NIST MS Search 2.0 (Thermo Electron Corp., Waltham, EEUU). De esta manera, las sustancias correspondientes a cada pico del cromatograma fueron identificadas mediante coincidencias de alta probabilidad con los espectros de masas proporcionados por la base de datos.

Cuando se emplea el detector de ionización de llama (FID), también se utiliza gas portador de Helio con un flujo de 1.2 mL/min. Tanto la temperatura del inyector como la del detector se establecen en 250°C. La temperatura del horno se programa de manera similar, desde 50°C hasta 250°C a una velocidad de 3°C/min. Los cromatogramas obtenidos se procesan utilizando el software TotalChrom 6.2 de Perkin Elmer Inc. Para cada análisis, se inyecta una cantidad de muestra de 1-2 µL.

Tanto para los resultados del análisis cualitativo como para el análisis cuantitativo, se llevó a cabo la identificación combinando el cálculo de los índices de retención lineales y el análisis mediante CG-EM. La fórmula del índice lineal utilizada se muestra a continuación y se aplicó mediante una sencilla hoja de cálculo:

$$IK=100 \times (n^{\circ} C HC_{n-1} + [(TR X - TR HC_{n-1}) / (TR HC_{n+1} - TR HC_{n-1})]).$$

Donde:

N es el número de átomos de carbono del n-alcano que eluye antes del pico analizado.

tRx es el tiempo de retención del pico analizado.

tRn es el tiempo de retención del n-alcano anterior al pico analizado.

tRN es el tiempo de retención del n-alcano posterior al pico analizado.

El siguiente diagrama (figura 18) ilustra todo el proceso analítico llevado a cabo en esta parte del trabajo:

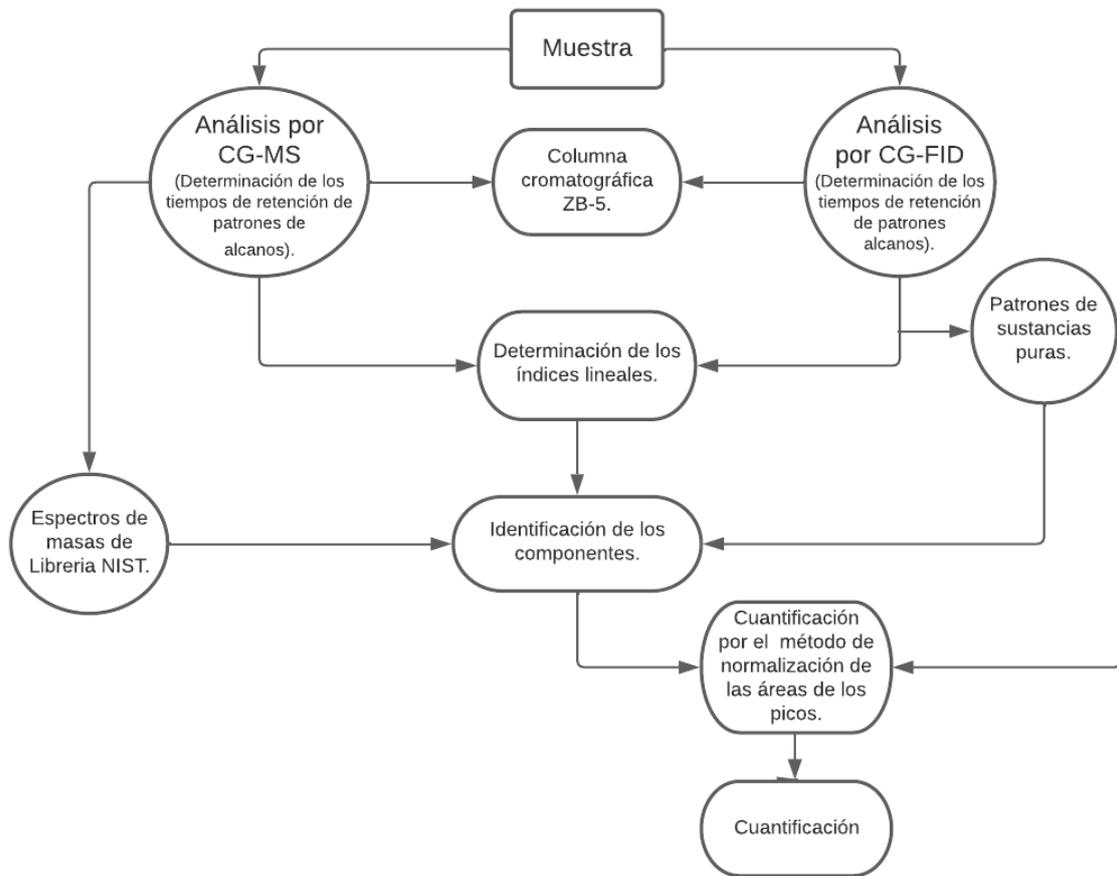


Figura 18: Diagrama del proceso analítico cromatográfico.

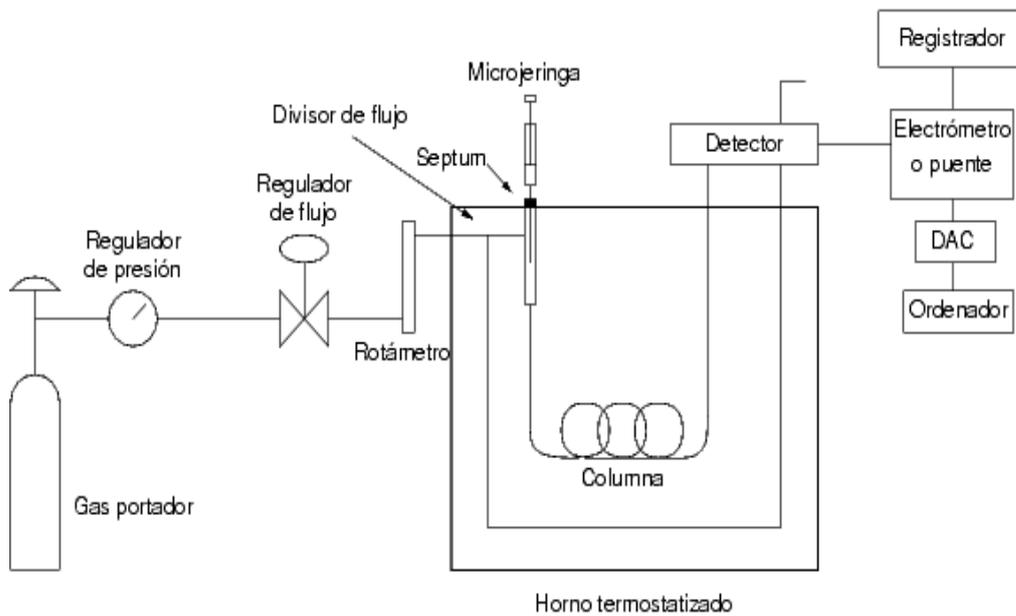


Figura 19: Diagrama de un cromatógrafo de gases.

3.3. Determinación de la actividad antifúngica del aceite esencial.

3.3.1. Materiales.

Aceite esencial	Sacabocados de 0,8 y 0,9 cm
Placas Petri	Papel de aluminio (Albal)
Potato Dextrosa Agar (Laboratorios Conda)	Regla de 30 cm
Tween 80	Guantes
Agua destilada	Rotulador permanente
Lejía	Mechero Bunsen
Placas Petri de 90 y 150 mm	Equipo autoclave (Raypa)
Matraz de Erlenmeyer de 1000 mL	Equipo Orbital (Selecta)
Probeta de 500 mL	Balanza analítica (Kern)
Varilla de vidrio	Cabina de Flujo Laminar (Indelab)
Vaso de precipitado de 100 mL	Estufa de cultivo (Raypa)
Algodón graso	Frigorífico (Liebherr)
Mango Kolle con asa de siembra	

3.3.2. Hongos.

Los hongos que se utilizaron en este trabajo fueron los siguientes: *Alternaria alternata* CECT 20923 (AA), *Bipolaris spicifera* CECT 2776 (BS), *Curvularia hawaiiensis* CECT 20934 (CH) *Fusarium oxysporum sp lycopersici* CECT 2715 (FOL) *Penicillium italicum* CECT 20909 (PI). *Alternaria alternata* CECT 20923 y *Curvularia hawaiiensis* CECT 20934, se aislaron en el Laboratorio de Botánica del Departamento de Ecosistemas Agroforestales a partir de carióspsides de arroz de la variedad Bomba, procedente de la albufera de Valencia. Y se identificaron mediante métodos morfológicos y moleculares, y posteriormente se depositaron en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Por otro lado, *Bipolaris spicifera* CECT 2776, *Fusarium oxysporum lycopersici* CECT 2715, y *Penicillium italicum* CECT 2294 fueron suministrados por la CECT.

3.3.3. Cálculo de la inhibición del crecimiento miceliar (MGI).

El aceite esencial se disolvió, mezcló y homogeneizó mediante agitación en matraces que contenían medio de cultivo PDA/Tween 20 (0,1%), previamente esterilizado. Una vez que el medio de cultivo aún estaba en estado líquido, se agregó el aceite esencial a concentraciones de 300 µg/mL o 150 µg/mL y se distribuyó en placas Petri de 90x15 mm y 150x15 mm. Para el cultivo del hongo, se utilizaron explantes discoidales de 8 mm de diámetro obtenidos de una colonia de 7 días de desarrollo, los cuales se colocaron en el centro de las placas Petri que contenían el aceite esencial. El experimento se incubó a 25°C durante 7 días. Para evaluar el crecimiento del micelio, se midieron dos diámetros perpendiculares de la colonia a los 7 días. Las placas Petri control sólo contenían PDA/Tween 20 (0,1%) y el hongo en estudio. Se llevaron a cabo 5 repeticiones por cada tratamiento y especie fúngica.

Una vez transcurridos los 7 días, se midió el diámetro de la colonia control, es decir sin aceite, y la colonia tratada con las diferentes dosis del aceite esencial.

La inhibición del crecimiento miceliar (MGI) fue calculada el séptimo día utilizando la fórmula siguiente (Albuquerque y col., 2006):

$$MGI = \frac{\text{Diámetro de la colonia control} - \text{Diámetro de la colonia aceite}}{\text{Diámetro de la colonia control}} \times 100$$

4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización química del aceite esencial

En la Tabla 1 se muestra la composición química del aceite esencial de *Thymus serpyllum*.

En el aceite esencial se identificaron 46 compuestos, aunque algunos presentes en trazas pequeñas. De entre estos 46 compuestos destacamos: timol 18,53%, *p*-cimeno 16,58%, carvacrol 15,68%, γ -terpineno 9,55% y *cis*-geraniol 9,18%.

Respecto a los tipos de compuestos, estos se agrupan en cinco:

- Los monoterpenos oxigenados, los cuales son los mayoritarios con un 60,93%.
- Los monoterpenos hidrocarbonados, con un 33,14%.
- Los sesquiterpenos hidrocarbonados, con un 3,77%.
- Los sesquiterpenos oxigenados, los cuales se encuentran en muy pequeña concentración, con un 0,19%
- Otros compuestos, que no pertenecen a ninguno de los grupos anteriores, con un 1,63%.

El contenido del aceite esencial de *Thymus serpyllum* varía en gran medida según el origen de las plantas y a los factores ecológicos, pero esta diferencia no es muy notable, y se encuentra entre el 0,1% y el 0,6% (Wichtl, 1994).

De todos estos compuestos, como es sabido, los compuestos conocidos con un elevado potencial antimicrobiano y antifúngico son el timol y el carvacrol (Naghdibadi y col., 2017).

La siguiente figura (Figura 19) corresponde a la identificación por GC/MS. El cual, es un paso previo para la cuantificación por GC-FID.

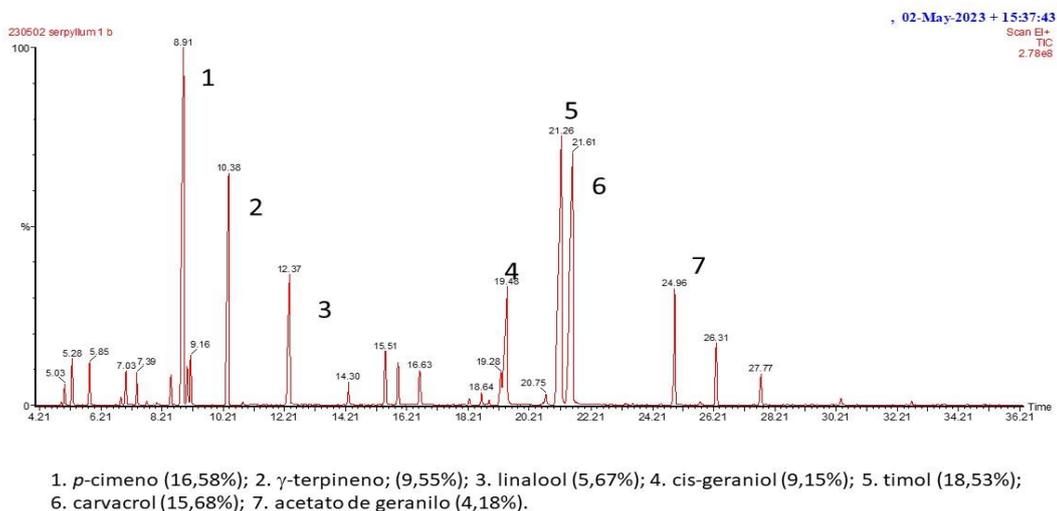


Figura 20: Cromatograma de iones totales (GC/MS) del aceite esencial del *Thymus serpyllum* con los compuestos mayoritarios.

Tabla 1: Composición química del aceite de *Thymus serpyllum*. Compuestos en orden de elución en columna ZB-5 con detector de ionización de llama (cuantificación).

COMPUESTO	LRI	LRI Bib.	M1 %	M2 %	M3%	Promedio	Error Estandar
2-hexenal	850	846	0,16	0,16	0,15	0,16	0,01
Triciclono	921	921	0,09	0,09	0,09	0,09	0,00
α -tuyeno	924	924	0,55	0,54	0,55	0,55	0,01
α -pineno	932	932	1,26	1,24	1,25	1,25	0,01
Camfeno	948	946	1,31	1,29	1,3	1,30	0,01
Sabineno	971	969	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
β -pineno	976	974	0,3	0,29	0,3	0,30	0,01
1-octen-3-ol	979	974	0,98	0,98	0,97	0,98	0,01
3-octanona	984	979	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
β -mirceno	988	988	1,24	1,23	1,23	1,23	0,01
3-octanol	997	988	0,09	0,09	0,09	0,09	0,00
α -felandreno	1006	1002	0,13	0,13	0,13	0,13	0,00
δ -3-careno	1008	1008	0,07	0,06	0,06	0,06	0,01
α -terpineno	1016	1014	1	0,98	0,99	0,99	0,01
p-cimeno	1025	1020	16,68	16,48	16,59	16,58	0,10
Limoneno	1029	1024	1,24	1,23	1,25	1,24	0,01
Eucalyptol	1032	1026	1,29	1,28	1,27	1,28	0,01
γ -terpineno	1058	1054	9,61	9,49	9,55	9,55	0,06
Sabineno hidrato cis	1070	1065	0,14	0,14	0,14	0,14	0,00
Mentha-2,4(8)-diene < ρ ->	1084	1085	0,03	0,07	0,03	0,04	0,02
Linalool	1101	1095	5,69	5,66	5,66	5,67	0,02
Alcanfor	1146	1141	0,76	0,78	0,78	0,77	0,01
Borneol	1173	1165	1,69	1,72	1,7	1,70	0,02
4-terpineol	1181	1174	1,46	1,45	1,45	1,45	0,01
α -terpineol	1195	1186	1,29	1,18	1,18	1,22	0,06
trans-dihydrocarvona	1204	1200	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01
Timol metil éter	1229	1232	0,19	0,19	0,19	0,19	0,00
Carvacrol metil éter	1238	1241	0,43	0,43	0,43	0,43	0,00
Carvona	1244	1239	0,27	0,27	0,28	0,27	0,01
Cis-geraniol	1254	1249	9,13	9,15	9,18	9,15	0,03
Acetato de bornilo	1286	1284	0,56	0,56	0,56	0,56	0,00
Timol	1297	1289	18,14	18,74	18,7	18,53	0,34
Carvacrol	1305	1298	15,81	15,59	15,64	15,68	0,12
α -cubebeno	1346	1345	0,1	0,10	0,09	0,10	0,01
Eugenol	1353	1356	0,09	0,08	0,09	0,09	0,01
α -copaeno	1374	1374	0,08	0,08	0,08	0,08	0,00
Acetato de geraniol	1378	1379	4,17	4,19	4,17	4,18	0,01
Metil eugenol	1402	1403	0,03	0,02	0,01	0,02	0,01
β -cariofileno	1418	1417	2	1,99	1,99	1,99	0,01
α -humuleno	1454	1452	1,01	1,01	1,01	1,01	0,00
Cadina-1(6),4-diene <trans->	1472	1475	0,11	0,11	0,11	0,11	0,00
Germacreno-D	1479	1484	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00

Biclogermacreno	1496	1500	0,06	0,05	0	0,04	0,03
Isobutanoato de geranilo	1506	1514	0,06	0,06	0,06	0,06	0,00
β -bisaboleno	1516	1505	0,29	0,29	0,29	0,29	0,00
Trans-calameneno	1520	1521	0	0,01	0	0,00	0,01
Spathulenol	1581	1577	0,03	0,06	0,01	0,03	0,03
			99,7	99,62	99,67	99,66	

Tabla 2: Agrupación de los diferentes compuestos que componen el aceite esencial del *Thymus serpyllum*.

Monoterpenos Hidrocarbonados	33,14
Monoterpenos oxigenados	60,93
Sesquiterpenos hidrocarbonados	3,77
Sesquiterpenos oxigenados	0,19
Otros componentes	1,63
Total identificado	99.66

4.2. Determinación de la actividad antifúngica del aceite esencial sobre el crecimiento micelar.

En la tabla 3 se muestra el efecto del aceite esencial de *Thymus serpyllum* en el crecimiento de los hongos. Se calcula el diámetro medio (mm) del crecimiento de *Alternaria alternata*, *Bipolaris spicifera*, *Curvularia hawaiiensis*, *Fusarium oxysporum sp lycopersici* y *Penicillium italicum* en los distintos tratamientos ensayados: PDA - control, PDA - 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y PDA - 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En esta tabla se observa como a la dosis de PDA - 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hay una gran diferencia de crecimiento miceliar en comparación con el PDA – control, llegando a ser nulo en el caso de la *Curvularia hawaiiensis*. En cambio, para la *Alternaria alternata* esa diferencia de crecimiento no es tan pronunciada como en los demás hongos. Respecto a la dosis de PDA - 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hay diferenciación de crecimiento miceliar en comparación con el PDA – control, pero no es muy pronunciada. Los únicos casos en los que el crecimiento miceliar ha bajado sustancialmente son en el hongo *Bipolaris spicifera* y *Curvularia hawaiiensis*. Por último, comparando el diámetro de las dosis PDA - 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y PDA - 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ entre sí, vemos una notable diferencia de crecimiento en los hongos *Fusarium oxysporum lycopersici* y *Penicillium italicum*. A la dosis de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el crecimiento es mucho mayor que a 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el cual inhibe bastante el crecimiento. En los demás hongos no hay diferencias destacables impropias de la diferencia de concentración.

Tabla 3: Diámetro medio (mm) del crecimiento de los distintos hongos ensayados en PDA-control y PDA-*Thymus serpyllum* a distintas dosis a los 7 días de incubación.

<i>Thymus serpyllum</i>			
HONGOS	PDA-CONTROL	300 $\mu\text{g}/\text{mL}$	150 $\mu\text{g}/\text{mL}$
AA	64,80	29,80	37,10
BS	82,50	8,40	14,50
CH	42,10	0,00	3,40
FOL	66,40	3,30	21,30
PI	23,60	5,20	16,00

4.3. Cálculo de la inhibición del crecimiento micelar (MGI).

A continuación, en la siguiente tabla (Tabla 4) y figura (Figura 9) se calcula y se representa, respectivamente, la inhibición del crecimiento micelar (MGI) de cada tipo de hongo creciendo en cada medio de cultivo conteniendo el aceite esencial del *Thymus serpyllum*. En estas se muestran resultados bastante prometedores en cuanto a nuestro objetivo, aunque hay algunas excepciones. Como vemos, a dosis de 300 µg/mL todos, excepto el hongo *Alternaria alternata*, superaron el 75% en valor de inhibición del crecimiento micelar (MGI) llegando incluso a la inhibición total en el caso del hongo *Curvularia hawaiiensis*, también destacar el caso del *Fusarium oxysporum lycopersici*, en el cual no se llegó a la inhibición total, pero obtuvo un valor más que reseñable superando el 95% de inhibición. En cambio, a dosis de 150 µg/mL la inhibición disminuye con un efecto no tan efectivo, como es el caso de los hongos *Alternaria alternata* y *Penicillium italicum*, los cuales no superan el 43% y el 33% respectivamente. En el caso del *Fusarium oxysporum lycopersici* la inhibición es alta (67,92%) pero se diferencia mucho de la dosis de 300 µg/mL. En cambio, en el resto sí que se puede afirmar que hay inhibición de gran parte del micelio de los hongos, llegando incluso a igualar casi la dosis de 300 µg/mL, con valores altos cabe destacar, lo cual se puede expresar como un gran resultado, ya que, en términos de concentración es una diferencia bastante notoria, es el caso de *Bipolaris spicifera* y *Curvularia hawaiiensis*.

Tabla 4: Cálculo del MGI (porcentaje de inhibición) para cada especie en el medio de cultivo PDA con *Thymus serpyllum*.

Conc. µg/mL	AA	BS	CH	FOL	PI
300	54,01	89,82	100	95,03	77,97
150	42,75	82,42	91,92	67,92	32,20

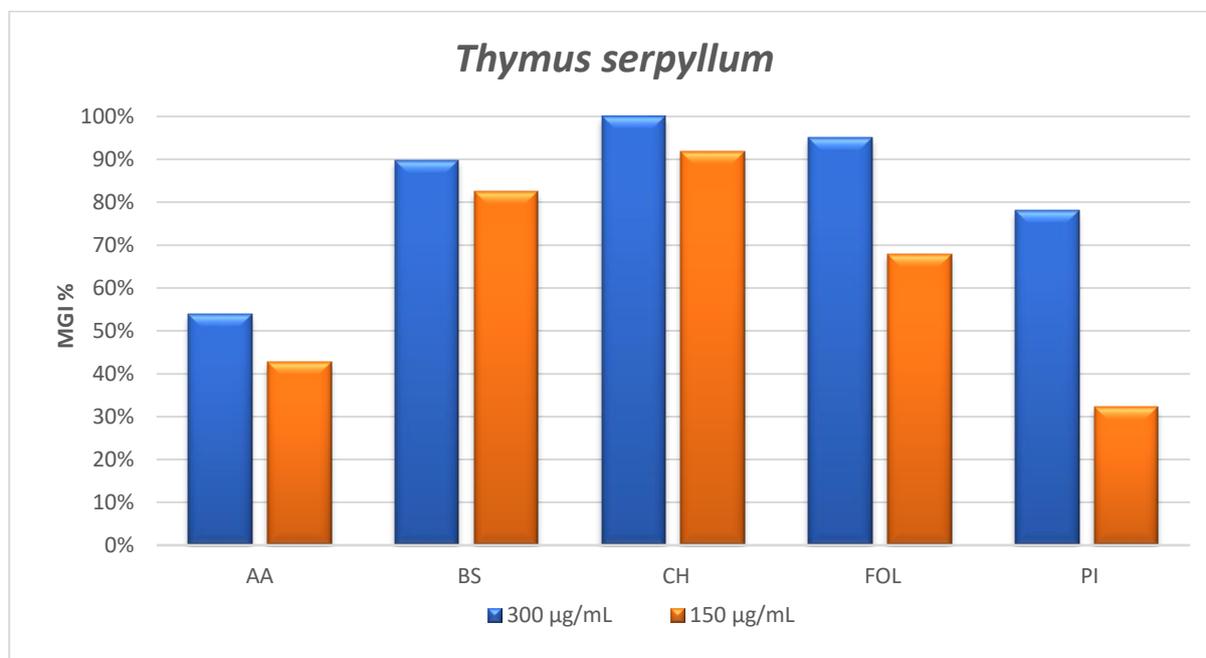


Figura 21: Representación gráfica del MGI (%) de *Thymus serpyllum* a las dosis de 300 µg/mL y 150 µg/mL para las distintas especies ensayadas.

En las siguientes figuras se observa el crecimiento miceliar de los hongos que han sido objeto de estudio para el aceite esencial y sus respectivas dosis ensayadas en el presente trabajo. Se puede comparar como han crecido los hongos en medio PDA (control), sin adicionar aceite esencial en el medio, con el crecimiento a dosis de aceite esencial de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En el medio PDA (control), como era de esperar, todos los hongos crecieron correctamente sin ningún impedimento, tal y como se observa en las figuras 22, 23, 24, 25 y 26. A la dosis de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de aceite esencial, después de 7 días de incubación, disminuyó en gran medida el crecimiento miceliar en todos los hongos como se puede observar, destacando sobretodo, el *Bipolaris spicifera* (Figura 23), el *Curvularia hawaiiensis* (Figura 24) y el *Fusarium oxysporum sp lycopersici* (Figura 25). Los cuales obtuvieron una inhibición casi completa o completa en el caso de *Curvularia hawaiiensis*.

A la dosis 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de aceite esencial la inhibición del crecimiento no fue tan espectacular, pero no por ello menos satisfactoria. Aunque hubo algunos casos que no dieron unos resultados tan positivos, en el caso del *Penicillium italicum* (Figura 26) o *Alternaria alternata* (Figura 22). Otros, al igual que en la dosis de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dieron unos resultados muy buenos. *Bipolaris spicifera* (Figura 23), *Curvularia hawaiiensis* (Figura 24) y *Fusarium oxysporum sp lycopersici* (Figura 25) a la mitad de concentración de aceite esencial dieron casi los mismos resultados que a la dosis de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

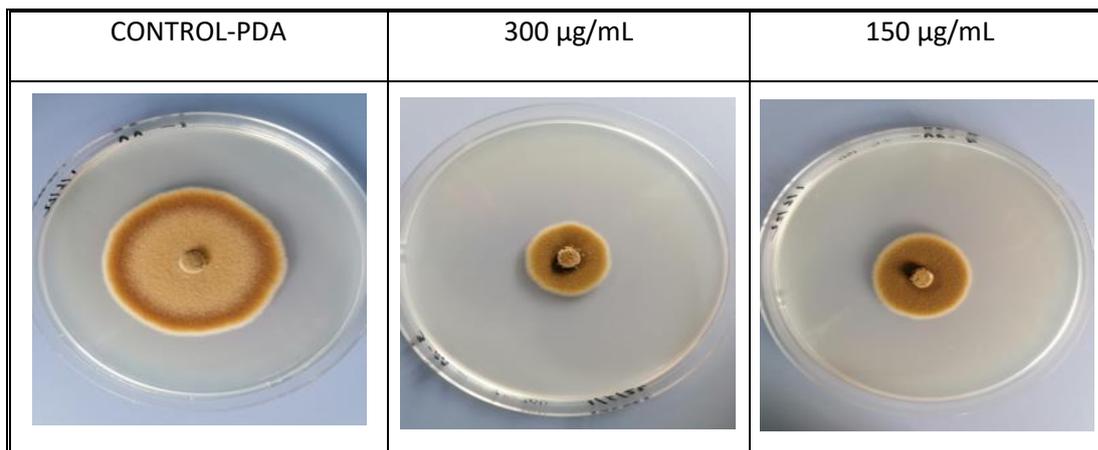


Figura 22: Crecimiento de *Alternaria alternata* en PDA (control) y en PDA con aceite esencial de *Thymus serpyllum* a las dosis de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a los 7 días de incubación.

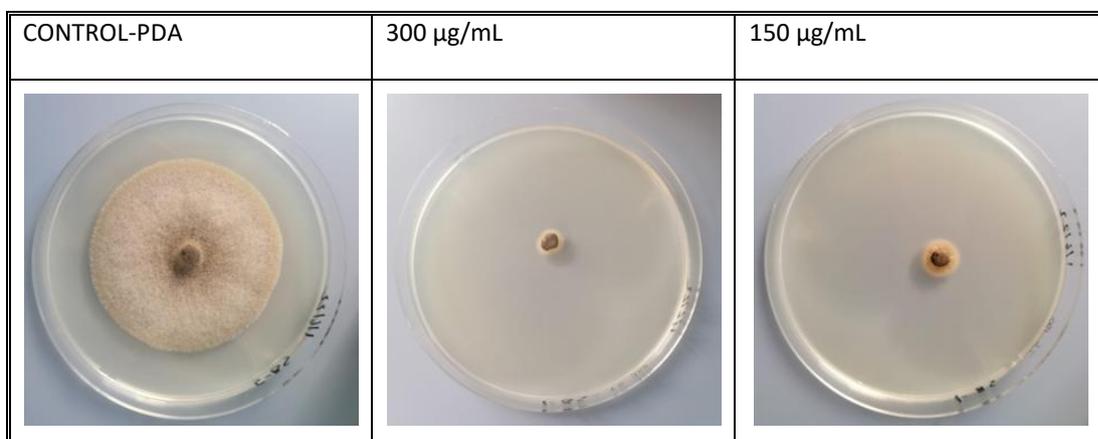


Figura 23: Crecimiento de *Bipolaris spicifera* en PDA (control) y en PDA con aceite esencial de *Thymus serpyllum* a las dosis de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a los 7 días de incubación.

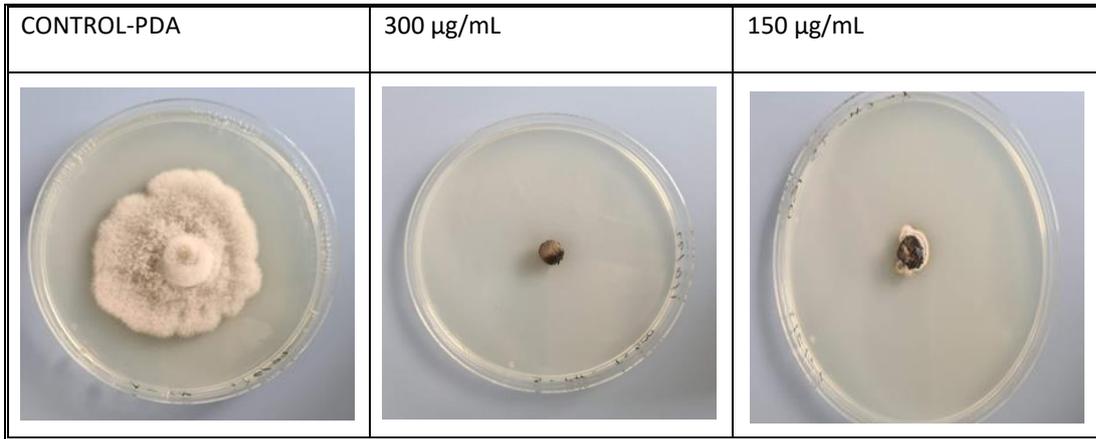


Figura 24: Crecimiento de *Curvularia hawaiiensis* en PDA (control) y en PDA con aceite esencial de *Thymus serpyllum* a las dosis de 300 µg/mL y 150 µg/mL, a los 7 días de incubación.

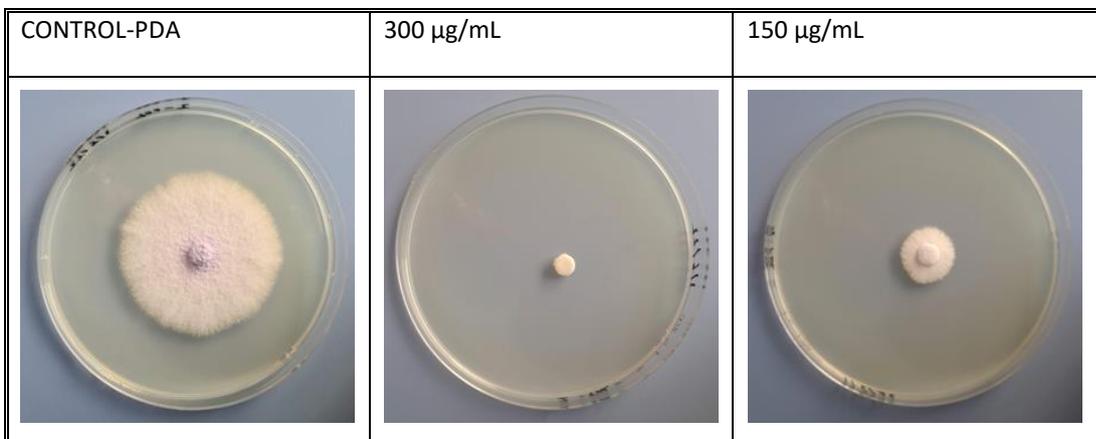


Figura 25: Crecimiento de *Fusarium oxysporum sp lycopersici* en PDA (control) y en PDA con aceite esencial de *Thymus serpyllum* a las dosis de 300 µg/mL y 150 µg/mL, a los 7 días de incubación.

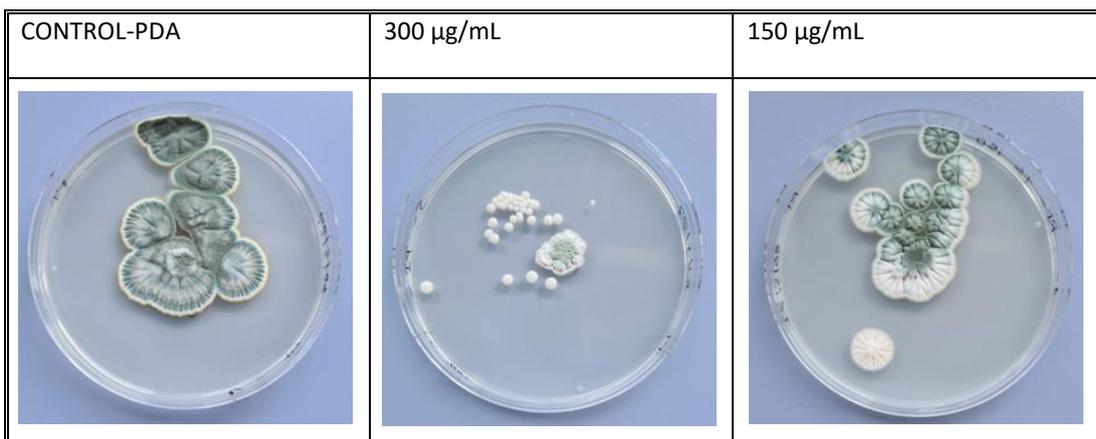


Figura 26: Crecimiento de *Penicillium italicum* en PDA (control) y en PDA con aceite esencial de *Thymus serpyllum* a las dosis de 300 µg/mL y 150 µg/mL, a los 7 días de incubación.

4.4. Discusión.

La actividad antifúngica de los aceites esenciales es un hecho, aunque, todo parece indicar que no es debida a un único componente mayoritario, sino que, al ser estos aceites mezclas muy complejas, su actividad antimicrobiana y antifúngica es el resultado de una sinergia entre todos sus componentes. De hecho, algunos autores indican que los componentes mayoritarios de estos aceites esenciales por separado no son más efectivos que los propios aceites esenciales, mientras que otros muestran resultados contrarios (Santamarina y col., 2015).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio dieron como resultado que el timol es el componente mayoritario en nuestro aceite esencial comercial de *Thymus serpyllum*. Sin embargo, no ocurre siempre lo mismo en todos los estudios realizados acerca de esta planta. Esto es debido a que la región en donde se coseche influye en su composición química. La gran mayoría de estudios coinciden en que el componente mayoritario del aceite esencial es el timol (Galovičová y col., 2021; Raal y col., 2004; Ahmad y col., 2006; Verma y col., 2011) o el carvacrol (Hussain y col., 2013; Kulisic y col., 2005; Wesolowska y col., 2005; Goja y col., 2020). Por otro lado, existen estudios, aunque en menor medida, en los que no se determinan ninguno de estos dos compuestos como mayoritario, debido a la procedencia geográfica de la planta o al método de extracción del aceite esencial, lo cual puede significar una variación en el perfil químico. Algunos estudios obtuvieron el γ -terpineno como componente mayoritario (Sefidkon y col., 2001) o el acetato de α -terpineol y mirceno dependiendo del método de extracción utilizado (Nikolić y col., 2019). Incluso un estudio realizado en la región del sur de Italia estableció que dentro de la especie de *Thymus serpyllum* también existen diferencias en la composición de sus biotipos, en dos quimiotipos (S2 y S3), siendo la concentración de geraniol la más alta (35% y 22%, respectivamente), mientras que en el biotipo S1 el timol es predominante (32.6%) (De Lisi, 2011).

También existen algunos estudios que nos aportan referencias bibliográficas que corroboran y demuestran la actividad antifúngica de la especie *Thymus serpyllum* en base a sus componentes, que se basa en la sinergia de los mismos. Sin embargo, podemos decir que esta actividad antifúngica y antimicrobiana se debe en su mayoría a los componentes fenólicos, timol, *p*-cimeno y carvacrol, así como su precursor, el *p*-cimeno, siendo estos compuestos los más representativos del aceite esencial obtenido de esta especie (Lee y col, 2005).

En Croacia (Sokolić-Mihalak y col, 2011), se llevó a cabo un estudio sobre los efectos de los componentes del *Thymus serpyllum* en algunos hongos del género *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. carbonarius* y *A. niger*). En este no solo se demostró la actividad antifúngica del aceite esencial, sino también la del timol y los fenoles totales, haciendo ver claramente una mayor actividad del aceite esencial en comparación a estos componentes por separado. En cuanto a los resultados del aceite esencial contra los hongos del género *Aspergillus*, estos no dieron unos resultados tan prometedores como los nuestros y en ningún caso se superó el 80% de inhibición. En este estudio se ha sugerido que los aceites esenciales pueden actuar atacando la pared celular y obligando al citoplasma a retirarse hacia las hifas, lo que en última instancia mata al micelio. El mecanismo inhibitorio también incluye los efectos de los componentes del aceite esencial en las reacciones enzimáticas involucradas en la síntesis de la pared celular. Esta interferencia puede afectar directamente el crecimiento y la morfogénesis fúngica (Carmo y col, 2008).

Como hemos visto anteriormente en este trabajo, es bien sabido que la actividad antifúngica propia de la planta mayoritariamente es aportada por los compuestos fenólicos timol y carvacrol y de sus precursores biogénicos p-cimeno y γ -terpineno.

Esto se puede ver en el estudio de Numpaque y col., (2011), en el cual los resultados muestran que ambos compuestos despliegan un relativo buen control contra los hongos fitopatogénicos; el crecimiento micelial de *Colletotrichum acutatum* y *Botryodiplodia theobromae* se inhibió a concentraciones de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y mayores. A 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, timol y carvacrol inhibieron el crecimiento radial de los hongos completamente y este efecto permaneció durante 4 días. Por lo tanto, concluyeron que la actividad antifúngica relativamente alta de timol y carvacrol contra *C. acutatum* and *B. theobromae* y los niveles de transformación microbiana bajos, indican que ambos compuestos pueden ser una alternativa a los fungicidas químicos tradicionales para el control de los hongos fitopatogénicos en pre- y poscosecha de frutas y vegetales.

También, en otro estudio realizado por Zhang y col., (2019) se comprobó la actividad antifúngica del timol y del carvacrol, en este caso sobre *Botrytis cinerea*. Los resultados indicaron que el timol y carvacrol mostraron una fuerte actividad antifúngica contra el patógeno objetivo, con una concentración inhibitoria mínima y concentración fungicida mínima de 65 $\mu\text{g}/\text{L}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ para el timol, y 120 $\mu\text{g}/\text{L}$ y 140 $\mu\text{g}/\text{L}$ para el carvacrol. El timol y carvacrol cambiaron notablemente la morfología de las hifas de *B. cinerea* al interrumpir y distorsionar el micelio a través de microscopía electrónica de barrido. La permeabilidad de la membrana de las hifas de *B. cinerea* se incrementó con el aumento de la concentración de los dos agentes químicos, como se evidenció por el aumento de la conductividad extracelular, la liberación de componentes celulares y la disminución del pH extracelular. En conclusión, se pudo atribuir la misma función que en anterior estudio mencionado.

Por último, cabe destacar la investigación realizada por Galovicová y col., (2021), en la cual se reportaron propiedades antimicrobianas en el aceite esencial de *Thymus serpyllum*, cuya composición era casi idéntica a la nuestra. En este se puede ver cómo, a concentraciones de 50 y 90 ($\mu\text{L}/\text{mL}$), la inhibición de crecimiento es extremadamente satisfactoria en microorganismos como *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Bacillus subtilis*.

En nuestro estudio, al igual que en los anteriores mencionados, pudimos comprobar la gran actividad antifúngica de este *Thymus serpyllum* y sus componentes mayoritarios timol (18,53%), p-cimeno (16,58%), carvacrol (15,68%) y γ -terpineno (9,55%). Los resultados han sido muy esperanzadores, superando en la gran mayoría de hongos, a concentración de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el 70, 80% e incluso llegando al 100% en inhibición del crecimiento. También cabe mencionar que a concentración de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en los hongos *Bipolaris spicifera* y *Curvularia hawaiiensis* la inhibición del crecimiento fue superior al 80% en los dos casos, lo cual es más que satisfactorio, teniendo en cuenta que se trata de una concentración mucho menor.

5.CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

- Los compuestos mayoritarios en el aceite esencial de *Thymus serpyllum* pertenecen al grupo de los monoterpenos oxigenados, los cuales representan un 60,93% de la totalidad.
- El timol con un 18,53% del total es el componente mayoritario del aceite esencial de *Thymus serpyllum* siguiéndole el p-cimeno (16,58%), carvacrol (15,68%), γ -terpineno (9,55%) y cis-geraniol (9,18%).
- A la dosis de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ disminuyó el crecimiento en de todos los hongos objeto de estudio y, aunque a pesar de no inhibir ninguno completamente el *B. spicifera* y el *C. hawaiiensis* dieron un muy buen resultado superando el 80 y el 90% de inhibición del crecimiento respectivamente. A la dosis de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, al ser el doble de concentración los resultados fueron mejores. En este destacamos la completa inhibición del hongo *Curvularia hawaiiensis* y el 95% de inhibición del *Fusarium oxysporum lycopersici*. Otros buenos resultados, aunque no tan reseñables fueron los del *Bipolaris spicifera* y *Penicillium italicum*. Por último, el resultado menos esperanzador, pero para nada despreciable fue el del hongo *Alternaria alternata*, el cual llegó tan solo al 54% de inhibición de crecimiento.
- El aceite esencial de *Thymus serpyllum* ha presentado unos resultados excelentes al disminuir el crecimiento miceliar en los hongos ensayados. Por lo tanto, este aceite y/o sus componentes podrían ser una alternativa a los fungicidas en pre- y postcosecha de frutas y vegetales, así como para alargar la vida útil de productos agrícolas almacenados.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- ADELAKUN, O. E., OYELADE, O. J., & OLANIPEKUN, B. F. (2016). Use of Essential Oils in Food Preservation. En Food Preservative Effects of Essential Oils, 71-84.
- AGRIOS, G. N. (2005). Plant diseases caused by fungi. Plant pathology. Elsevier Academic Press, California, 385-614.
- AGRIOS, G. N. (1996). Fitopatología (2da Edición). Editorial Limusa. México.
- AHMAD, A. M., KHOKHAR, I., AHMAD, I., KASHMIRI, M. A., ADNAN, A., & AHMAD, M. (2006). Study of antimicrobial activity and composition by GC/MS spectroscopic analysis of the essential oil of *Thymus serpyllum*. Journal of Food Safety, 5, 56-60.
- AKIMITSU, A., PEEVER, T.L., & TIMMER, L.W. (2003). Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. Molecular Plant Pathology, 4, 435-446.
- ARIE, T. (2010). Phylogeny and phytopathogenicity mechanisms of soilborne *Fusarium oxysporum*. Journal of General Plant Pathology, 76, 403-405.
- BACKHOUSE, D. L., BURGESS, W., & SUMMERELL, B. A. (2001). BIOGEOGRAPHY OF FUSARIUM. EN: SUMMERELL, B. A., LESLIE, J. F., BACKHOUSE, D., BRYDEN, W. L., & BURGESS, L. W. (eds.) *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*. APS Press. St. Paul, Minnesota. Pp. 122-137.
- BANAEVA, Y. A., POKROVSKY, L. M., & TKACHEV, A. V. (1998). Chemical composition of the essential oil of *Thymus serpyllum* L. growing wild in Altai region. In Proceedings of the International Conference on Natural Product and Physiologically Active Substance (ICNPAS '98). Pp. 6-34.
- BIAL-ARISTEGUI. (2002). Revista Iberoamericana de Micología, pp. 19-21.
- BOROS, B., JAKABOVÁ, S., DÖRNYEI, Á., HORVÁTH, G., PLUHÁR, Z., KILÁR, F., & FELINGER, A. (2010). Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in *Thymus* species. Journal of Chromatography A, 1217, 7972-7980.
- CARMO, E. S., DE OLIVEIRA LIMA, E., DE SOUZA, E. L., & DE SOUSA, F. B. (2008). Effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume essential oil on the growth and morphogenesis of some potentially pathogenic *Aspergillus* species. Brazilian Journal of Microbiology, 39, 91-97.
- CARRILLO, L., MORA, C., ÁLVAREZ, R., ALZATE, F., & OSORIO, E. (2015). Chemical composition and antibacterial activity against *Enterobacter cloacae* of essential oils from Asteraceae species growing in the Páramos of Colombia. Industrial Crops and Products, 77, 108-115.
- CASTAÑO, Z. (2005). Los hongos como agentes de control biológico. Guía ilustrada de hongos promisorios para el control de malezas, insectos, nematodos y hongos fitopatógenos. Manizales: Editorial Universidad de Caldas, 23, 112-121.
- DE GRANADA, E. G., DE AMEZQUITA, M.C.O., MENDOZA, G. R. B., & ZAPATA, H. A. V. (2001). *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. Acta biológica colombiana, 6(1), 7-25.
- DE LISI, A., TEDONE, L., MONTESANO, V., SARLI, G., & NEGRO, D. (2011). Chemical characterisation of *Thymus* populations belonging from Southern Italy. Food Chemistry, 125(4), 1284–1286.

- DIKLIĆ, N. (1974). *Lamiaceae*. In M. Josifović (Ed.), Flora Srbije VI (pp 339-527).
- DUVEILLER, E., KANDEL, Y. R., SHARMA, R. C., & SHRESTHA, S. M. (2005). Epidemiology of foliar blights (spot blotch and tan spot) of wheat in the plains bordering the Himalayas. *Phytopathology*, 95, 248-256.
- FAO. (2001). Evaluación de los recursos forestales mundiales 2000 – informe principal. Estudio FAO: Montes Núm. 140. Roma, Italia.
- FLETCHER, J., BENDER, C., BODOWLE, B., COBB, W. T., GOLD, S. E., ISHIMARU, C. A., (2006). Plant pathogen forensics capabilities, needs, and recommendations. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, 450-471.
- FLORES, M., MARTÍNEZ, M., NIETO, D., RODRÍGUEZ, J., COLINAS, M., & MARTÍNEZ, J. (2013). Reducción en la Germinación in vitro de Conidios de *Alternaria alternata* aislada de Eruca sativa con Jugo de Brócoli. *Revista mexicana de fitopatología*, 31(2), 180-190.
- GALOVIČOVÁ, L.; BOROTOVÁ, P.; VALKOVÁ, V.; VUKOVIC, N.L.; VUKIC, M.; TERENTJEVA, M.; ŠTEFÁNIKOVÁ, J.; DÚRANOVÁ, H.; KOWALCZEWSKI, P.Ł.; KACÁNIOVÁ, M. *Thymus serpyllum* Essential Oil and Its Biological Activity as a Modern Food Preserver. *Plants* 2021, 10-1416.
- GOJA, I., ULICI, A., CULEA, M., MUNTEANU, V., & PODEA, P. (2020). The influence of geographic location and enzyme-assisted extraction on essential oils composition of *Thymus serpyllum* growing wild in Transylvania. *Studia UBB Chemia*, LXV, 3, 135-147.
- GONZÁLEZ, I., ARIAS, Y., & PETEIRA, B. (2012). Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* - tomate. *Revista de Protección Vegetal*, 27, 1-7.
- GUZMÁN, M. D. (2001). Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. *Acta Zool. Mex.*, (1), 53-78.
- HIRANO, Y., & ARIE, T. (2006). PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* and radicles-lycopersici and races of *F. oxysporum f. sp. lycopersici*. *Journal of General Plant Pathology*, 72(5), 273-283.
- HOOG, G. S., GUARRO, J., GENÉ, J., & FIGUERAS, M. J. (2000). Atlas of clinical fungi (2nd ed.). Utrecht: Centraalbureau voor schimmelcultures.
- HUSSAIN, A. I., ANWAR, F., CHATHA, S. A. S. (2013). Chemical composition and bioactivity studies of the essential oils from two *Thymus* species from the Pakistani flora. *LWT—Food Science and Technology*, 50(1), 185–192.
- INDEX FUNGORUM. (2016). www.indexfungorum.org.
- ISSHIKI, A., AKIMITSU, K., NISHIO, K., TSUKAMOTO, M., & YAMAMOTO, H. (1997). Purification and characterization of an endopolygalacturonase from the rough lemon pathotype of *Alternaria alternata*, the cause of citrus brown spot disease. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 51, 155–167.
- JARIĆ, S., MITROVIĆ, M., & PAVLOVIĆ, P. (2015). Review of Ethnobotanical, Phytochemical, and Pharmacological Study of *Thymus serpyllum* L. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015, 101978.

- KULISIC, T., RADONIC, A., & MILOS, M. (2005). Antioxidant properties of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) essential oils. Pp. 315-324.
- LEE, S.-J., UMANO, K., SHIBAMOTO, T., & LEE, K.-G. (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 91, 131-137.
- LÓPEZ, L. I., GUTIÉRREZ, P., BAUTISTA, S., JIMÉNEZ, L. F., & ZAVALA, H. A. (2013). Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano en *Alternaria alternata* y en la calidad del mango 'Tommy Atkins' durante el almacenamiento. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 19(3), 315-331.
- MADER, S., WINDELSPECHT, M. (2013). *Biología*. Ed. Mc Graw-Hill. México.
- MADIGAN, M., MARTINKO, J., & PARKER, J. (2003). *Brock biología de los microorganismos*. Madrid: Prentice Hall Iberia, 42, 783-1131.
- MALAKER, P. K., MIAN, I. H., KHANDAKER, M., & REZA, M. M. A. (2007). Survival of *Bipolaris sorokiana* (Sacc.) shoemaker in soil and residues of wheat. *Bangladesh Journal of Botany*, 36, 133-137.
- MANAMGODA, D. S., ROSSMAN, A. Y., CASTLEBURY, L. A., CROUS, P. W., MADRID, H., CHUKEATIROTE, E., & HYDE, K. D. (2014). The genus bipolaris. *Studies in mycology*, 79, 221-288.
- MARTÍNEZ, A. (1996). Aceites esenciales. *Journal of Natural Products*, 59(1), 77-79.
- MILADI, H., MILI, D., SLAMA, R., ZOUARI, S., AMMAR, E., & BAKHROUF, A. (2016). Antibiofilm formation and antiadhesive property of three Mediterranean essential oils against a foodborne pathogen *Salmonella* strain. *Microbial Pathogenesis*, 93, 22-31.
- MOLINA, J. A. L., SANCHO, M. V., & RELLÁN, D. G. (2012). Composición química y actividad biológica de los aceites esenciales: algunos experimentos para la introducción a la química orgánica. *ENSEÑANZA Y DIVULGACIÓN*, 283.
- NAGHDIBADI, H., ABDOLLAHI, M., MEHRAFARIN, A., GHORBANPOUR, M., TOLYAT, M., QADERI, A., & YEKTA, M. G. (2017). An Overview on Two Valuable Natural and Bioactive Compounds, Thymol and Carvacrol, in Medicinal Plants. *Journal of Medicinal Plants*, 16, 1-32.
- NELSON, H. (1964). *Cochliobolus lunatus*. *Mycologia*, 56-316.
- NELSON, P.E., Toussoun, T.A., and Marasas, W.F.O. (1983). *Fusarium Species*. In: *An Illustrated Manual for Identification*, Pennsylvania State University Press, University Park, 56-193.
- NIKOLIĆ, B., MATOVIĆ, M., MLADENOVIĆ, K., TODOSIJEVIĆ, M., STANKOVIĆ, J., ĐORĐEVIĆ, I., MARIN, P. D., & TEŠEVIĆ, V. (2019). Volatiles of *Thymus serpyllum* Obtained by Three Different Methods. *Natural Product Communications*, 14(6), 1-3.
- NUMPAQUE, M. A., OVIEDO, L. A., GIL, J. H., GARCÍA, C. M., & DURANGO, D. L. (2011). Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae*. *Tropical Plant Pathology*, 36(1), 3-13.

- PERGOMET, J. L., DI LIBERTO, M. G., DERITA, M. G., BRACCA, A. B. J., & KAUFMAN, T. S. (2018). Activity of the *pterophyllins* 2 and 4 against postharvest fruit pathogenic fungi. Comparison with a synthetic analog and related intermediates. *Fitoterapia*, 125, 98-105.
- PRAKASH, B., & KIRAN, S. (2016). Essential oils: a traditionally realized natural resource for food preservation. *Current Science*, 110(10), 1890-1892.
- PITT, J. I., & HOCKING, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage* (Vol. 519). New York: Springer.
- RAAL, A., PAAVER, U., ARAK, E., & ORAV, A. (2004). Content and composition of the essential oil of *Thymus serpyllum* L. growing wild in Estonia. *Medicina (Kaunas)*, 40(8), 795.
- RADAELLI, M., PARRAGA, B., WEIDLICH, L., HOEHNE, L., FLACH, A., MIRANDA, E. (2016). Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 424-430.
- SAMSON, R. A., HOEKTRA, E. S., & FRISVAD, J. C. (2004). *Introduction to food-and airborne fungi* (No. Ed. 7). Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).
- SÁNCHEZ, M. F. O. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*.
- SÁNCHEZ, D., BAUTISTA, S., & CASTILLO, P. (2007). Efecto del quitosano en el desarrollo y morfología de *Alternaria alternata* (FR.) KEISSL. *Anales de Biología*, (29), 23–32.
- SANTAMARINA, M. P., ROSELLÓ, J., SEMPERE, F., GIMÉNEZ, S., & BLÁZQUEZ, M. A. (2015). Commercial *Origanum compactum* Benth. and *Cinnamomum zeylanicum* Blume essential oils against natural mycoflora in Valencia rice. *Natural product research*, 29(23), 2215-2218.
- SCHULZ, B., BOYLE, C., & SIEBER, T. (2006). *Microbial Root Endophytes*. 9(3), 153-177.
- SEFIDKON, F., DABIRI, M., & MIRMOSTAFA, S. A. (2001). The Composition of *Thymus serpyllum* L. Oil. *Journal of Essential Oil Research*, 13(3), 184-185.
- SHARAPIN, N. (2000). *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos* (1.a ed.). Colombia: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Pp. 179-189.
- SHEW, H.D. and LUCAS, G.B. (1991). *Compendium of Tobacco Diseases*. St. Paul, MN: APS Press.
- SINGH, H., BATISH, D., & KOHLIL, R. (2003). Allelopathic interactions and allelochemicals: new possibilities for sustainable weed management. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22, 239-311.
- SKOOG, D.A., WEST, D.M., HOLLER, F.J., CROUCH, S.R. 2001. *Química Analítica*. 7ª. Edición. México. Editorial McGraw-Hill. 687-696
- SOKOLIĆ-MIHALAK, D., FRECE, J., SLAVICA, A., DELAŠ, F., PAVLOVIĆ, H., & MARKOV, K. (2012). The Effects Of Wild Thyme (*Thymus Serpyllum* L.) Essential Oil Components Against *Ochratoxin-Producing Aspergilli*. *Food Technology and Biotechnology*, 63(4), 457-462.
- SORIANO DEL CASTILLO, J. M. (2007). *Micotoxinas en alimentos*. Ediciones Díaz de Santos. Tampieri, M.P., Galuppi, R., Macchioni, F., Carelle, M.S., Falcioni, L., Cioni, P.L. y Morelli, I., 2005. The

inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. *Mycopathologia* 159: 339-345.

- SRINIVAS, C., NIRMALA, D., NARASIMHA, K., MOHAN, C., CHAKRABHAVI, D., LAKSHMEESHA, T., BHIM, S., NIRANJANA, S., HASHEM, A., ALQARAWI, A., TABASSUM, B., ABD ALLAH, E., & CHANDRA, S. (2019). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity - A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26, 1315-1324.
- STARLIPER, C., KELOTA, H., NOYES, A., SCHILL, W., HENSON, F., & DITTMAN, D. (2015). An investigation of the bactericidal activity of selected essential oils to *Aeromonas* spp. *Journal of Advanced Research*, 6, 89-97.
- SUSO S.M. (Fotógrafo). (2014). *Thymus serpyllum* [Fotografía]. En *Flora de Galicia*. España. Lugo, Os Ancares (Cervantes).
- THOMMA, B. (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4, 225-236.
- TRAVIS, W. D., KWON-GHUNG, K. J., KLEINER, D. E., GEBER, A., LAWSON, W., PASS, H. I., HENDERSON, H. D. (1991). Unusual aspects of allergic bronchopulmonary fungal disease. Report of two cases due to *Curvularia* organisms associated with allergic fungal sinusitis. *Human Pathol*, 22, 1240-1248.
- VERMA, R. S., VERMA, R. K., CHAUHAN, A., & YADAV, A. K. (2011). Seasonal Variation in Essential Oil Content and Composition of Thyme, *Thymus serpyllum* L. Cultivated in Uttarakhand Hills. *Pharmacognosy Research*, 3(2), 233-235.
- VICHICELA, B., & ELIZABETH, P. (2014). Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos en el cultivo de mora de castilla (*Rubus glaucus benth*) sector Huachi Chico-Ambato-Tungurahua, 2014 (Bachelor's thesis, LATACUNGA/UTC/2015).
- VISAGIE, C.M., HOUBRAKEN, J., FRISVAD, J.C., HONG, S.-B., KLAASSEN, C.H.W., PERRONE, G., SEIFERT, K.A., VARGA, J., YAGUCHI, T., & SAMSON, R.A. (2014). *Studies in Mycology*, 78(1), 343-371.
- WALTON, J.D. (1996). Host-selective toxins: agents of compatibility. *The Plant Cell*, 8, 1723-1733.
- WESOŁOWSKA, A., GRZESZCZUK, M., JADCZA, D., NAWROTEK, P., & STRUK, M. (2015). Comparison of the Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Thymus serpyllum* Essential Oils. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 43(2), 432-438.
- WICHTL, M. (1994). *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers.
- ZHANG, J., MA, S., DU, S., CHEN, S., & SUN, H. (2019). Antifungal activity of thymol and carvacrol against postharvest pathogens *Botrytis cinerea*. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 2611-2620.