

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Composició química de los aceites esenciales de Lavanda y Tomillo. Determinación de la actividad antifúngica.

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO
RURAL

ALUMNO: D. MANUEL MARQUÉS CAMARENA

TUTORA: Dña. Isidora Sanz Berzosa

COTUTORA: Dña. M. Pilar Santamarina Siurana

DIRECTORA EXPERIMENTAL: Dña. Josefa Roselló Caselles

Curso Académico 2015/2016

VALENCIA, NOVIEMBRE DEL 2015



COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE LAVANDA Y TOMILLO. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Autor: Marqués Camarena, Manuel

Trabajo Final de Grado

Tutora: D^a. Isidora Sanz Berzosa
Co-tutora: D^a. M^a Pilar Santamarina Siurana

Realizado en: Valencia
Fecha: Noviembre, 2015

Resumen:

Los aceites esenciales han mostrado en diversos trabajos propiedades antibacterianas y antifúngicas. En el presente trabajo se estudia la composición química, mediante cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), de los aceites esenciales comerciales de *Lavandula angustifolia* y *Thymus zygis*. Posteriormente se evaluó la actividad antifúngica.

La contaminación fúngica de los productos agrícolas es un problema crónico y conlleva la disminución en cantidad y calidad de las cosechas y por tanto de los alimentos. Solo los hongos fitopatógenos provocan una pérdida de cerca del 20% de los principales alimentos y cultivos de mayor importancia económica. En este trabajo se evalúa la capacidad antifúngica de los aceites esenciales comerciales de tomillo (*Thymus zygis*) y lavanda (*Lavandula angustifolia*) sobre los hongos fitopatógenos y de post-cosecha *Alternaria alternata* (AA), *Bipolaris spicifera* (BS), *Rhizoctonia solani* (RS), *Colletotrichum gloeosporoides* (CG), *Curvularia hawaiiensis* (CH), *Fusarium oxysporum lycopersici* (FOL), *Fusarium equiseti* (FE), *Fusarium graminearum* (FG), *Penicillium expansum* (PE), *Penicillium italicum* (PI) causantes del deterioro de productos agrícolas, y algunos de ellos productores de micotoxinas; con el fin de obtener un biofungicida botánico respetuoso con el medioambiente, y de bajo riesgo.

La actividad antifúngica “*in vitro*” de los aceites esenciales se evaluó siguiendo la metodología de Singh et al., (2008) modificada. Los bioensayos se realizaron a la dosis de 200 µg/mL y 300 µg/mL.

Los resultados obtenidos fueron los esperados. Valores como el MGI reflejan el satisfactorio resultado que se ha tenido. La inhibición del crecimiento miceliar (MGI) para el tomillo fue cercano al 100% para 300 µg/mL. Para 200 µg/mL este valor disminuyó, siendo aun así un valor alto. El aceite esencial de lavanda no presentó datos de inhibición significativos.

En este estudio se pone de manifiesto el gran potencial del aceite esencial de tomillo para el control de los hongos y se muestra como alternativa sólida a los agroquímicos.

Palabras clave: Tomillo, Lavanda, Actividad antifúngica, Timol



CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OILS OF LAVENDER AND THYMUS. DETERMINATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY

Author: Marqués Camarena, Manuel

Final Work Degree

Tutora: D^a. Isidora Sanz Berzosa
Co-tutora: D^a. M^a Pilar Santamarina Siurana

Made in: Valencia
Date: November, 2015

Resumen:

Essential oils have shown antibacterial and antifungal properties in diverse studies. This paper explores the chemical composition of commercial essential oils of *Lavandula angustifolia* and *Thymus zygis* by Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC-MS). Antifungal activity has been subsequently evaluated.

Fungal contamination of agricultural products is a chronic problem and leads to the decrease of crops and food in both quantity and quality: only phytopathogenic fungi cause a loss of about 20% of the greatest economic importance crops and foods. This paper evaluates the antifungal ability of commercial essential oils of thyme (*Thymus zygis*) and lavender (*Lavandula angustifolia*) on phytopathogenic and post-harvest fungi *Alternaria alternata* (AA), *Bipolaris spicifera* (BS), *Rhizoctonia solani* (RS), *Colletotrichum gloeosporoides* (CG), *Curvularia hawaiiensis* (CH), *Fusarium oxysporum lycopersici* (FOL), *Fusarium equiseti* (FE), *Fusarium graminearum* (FG), *Penicillium expansum* (PE), *Penicillium italicum* (PI) that cause the deterioration of agricultural products and even some of them produce mycotoxins, in order to obtain a respectful and low-risk botanical biofungicide with the environment.

‘*In vitro*’ antifungal activity of essential oils was evaluated following the methodology of modified Singh et al., (2008). These bioassays were conducted at doses of 200 µg/mL and 300 µg/mL.

The results were expected. Values such as the Miceliar Growth Inhibition (MGI) reflect the satisfactory result obtained. MGI for thyme was almost 100% for 300 µg/mL, and at 200 µg/mL, this value decreases although its percentage is still high. Lavender essential oil did not show any significant inhibition data.

In this study it gets highlighted the great potential of thyme essential oil in fungi control and it is shown as a solid alternative to agrochemicals.

Key Words: Thymus, Lavender, Antifungal activity, Thymol

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a Pilar y Pepa, mis guías durante gran parte del trabajo. Por transmitirme tanta pasión por su trabajo, por haberme ayudado en todo, por su gran dedicación y apoyo para que todo saliese a la perfección, y, sobre todo, por su confianza en mí. Gracias de todo corazón.

En segundo lugar, a Isidora, por darme la oportunidad de realizar este trabajo.

A mis compañeros y amigos, por su ayuda y consejos siempre que los he necesitado. También por su paciencia cuando las cosas no salían bien.

A toda mi familia, en especial a mis padres, por su gran apoyo. Por aguantarme en mis malos días y por confiar desde el primer momento en que todo tendría un buen final.

A mi hermano y su pen drive, que tantos dolores de cabeza me ha dado.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción y ecología de las especies	2
1.1.1 Lavandas y espliegos.....	2
1.1.2 Tomillos.....	4
1.2 Aceites esenciales	5
1.2.1 Propiedades antibacterianas y antifúngicas de los aceites esenciales.....	6
1.2.2 Aceite esencial de lavanda.....	6
1.2.3 Aceite esencial de tomillo	7
1.3 Los hongos	7
1.3.1 Características generales	7
1.3.2 Género <i>Fusarium</i>	8
1.3.3 Género <i>Penicillium</i>	9
1.3.4 Género <i>Rhizoctonia</i>	11
1.3.5 Género <i>Alternaria</i>	12
1.3.6 Género <i>Bipolaris</i>	12
1.3.7 Género <i>Colletotrichum</i>	13
1.3.8 Género <i>Curvularia</i>	14
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL Y MÉTODOS	
3.1 Caracterización química de los aceites esenciales.....	16
3.1.1 Aceites esenciales.....	16
3.1.2 Identificación de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales por cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).....	16
3.1.3.1 Análisis cuantitativo	17
3.1.3.2 Análisis cualitativo	18

3.2 Determinación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales.....	18
3.2.1 Hongos.....	18
3.2.2 Determinación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales. Cálculo de la inhibición del crecimiento micelar (MGI)	18
3.2.3 Análisis estadístico.....	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Caracterización química de los aceites esenciales.....	20
4.2 Determinación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales. Cálculo de la inhibición del crecimiento micelar (MGI)	22
4.3 Análisis estadístico	35
4.4 Discusión.....	37
5. CONCLUSIONES	38
6. BIBLIOGRAFÍA	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Lavandula angustifolia</i>	3
Figura 2. <i>Thymus zygis</i>	5
Figura 3. Estructuras morfológicas en <i>Fusarium</i>	9
Figura 4. Estructuras morfológicas en <i>Penicillium</i>	10
Figura 5. Estructuras morfológicas en <i>Rhizoctonia</i> . a) Hifa b) Basidio y esporas c) Hifas de esclerocios	11
Figura 6. Conidióforos y conidios septados en <i>Alternaria</i>	12
Figura 7. Conidióforos y conidios en <i>Bipolaris</i>	13
Figura 8. Conidios y apresoria de especies de <i>Colletotrichum</i> . a) <i>C. coccodes</i> ; b) <i>C. crassipes</i> ; c) <i>C. dematium</i> ; d) <i>C. gloeosporioides</i> ; e) <i>C. graminicola</i>	14
Figura 9. Conidióforos y conidios en <i>Curvularia</i>	14
Figura 10. Diagrama de un cromatógrafo de gases	16
Figura 11. Representación gráfica del MGI (%) para concentración de 300 µg/mL y 200 µg/mL en cada especie para lavanda.	23
Figura 12. Representación gráfica del MGI (%) para concentración de 300 µg/mL y 200 µg/mL en cada especie para tomillo.	24
Figura 13. Crecimiento de RS en PDA (control) y en PDA con los aceites esenciales de lavanda y tomillo a las dosis de 200 µg/mL y 300 µg/mL, a los 7 días de incubación.	25
Figura 14. Crecimiento de FE en PDA (control) y en PDA con los aceites esenciales de lavanda y tomillo a las dosis de 200 µg/mL y 300 µg/mL, a los 7 días de incubación.	26
Figura 15. Crecimiento de BS en PDA (control) y en PDA con los aceites esenciales de lavanda y tomillo a las dosis de 200 µg/mL y 300 µg/mL, a los 7 días de incubación.	27
Figura 16. Crecimiento de PI en PDA (control) y en PDA con los aceites esenciales de lavanda y tomillo a las dosis de 200 µg/mL y 300 µg/mL, a los 7 días de incubación.	28
Figura 17. Crecimiento de PE en PDA (control) y en PDA con los aceites esenciales de lavanda y tomillo a las dosis de 200 µg/mL y 300 µg/mL, a los 7 días de incubación.	29

Figura 18. *Crecimiento de FOL en PDA (control) y en PDA con los aceites esenciales de lavanda y tomillo a las dosis de 200 µg/mL y 300 µg/mL, a los 7 días de incubación.30*

Figura 19. *Crecimiento de FG en PDA (control) y en PDA con los aceites esenciales de lavanda y tomillo a las dosis de 200 µg/mL y 300 µg/mL, a los 7 días de incubación.31*

Figura 20. *Crecimiento de CH en PDA (control) y en PDA con los aceites esenciales de lavanda y tomillo a las dosis de 200 µg/mL y 300 µg/mL, a los 7 días de incubación.32*

Figura 21. *Crecimiento de AA en PDA (control) y en los medios con los aceites esenciales de lavanda y tomillo a las dosis de 200 µg/mL y 300 µg/mL, a los 7 días de incubación33*

Figura 22. *Crecimiento de CG en PDA (control) y en los medios con los aceites esenciales de lavanda y tomillo a las dosis de 200 µg/mL y 300 µg/mL, a los 7 días de incubación34*

Figura 23. *Representación gráfica Intervalo Tukey HSD para la lavanda.35*

Figura 24. *Representación gráfica Intervalo Tukey HSD para el tomillo.36*

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Algunas micotoxinas producidas por el género Fusarium y los alimentos implicados.....</i>	9
Tabla 2. <i>Algunas micotoxinas producidas por el género Penicillium y los alimentos implicados..</i>	10
Tabla 3. <i>Composición química del aceite esencial de Lavandula angustifolia y Thymus zygis. Compuestos en orden de elución en columna HP-1 (trazas > 0,05).....</i>	21
Tabla 4. <i>Crecimiento medio (mm) de los distintos hongos ensayados para cada medio y concentración a los 7 días de incubación.....</i>	22
Tabla 5. <i>Cálculo del MGI en cada especie para el medio de cultivo PDA con lavanda.....</i>	23
Tabla 6. <i>Cálculo del MGI para cada especie en el medio de cultivo PDA con tomillo</i>	24
Tabla 7. <i>ANOVA del crecimiento de las especies tratadas con el aceite esencial de tomillo; significancia de los factores especie y tratamiento y sus interacciones.....</i>	36

1. INTRODUCCIÓN

Hasta hace poco tiempo los aceites esenciales procedentes de plantas aromáticas se obtenían en su totalidad de la flora espontánea existente en nuestros montes y como producto secundario de éstos. Junto a este aprovechamiento se utilizaba, y aún se hace, esta flora para la obtención de productos derivados de la apicultura (miel, polen, etc.), a través del establecimiento de colmenas en aquellas zonas ricas en especies melíferas y adecuadas para este fin.

La industrialización del país, la mecanización del campo y el consiguiente aumento del nivel de vida, provocan una fuerte emigración de la población rural. Esta emigración, que aumenta en las zonas más deprimidas y que suelen ser, en general, las de mayor riqueza florística, lleva consigo, entre otras muchas cosas, una disminución en el aprovechamiento de esta flora. Una muestra de ello es que en el año 1975 se exportara la mitad de aceite esencial de espliego que en el año 1970.

Debido a este retroceso en la obtención de aceites esenciales de la flora espontánea y a la existencia de tierras marginales y cerealistas abandonadas con motivo de la propia emigración, se incrementó el número de plantaciones de algunas especies de aromáticas (espliego, lavandín, etc.), influidos, en gran parte, por la evolución de estos cultivos en nuestro país vecino, Francia, y por otras que, habiendo trabajado en esta actividad en dicho país, trajeron sus técnicas aplicándolas a las nuevas plantaciones.

Posteriormente se ha demostrado la mayor rentabilidad de estos cultivos, en ciertas zonas, en relación con el cereal, así como en relación con la explotación de la flora espontánea, independiente de que en este último caso la recolección sea manual y la destilación se haga por procedimientos primitivos.

Estas circunstancias, junto a la posibilidad de mecanizar las labores de cultivo y de recolección y de conseguir mayor rendimiento y calidad en aceite con los nuevos sistemas de destilación, han motivado que en los últimos años se produzca un incremento en el número de hectáreas dedicadas a estos cultivos, lo que lleva consigo una necesidad imperiosa de suministrarse de plantas de vivero en forma y precio asequibles al agricultor (Adena, 1996, Fernández, 2006).

Por estos motivos, desde las últimas décadas del siglo XX se ha incrementado el interés en la búsqueda de alternativas más seguras que permitan mitigar el impacto negativo de agroquímicos de baja especificidad. Una estrategia que ha resultado satisfactoria para reducir la utilización de agroquímicos costosos y potencialmente dañinos y peligrosos, ha sido el manejo integrado de plagas, mejor conocido como MIP, y dentro de esta opción, la utilización de sustancias de origen natural, consideradas más seguras para la salud humana y el medio ambiente, y más aceptadas por los consumidores (Kotan et al., 2008; Legendre et al., 2012).

Las plantas aromáticas han sido ampliamente utilizadas para extender la vida útil de los alimentos, así como en medicina popular, debido a las propiedades de los aceites esenciales que éstas contienen como producto de su metabolismo secundario (Kokkini et al., 2012). Son numerosos los estudios que se han llevado a cabo para determinar las actividades antifúngicas y antibacterianas de los aceites esenciales de plantas contra patógenos del suelo, patógenos de plantas, insectos nocivos, hongos que causan infecciones cutáneas superficiales en humanos, y hongos que ocasionan el deterioro de los alimentos en el almacenamiento (Trupo et al., 2010; Werneck Vieira et al., 2014).

1.1 Descripción y ecología de las especies

1.1.1 Lavandas y espliegos

Se denomina con el término “Lavandas” a un conjunto de especies pertenecientes al género *Lavandula*, que se cultivan para la obtención de esencia por destilación de sus inflorescencias, aceite esencial que se emplea para obtener el perfume de “lavandas” conocido desde tiempos remotos. Consta de 39 especies y con una distribución amplia: desde la región macaronésica, por toda la cuenca mediterránea y, de manera dispersa, por la mitad N de África, la península Arábiga y el S de Asia hasta la India. En Francia, la flora natural del sudeste es muy rica en lavandas dado que se satisfacen ciertas condiciones ecológicas. Las lavandas comienzan a ser producidas en Francia a principios del siglo XX en distintas comarcas (Bajo Alpes, Altos Alpes Drome y Vauclese). Las más utilizadas son el espliego (*L. angustifolia*, *L. latifolia*) y los lavandines de origen híbrido (abrial, super, grosso) y, en menor medida, *L. dentata*, *L. stoechas* y *L. pedunculata* (Curioni y Arizio, 2006; Flora Ibérica, 2010).

Estas especies pertenecen a la familia de las Lamiáceas o labiadas, las cuales poseen en sus tejidos epidérmicos y caulinares, glándulas secretoras de aceites esenciales aromáticos, a menudo la planta está cubierta de pelos y glándulas conteniendo los aceites.

Plantas sufruticosas (tallo central leñoso solo en su parte inferior), perennes. Tallos de sección cuadrangular, generalmente muy foliosos en la parte inferior. Hojas de estrechamente lanceoladas a anchamente elípticas, enteras, dentadas o varias veces divididas, con pelos simples, ramificados y glandulíferos. Inflorescencia espiciforme, formada por verticilastros moderadamente próximos, con frecuencia con largos escapos. Brácteas diferentes de las hojas, frecuentemente coloreadas, las superiores, a veces, muy diferentes y sobresalientes en penacho o corona. Corola bilabiada, color lila, azul o violeta, raramente blanco; labio superior con 2 lóbulos; labio inferior con 3 lóbulos, todos de tamaño parecido. Estambres 4, didínamos, los superiores más cortos, en general no sobresalientes del tubo (Flora Ibérica, 2010).

En el presente trabajo se ha utilizado la especie *Lavandula angustifolia* la cual se detalla a continuación:

Lavandula angustifolia presenta tallos generalmente con cantos rodados color pajizo, a veces con una estría que discurre por la mitad de las caras, con pelos estrellados. Hojas de 23-57 x 2,2-4,5(6) mm, lanceoladas, agudas, enteras, las de los tallos floríferos mayores, verdes, poco pelosas, con el nervio central sobresaliente por el envés, en forma de T (Flora Ibérica, 2010).

La lavanda en invierno soporta picos de -15 a -18°C y en verano elevadas temperaturas de 30-35°C a la sombra. En veranos cálidos y secos los rendimientos son menores pero la esencia es de mejor calidad. Se la puede encontrar a diversas altitudes, en valles y laderas rocosas; por lo general, por encima de los 900 metros sobre el nivel del mar y hasta los 1500 metros, las grandes plantaciones se encuentran entre los 700 y 1.000 metros, a medida que sube la altura es mayor la calidad, la finura y la complejidad olfativa de los ésteres. Los requerimientos hídricos de esta especie son de 500 mm, pero inferiores a 1.100 mm por año y la distribución de las mismas tiene mucha importancia. Las lluvias oportunas, son las de invierno y primavera, mientras que son contraproducentes largos períodos de lluvias en verano, sobre todo en época de floración dado que harían bajar los rendimientos en esencia. En relación con la humedad ambiental óptima se sitúa entre un 40 y 50%. El viento es un factor incidente de importancia para los contenidos en aceites esenciales ya que los mejores extractos de lavanda se destilan en los valles de los Alpes, castigados por fuertes vientos. Tanto la mayor exposición al sol como la longitud del día en el verano incrementan los rendimientos y producción de aceites esenciales, el rendimiento en esencia aumenta proporcionalmente con la mayor exposición al sol y las horas de luz. Estas

condiciones de producción favorecen una mayor riqueza de ésteres, recalcando que también está asociada con la altitud (Curioni y Arizio, 2006).

En cuanto a suelos es poco exigente, las plantas espontáneas crecen en suelos muy pobres en materia orgánica, pedregosos y con buen drenaje, no obstante, si bien prospera en diversos suelos despliega su potencial en suelos sueltos, sílico –calcáreos, no ácidos. En terrenos húmedos o con capas freáticas superficiales prospera con dificultad y es muy propensa a sufrir enfermedades en las raíces.

La recolección de lavanda se realiza a partir del segundo año de floración, entre los meses de junio y septiembre. Se debe cortar la flor en días secos y no en días lluviosos o después de la lluvia.

Numerosas especies del género *Lavandula* han mostrado actividad biológica (Haigh et al., 2009). Se han descrito las propiedades antimicrobianas (Romeo et al., 2008; Roller et al., 2009), antifúngicas y antiparásitas (Moon et al., 2006-2007) e insecticidas (Papachristos y Stamopoulos, 2004; Pavela, 2005) de los aceites esenciales de las mismas.

En España se cultivan aproximadamente unas 2400 ha, aunque es muy difícil cuantificar la producción exacta, al ser un sector muy complejo, y se puede hablar de planta viva para su cultivo como ornamental, o de partes de la planta para su consumo como condimentaria y en las diferentes y variadas industrias como cosmética, perfumería, farmacéutica, medicinal, apicultura, extractos, aceites esenciales, etc. En cuanto a las comunidades autónomas de las que se tienen datos de producción son, en orden creciente de superficie cultivada: Castilla la Mancha, Murcia, Castilla y León, Comunidad Valenciana, Andalucía e Islas Canarias. Castilla la Mancha es la principal comunidad productora con un 52,15% de superficie cultivada del total de España (MAGRAMA, 2007).

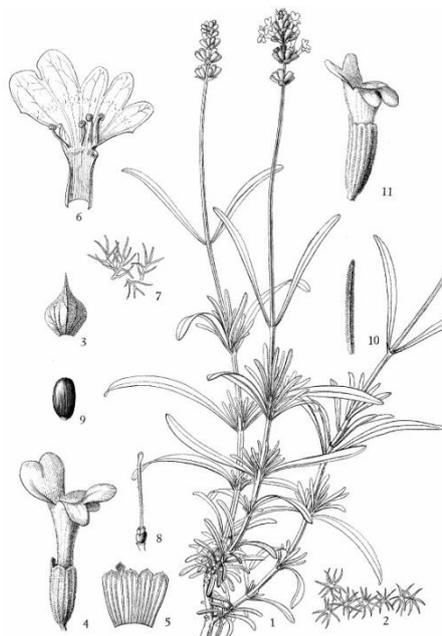


Figura 1. *Lavandula angustifolia*. Fuente: (Flora of china, 1994)

1.1.2 Tomillos

El género *Thymus* contiene unas 220 especies de hierbas perennes aromáticas y sub-arbustos de hasta 40 cm de alto, pertenecientes a la familia Labiadas (Flora Ibérica, 2010).

Thymus es un género bien representado en la cuenca Mediterránea sus especies crecen entre los 0 y los 600 m sobre el nivel del mar y se encuentra ampliamente distribuida en el sur de Italia (Miceli et al., 2006). Se halla típicamente en las garrigas, laderas secas y bosques de pino Mediterráneo, considerándose un buen indicador del área seca Mediterránea. Sus especies se hibridan fácilmente allí donde conviven, especialmente las de mismo número cromosómico (Pignatti, 1982).

Son plantas sufruticosas, perennes, erectas o decumbentes, a veces cespitosas, generalmente aromáticas. Tallos de sección cuadrangular o redondeada, generalmente pelosos, con indumento en disposición regular en todas las caras, o bien en caras opuestas y alternas en cada entrenudo, o bien solo en los cantos, medianos. Hojas enteras, planas, elípticas, ovadas, lanceoladas y con glándulas esenciales esferoidales en su superficie. La inflorescencia está formada por verticilastros más o menos densos y son en forma de espigas terminales. Brácteas similares a las hojas, anchas, coloreadas. Flores generalmente pediceladas, hermafroditas o femeninas, aromáticas, de color blancas a violetas, entre 5 y 8 mm de longitud. Caliz y corola bilabiados. Estambres generalmente exsertos, a veces sin ellos. Su fruto es un aquenio (Flora Ibérica, 2010).

En el presente trabajo se ha utilizado la especie *Thymus zygis*, la cual se detalla a continuación:

La especie *Thymus zygis* se caracteriza por sus tallos ascendentes, generalmente rojizos, con pelos cortos. Sus hojas de 4,5-9 x 0,6-1 mm, lineares, con cilios muy llamativos en la base, con glándulas esferoidales densas, generalmente rojizas. La inflorescencia espiciforme (Flora Ibérica, 2010).

Vegetarán mejor siempre que se encuentren en lugares soleados. En climas fríos puede necesitar protección contra las heladas. Riegos escasos, el exceso de humedad es muy perjudicial, aunque de manera más abundante en la época del año en la que hace más calor debido a que está expuesta a temperaturas muy altas. Aguanta bien la sequía. No precisa de ningún abono especial. Con demasiado nitrógeno no resisten las heladas, ya que las plantas están sometidas a un crecimiento forzado.

Tiene cierta preferencia por los suelos calcáreos. Tiene muchas aplicaciones y usos, entre los que merecen destacar los medicinales: está indicada por su acción estimulante de la circulación sanguínea, para las afecciones respiratorias, contra la tos convulsiva, así como para deshacerse de los gusanos intestinales; se aplica generalmente en forma de infusión, para la que se utilizan las flores (Ceballos, 1998).

Han sido descritas diferentes actividades biológicas de los aceites esenciales, como antimicrobiano (Bounatirou et al., 2007; Ebrahimi et al., 2008), antifúngico (Iacomí et al., 2013) y antioxidante (Bounatirou et al., 2007; Al-Mustafa y Al-Thunibat, 2008).

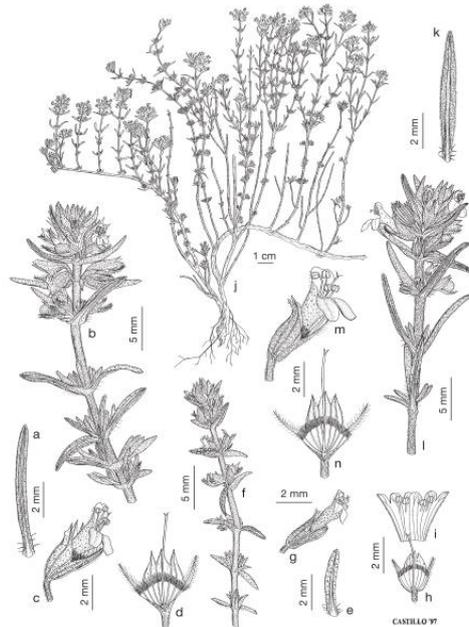


Figura 2. *Thymus zygis*. Fuente: (Flora Ibérica, 2010)

1.2 Aceites esenciales

Son compuestos naturales complejos, volátiles sintetizados por las plantas aromáticas. Estos líquidos aromáticos se obtienen de diferentes órganos de la planta: flores, raíces, hojas, tallos, frutos, semillas, etc. Pueden ser obtenidos por presión, fermentación, o extracción, pero el método más común para la producción comercial es el de destilación por vapor.

Se conocen alrededor de unos 3000 aceites esenciales, de los cuales unos 300 son los más importantes comercialmente, destinados para el mercado de condimentos y fragancias (Burt, 2004).

Se caracterizan por un olor fuerte y son sintetizados por las plantas aromáticas como metabolitos secundarios. En la naturaleza juegan un papel importante en la protección de las plantas como antibacterianos, antivirales, antifúngicos, insecticidas y también frente a herbívoros mediante la reducción de su apetito por tales plantas (Bakkali et al., 2008).

Juegan un papel ecológico importante, ya que están envueltos en las interacciones entre las plantas, inhiben o estimulan la germinación de otras especies vegetales, también representan una defensa contra herbívoros, insectos, hongos y patógenos (Blázquez, 2014).

1.2.1 Propiedades antibacterianas y antifúngicas de los aceites esenciales

Desde hace mucho tiempo se han reconocido las propiedades antibacterianas de algunos aceites esenciales. Además de propiedades antibacterianas, los aceites o sus componentes han mostrado también propiedades antivíricas, antifúngicas, herbicidas e insecticidas.

La capacidad antifúngica y antibacteriana de los aceites esenciales de muchas especies de plantas han sido probadas por diferentes autores (Burt, 2004; El Bouzidi et al., 2012; Blázquez, 2014).

Existen numerosos estudios que revelan la actividad antimicrobiana, aunque no todos presentan la misma actividad y ésta dependería de sus componentes. En este sentido, Fisher y Phillips (2006) estudiaron la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de limón, naranja dulce y bergamota y de sus componentes principales.

Por otro lado, la actividad antimicrobiana de los aceites de pimienta negra, clavo, orégano, geranio, nuez moscada y tomillo fue examinada por Dorman y Deans (2000), quienes además determinaron los componentes volátiles que podrían contribuir a su actividad. El aceite con un gran espectro de acción fue el de tomillo, seguido de orégano, clavo, nuez moscada, pimienta negra y geranio. La actividad de los aceites estaría relacionada con la composición de los volátiles de los aceites de las plantas y sus grupos funcionales, y una posible interacción sinérgica entre sus componentes. Los componentes con estructura fenólica como el carvacrol, el eugenol y el timol, fueron muy efectivos frente a los microorganismos.

A pesar de los beneficios que puede suponer el empleo de determinados aceites esenciales en el aumento de la vida útil de los productos mínimamente procesados, junto con la mejora en su actividad antioxidante, su uso también puede aportar a los mismos, sabores y aromas extraños, lo cual puede limitar su aplicación (Almela, 2012).

La aplicación de aceites esenciales es un método muy atractivo para controlar enfermedades tanto en cosecha como en post-cosecha. Estos materiales son una mezcla compleja de compuestos volátiles producidos en diferentes partes de las plantas, y han sido reconocidos por poseer diversas funciones, incluyendo conferir la resistencia a plagas y enfermedades (Duke, 2009); algunos aceites esenciales, así como sus constituyentes, han demostrado poseer propiedades antibacterianas y antifúngicas (Da Silveira et al., 2014; Taheri et al., 2015; Santamarina et al., 2015).

1.2.2 Aceite esencial de lavanda

El constituyente principal del aceite de lavanda es el “linalol”, en estado libre, del 30 al 40% y bajo la forma de compuesto en los ácidos acético, butírico, valerianico y caproico. Se comprueba además la presencia de linoleno, alfa – pineno, cariofileno, geraniol, nerol y cineol, ésteres en pequeña proporción. Es decir, que posee abundancia de ésteres y carencia de alcanfor.

El aceite de lavanda, según la farmacopea, procede de *Lávandula angustifolia*, mientras que los aceites procedentes de los híbridos, también utilizados, son conocidos entre los destiladores como aceite esencial de lavandín. Las hojas y sumidades floridas de la lavanda, contienen 1% de derivados térpenicos, ácido ursólico; cumarina y herniarina en forma de glucósido: ácido rosmarínico y picrosalvina.

Los aceites esenciales puros de *Lavandula angustifolia* se utilizan en perfumería, cosmética, así como por sus propiedades antimicrobianas y gastrointestinales. Estos aceites se caracterizan por un elevado nivel de linalol y acetato de linalilo. La cantidad de 1,8-cineol y alcanfor a menudo varía entre muy baja a moderada (Kister et al., 2014).

1.2.3 Aceite esencial de tomillo

El aceite esencial de tomillo, *Thymus vulgaris*, presenta como componente mayoritario el timol y en algunas variedades su composición puede alcanzar valores hasta del 80% (Wianowska et al., 2009). Se comprueba además la presencia de carvacrol, gamma-terpineno y p-cimeno (precursor del timol). Tanto los aceites esenciales obtenidos de las especies de *Thymus*, como el timol, han sido reconocidos por su actividad antibacteriana y antifúngica, razón por la cual se emplean industrialmente en la preparación de desinfectantes de uso humano, enjuagues bucales y otros agentes antimicrobianos utilizados a nivel doméstico (Winward et al., 2008; Klein et al., 2013).

1.3 Los hongos

1.3.1 Características generales

Los hongos son un grupo muy amplio y diverso que incluye levaduras, mohos y hongos carnosos. Son heterótrofos y necesitan compuestos orgánicos como fuente de energía y de carbono. La mayoría son saprófitos y obtienen los nutrientes por descomposición de la materia orgánica muerta, otros son parásitos, viven en el interior o sobre vegetales, animales y humanos, causando enfermedades. La mayoría viven como saprófitos en el suelo y agua, donde descomponen principalmente materia vegetal. Son organismos eucarióticos que se reproducen por medio de esporas y que no pueden realizar la fotosíntesis ya que están desprovistos de clorofila.

Los hongos causan la mayoría de las enfermedades conocidas de plantas, constituyen la base de procesos industriales en los que interviene la fermentación (elaboración de pan, vinos, cervezas) y son responsables de la fabricación de varios antibióticos (Mader y Windelspecht, 2013).

Los hongos se han considerado destructivos y beneficiosos para la agricultura. Por una parte, son los descomponedores primarios de materiales orgánicos, contribuyendo de forma significativa a la descomposición de la materia orgánica y al reciclado de nutrientes, pero por otro lado son responsables de los daños que afectan a las cosechas a través de las enfermedades que provocan en plantas. La contaminación fúngica de los productos agrícolas es un problema crónico y conlleva la disminución en cantidad y calidad de las cosechas y por tanto de los alimentos. También los hongos pueden degradar productos que son útiles para la economía humana, por ejemplo, los productos alimentarios cuando se almacenan mal, frecuentemente están expuestos al biodeterioro por hongos, con el resultado de que sus cualidades como alimentos se ven disminuidas. Además, los hongos con frecuencia producen compuestos tóxicos cuando crecen

sobre alimentos almacenados. Estos compuestos tóxicos reciben el nombre de micotoxinas. Las micotoxinas son compuestos que tienen lugar cuando la fase de crecimiento llega a su etapa final y durante la fase estacionaria. Son moléculas relativamente pequeñas que pueden contaminar alimentos, piensos, o materias primas utilizadas para su elaboración, originando un grupo de enfermedades y trastornos, denominados micotoxicosis, y que resultan tóxicas para el hombre o los animales. Sólo los hongos fitopatógenos provocan una pérdida de cerca del 20% de los principales alimentos y cultivos de mayor importancia económica (Santamarina et al., 1997; Agrios, 2004).

1.3.2 Género *Fusarium*

Fusarium es un extenso género de hongos filamentosos ampliamente distribuido en el suelo y en plantas. Presenta especies fitopatógenas, la mayoría de ellas son saprófitas y relativamente abundantes en la microbiota del suelo, que causan graves enfermedades principalmente en los cereales, aunque también puede afectar a otros vegetales y frutas. Su importancia no se debe tan solo a la pérdida de las cosechas, sino también a la producción de micotoxinas. Estas micotoxinas pueden estar presentes en los cereales y sus productos, ocasionando síndromes de intoxicación en animales y llegando a la cadena alimenticia de los humanos. Se considera que *Fusarium* es el género productor de toxinas de mayor prevalencia en las regiones templadas de hemisferio norte (Soriano del Castillo, 2007).

Las toxinas más comunes originadas por especies del género *Fusarium* son los tricotecenos, la zearalenona, la moniliformina y las fumonisinas. Estos metabolitos se pueden sintetizar tanto durante el cultivo de la planta como durante el almacenamiento (Soriano del Castillo, 2007).

Los miembros del género *Fusarium* producen típicamente dos tipos de conidios, que reciben la denominación de macroconidios y microconidios, debido a sus tamaños respectivos. Ambos tipos son producidos a partir de las fiálides. Tanto la formación de conidios como de fiálides tiene lugar en el interior de unas falsas cabezas que finalmente se rompen liberándolos (Sempere, 2009).

Los macroconidios son estructuras largas, multiseptadas, en forma de media luna o de canoa, que por lo general están ubicadas en los esporodocios. Los microconidios, pequeños, suelen ser unicelulares y de forma esférica u ovalada. Es también frecuente encontrar conidios que parecen intermedios entre los microconidios y macroconidios.

Doohan et al. (2003) observaron que entre los factores más importantes que influyen en las enfermedades producidas por las especies del género *Fusarium* en cereales se encuentran la temperatura y la humedad. Algunos autores ya señalaron la importancia de estos dos parámetros medioambientales en especies de este género y demostraron su influencia en la germinación, crecimiento y producción de micotoxinas (Miedaner y Perkowski, 1996; Llorens et al., 2004).

Tabla 1. Algunas micotoxinas producidas por el género *Fusarium* y los alimentos implicados.
Fuente: (Soriano del Castillo, 2007; Pitt y Hocking, 2009).

Micotoxina	Alimentos implicados
Beauvericina	Maíz
Butenólido	Cebada, Trigo
Diacetoxiscirpenol	Avena, Cebada, Cerveza, Curry, Judía, Maíz, Trigo
Fusarocromanona	Arroz, Cebada, Guisante, Patata, Pienso
Monoacetoxiscirpenol	Altramuz, Avena, Guisante, Harina de soja, Maíz, Patata, Pimiento, Tomate
Neosolaniol	Avena, Cebada, Guisante, Curry, Jengibre, Maíz, Patata, Pimiento, Tomate, Trigo
Tricotecenos	Trigo
Zeralenona	Cebada, Mijo
Moniliformina	Remolacha azucarera
Fumonisinás	Soja, Sorgo, Triticale

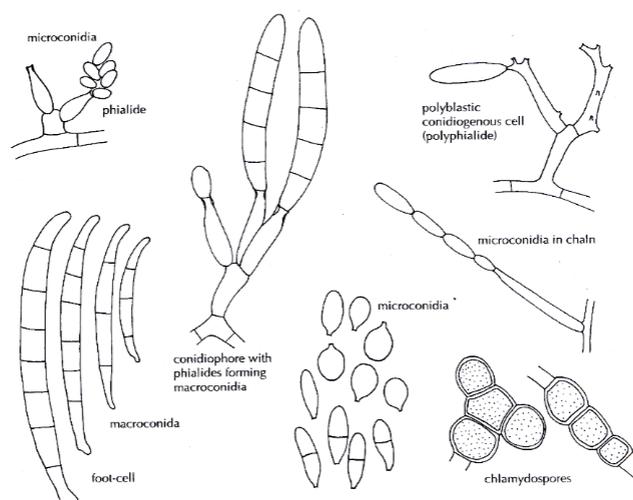


Figura 3. Estructuras morfológicas en *Fusarium*. Fuente: (Samson et al., 2000)

1.3.3 Género *Penicillium*

Las colonias de *Penicillium* alcanzan un tamaño de 35-60 mm de diámetro en 10 días, son planas o estriadas radialmente, y con áreas centrales aterciopeladas o ligeramente algodonosas, de aspecto compacto a causa de la abundante producción de conidios, y con gotitas de exudado claro y brillante. El micelio es inconspicuo, de color blanco o amarillo claro en las áreas algodonosas, pero la superficie de crecimiento fundamental está coloreada de verde. El reverso de la colonia es amarillo claro, marrón o naranja. La producción de conidios es muy abundante, típica del género, y de color verde grisáceo.

Los conidióforos (penicilio o pincel) nacen de la superficie del micelio dando lugar a estructuras biverticiladas y asimétricas, y algunas veces presentan ramas adicionales.

El estipe, en general, de 200-400 μm de longitud, con delgadas y lisas, y con verticilos terminales característicos con 2-4 métulas de 10-15 (-30) μm de longitud. Fiálides de cilíndricas a lanceoladas con punta estrecha de 10-15 (-20) μm de longitud. Los conidios son elipsoidales, muy grandes (3,5-5,0) (-7) μm de longitud), y de pared lisa o ligeramente rugosa algunas veces (Samson et al 2000; Pitt y Hocking, 2009).

Tabla 2. Algunas micotoxinas producidas por el género *Penicillium* y los alimentos implicados.
Fuente: (Soriano del Castillo, 2007; Pitt y Hocking, 2009).

Micotoxina	Alimentos implicados
Ácido penicílico	Cebada, Centeno, Judía, Maíz, Manzana, Queso
Ácido secalónico D	Arroz, Cebada, Maíz, Soja, Sorgo, Trigo
Luteosquirina	Arroz, Yogur
Penitremos	Carne, Crema, Fruta, Huevos, Nuez, Queso
Roquefortina A,B,C y D	Queso, Ensilados
Rubratoxinas	Maíz, Trigo
Toxina islandi	Arroz
Patulina	Manzanas
Citrinina	Arroz, Trigo, Cebada, Maíz, Cacahuete, Pistacho

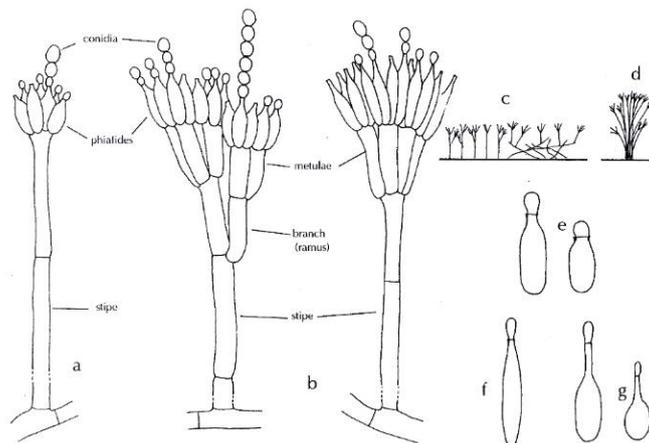


Figura 4. Estructuras morfológicas en *Penicillium*. Fuente: (Samson et al., 2000)

1.3.4 Género *Rhizoctonia*

Las colonias presentan un crecimiento rápido y poseen un micelio estéril (Mycelia Sterilia) que es incoloro en su etapa juvenil pero que se torna amarillo o de color café claro a medida que envejece.

El micelio está formado por hifas multinucleadas que se ramifican y crecen casi en ángulo recto con respecto a la hifa principal. Estas ramificaciones se estrechan, ligeramente, a nivel de bifurcación, y cerca de ella es donde aparece el septo de separación. Algunas hifas se dilatan adquiriendo un aspecto monilioide que posteriormente se oscurece. El tipo de ramificación es la única herramienta disponible para poder identificar al hongo. En determinadas condiciones, se originan ramilletes de células cortas, anchas, de forma oval o triangular y que se asemejan a esclerocios de color pardo oscuro y son de textura uniforme.

El género *Rhizoctonia* incluye microorganismos del suelo que ocasionan enfermedades graves en muchas plantas, ya que afecta a las raíces, tallos, tubérculos, cormos y otros órganos de las plantas que se desarrollan sobre el suelo.

Es uno de los géneros que producen las enfermedades conocidas como “podredumbres del tallo y raíces”. Estas enfermedades están ampliamente distribuidas y causan daños en la mayoría de las plantas anuales (malas hierbas), a casi todas las hortalizas y plantas de ornato, y a distintos cultivos como judía, remolacha, col y colza, patata y tomate (Agris, 2004).

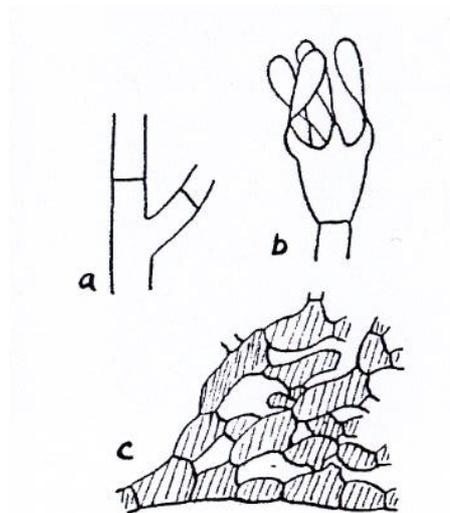


Figura 5. Estructuras morfológicas en *Rhizoctonia*. a) Hifa b) Basidio y esporas c) Hifas de esclerocios.
Fuente: (Gilman, 1957)

1.3.5 Género *Alternaria*

Las colonias en Agar Extracto de Malta (MEA) a 25°C alcanzan un diámetro de 6 cm en 7 días, de colores negro, negro-oliváceo o grisáceos. Conidióforos 1-3 septados, simples o a veces ramificados, rectos, flexuosos o a veces geniculados, con uno o varios poros apicales, de hasta 50 x 3-6 µm, marrón, de paredes lisas. Los conidios se agrupan en cadenas largas a menudo ramificadas, a veces ovoides o elipsoidales, frecuentemente con un pico cónico o cilíndrico corto, no excediendo de un tercio de la longitud conidial, 18-83 x 7-18 µm, con hasta 8 septos transversales y varios longitudinales, de color pálido a marrón, paredes lisas o verrugosa (Samson et al., 2000).

Presente en gran cantidad de cultivos, como cereales y hortícolas. Afecta a frutos de tomate en campo y en postcosecha, puede comportarse como oportunista o infectar por sí solo, y sus lesiones iniciales aumentan cubriendo el fruto con un moho negro (Solís et al., 2007).

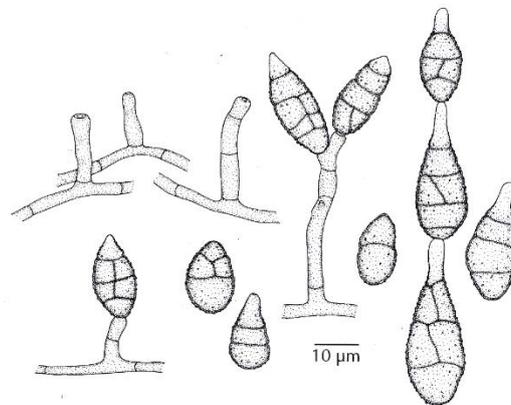


Figura 6. Conidióforos y conidios septados en *Alternaria*. Fuente: (Samson et al., 2000)

1.3.6 Género *Bipolaris*

Este género produce conidios largos, grandes, con tabiques transversales. Los tabiques son gruesos y muy diferentes de los de por ejemplo *Trichoconiella*. En *Drechslera*, los conidios son cilíndricos y germinan en cualquier célula, mientras que los conidios de *Bipolaris* y *Exserohilum* van poco a poco estrechándose y germinando solamente desde las células del extremo (germinación bipolar). En *Bipolaris*, los tubos germinales se desarrollan aproximadamente a lo largo de la línea del eje del conidio, en *Exserohilum*, el tubo de germinación a menudo se desvía del eje y se convierte en un ángulo.

Las colonias en MEA tienen un diámetro de 45-55 mm, micelio plano, profundamente flocoso, de color gris oscuro; el reverso de color marrón oscuro a azul oscuro casi negro.

Los conidios, 50-80 x 12-16 µm, con 6-9 septos discretos y con paredes gruesas, lisas y oscuras.

Este género ha sido aislado en semillas de maíz, sorgo, arroz y en algunas leguminosas. También se ha encontrado, en menor medida, en cacahuete, cebada o aguacate (Pitt y Hocking, 2009).

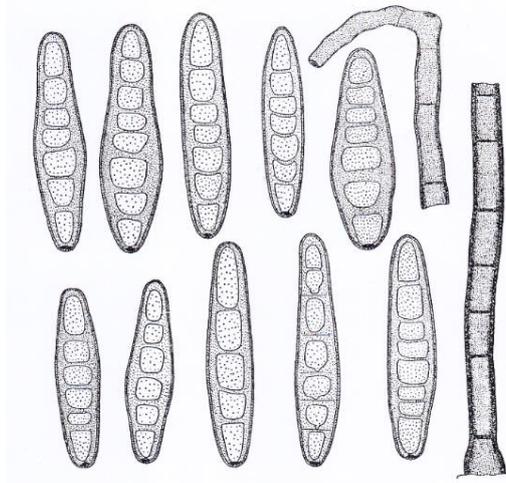


Figura 7. Conidióforos y conidios en *Bipolaris*. Fuente: (Ellis, 1976)

1.3.7 Género *Colletotrichum*

Colletotrichum es un género con muchas especies, extendidas como patógenos de plantas. En este género, los conidios nacen dentro de unos acérvulos, una estructura con más o menos una tapa cerrada, en la cual, eventualmente se producen rupturas. Los acérvulos se ven fácilmente en el agar de superficie a simple vista o por microscopio de pocos aumentos. Los conidios de *Colletotrichum* son unicelulares, hialinos y de colores llamativos. Pueden ser cilíndricos o puntiagudos, rectos o curvos.

En MEA, las colonias alcanzan los 60 mm de diámetro o más, a menudo cubriendo toda la placa Petri, con una densa capa basal de hifas y cuerpos de fructificación conidiales (acérvulos) superpuestos por áreas floccosas de micelio blanco, naranja o gris; los acérvulos alcanzan hasta 500 μm de largo, de color pálido, gris o naranja; el reverso con áreas grisáceas o naranja pálida. En 5°C, no hay crecimiento para germinación. No crecimiento a 37°C.

Estructuras reproductivas planas, tapadas por acérvulos, abertura irregular, que contiene una sola capa estrechamente empaquetada de fiálides de dimensiones irregulares; los conidios nacen por separado, cilíndricos, con extremos redondeados, no-septados, 12-18 x 3-3,5 μm , de pared hialina y lisa (Pitt y Hocking, 2009).

Es el principal género causante de antracnosis en la mayoría de los cultivos en el mundo, es uno de los principales problemas de tomates destinados a la industria de conservación, y causa manchas hundidas recubiertas de pústulas de color rosa, anaranjado o negruzco en frutos de tomate (Solís et al., 2007).

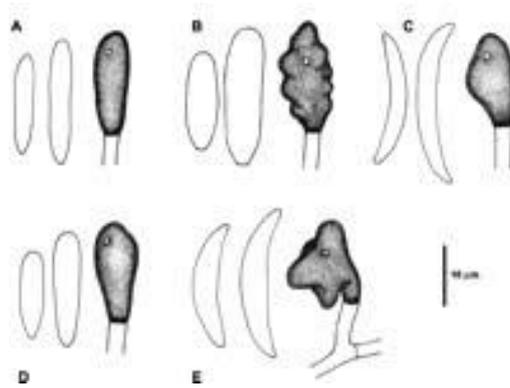


Figura 8. Conidios y apresoria de especies de *Colletotrichum*. a) *C. coccodes*; b) *C. crassipes*; c) *C. dematium*; d) *C. gloeosporioides*; e) *C. graminicola*. Fuente: (Cano et al, 2004).

1.3.8 Género *Curvularia*

Las colonias, en Agar Patata Dextrosa (PDA) presentan un crecimiento moderadamente rápido, alcanzando un diámetro de 3-4 cm dentro de una semana a 25°C, negro pardusco, aterciopeladas llegando a ser, a veces, ligeramente algodonosas. El reverso es de color marrón. Los conidióforos erectos, septados, pigmentados cada vez más cerca de la punta, a veces geniculados, hasta 600 μm de largo. 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 hialino en las células finales, 18-35(37) x 8-14 μm. Rango de temperatura de crecimiento óptima 24-30°C. La esporulación es realizada por la incubación bajo luz cerca de la UV (Samson et al., 2000).

Es, principalmente, invasor de plantas monocotiledóneas. Los alimentos más comunes dónde podemos encontrar éste género son los cereales, entre los que se encuentran el arroz, la cebada, el trigo, el maíz y el sorgo (Pitt y Hocking, 2009).

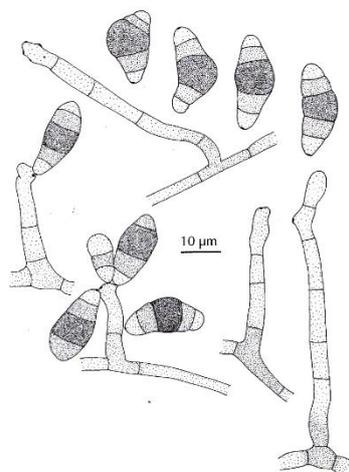


Figura 9. Conidióforos y conidios en *Curvularia*. Fuente: (Samson et al., 2000)

2. OBJETIVOS

En el presente trabajo se estudia la capacidad antifúngica de los aceites esenciales de las especies *Thymus zygis* y *Lavandula angustifolia*, a distintas dosis, sobre los hongos de campo y de post-cosecha *Alternaria alternata* (AA), *Bipolaris spicifera* (BS), *Rhizoctonia solani* (RS), *Colletotrichum gloeosporoides* (CG), *Curvularia hawaiiensis* (CH), *Fusarium oxysporum lycopersici* fsp. (FOL), *Fusarium equiseti* (FE), *Fusarium graminearum* (FG), *Penicillium expansum* (PE), *Penicillium italicum* (PI).

Para ello, se han planteado los siguientes objetivos:

1. Analizar la composición química de los aceites esenciales comerciales *Thymus zygis* y *Lavandula angustifolia*, suministrado por la casa “Plantis” Artesanía Agrícola, S.A. mediante cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS).
2. Conocer la actividad antifúngica “in vitro” de los aceites esenciales de *Thymus zygis* y *Lavandula angustifolia* a las dosis de 200 y 300 µg/mL frente a hongos fitopatógenos causantes de daños en los cultivos y de post-cosecha anteriormente mencionados.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Caracterización química de los aceites esenciales

3.1.1 Aceites esenciales

Respecto a los aceites esenciales comerciales fueron suministrados por la casa comercial “Plantis” Artesanía Agrícola, S.A. y con número de lote 214 en el caso de la *Lavandula angustifolia* y lote 024 en el caso del *Thymus zygis*. Todos ellos fueron extraídos de manera natural a través de la primera presión en frío, siendo la recolección en el momento óptimo y la extracción por destilación al vapor de agua, obteniéndose un aceite 100% natural. Para el caso de la lavanda, el aceite esencial fue extraído de sus flores y para el caso del tomillo, fue extraído del tallo, hojas y flores.

3.1.2 Identificación de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales por cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

La cromatografía de gases es una de las técnicas más versátiles y ubicuas en los laboratorios, y se usa mucho en la determinación de compuestos orgánicos. Con esta técnica se pueden separar mezclas muy complejas; cuando se acopla con la espectrometría de masas como sistema de detección, es posible la identificación virtualmente positiva de los eluidos con una muy alta sensibilidad, creando un sistema analítico muy poderoso.

En cromatografía de gases, la muestra pasa al estado de vapor inyectándola a un puerto calentado, y el eluyente es un gas. El factor más importante en la cromatografía de gases es la selección de la columna adecuada (fase estacionaria) para la separación particular sobre la que se desea experimentar.

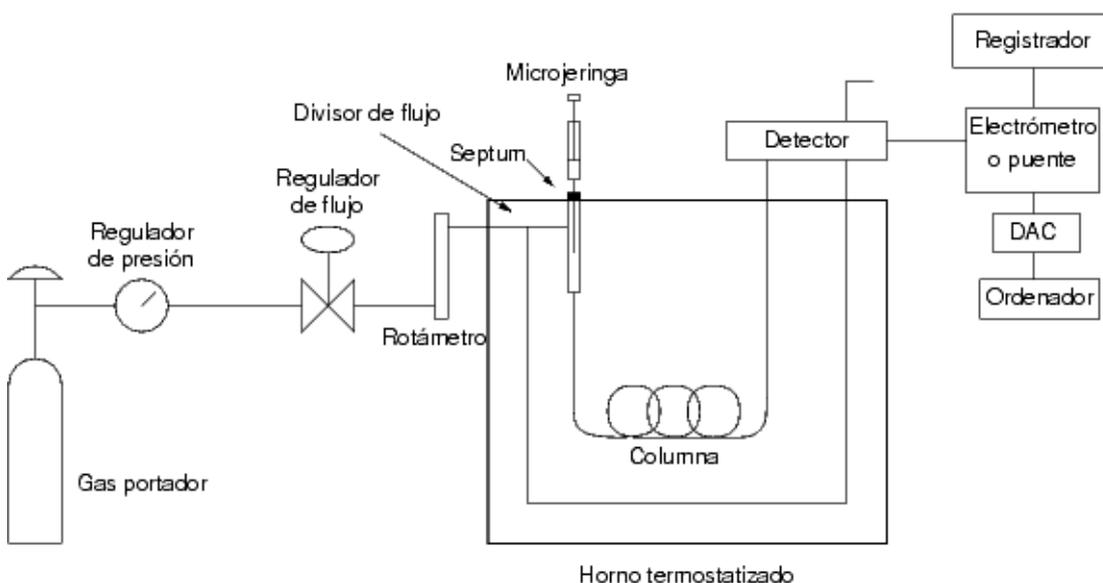


Figura 10. Diagrama de un cromatógrafo de gases

La muestra se inyecta rápidamente con una microjeringa hipodérmica a través de un tapón septum de goma de silicona y pasa a la columna. El puerto de inyección de muestra, la columna y el detector se calientan a temperaturas a las que la muestra tenga una presión de vapor mínima de 10 torr, usualmente a unos 50°C por arriba del punto en el que hierve el soluto con mayor alto punto de ebullición. El puerto de inyección y el detector se suelen mantener un poco más calientes que la columna para evaporar rápidamente la muestra líquida y evitar que ésta se condense en el detector.

La separación se efectúa a medida que los componentes del vapor se equilibran con el gas acarreador y la fase estacionaria. El gas acarreador es un gas químicamente inerte que debe encontrarse en forma pura, como argón, helio o nitrógeno. Un gas muy denso tiene mayor eficacia porque su difusividad es menor, pero un gas de baja densidad permite mayores velocidades.

3.1.3.1 Análisis cuantitativo

La cromatografía de gases fue realizada utilizando un cromatógrafo modelo Clarus 500GC Perkin-Elmer, equipado con un detector de ionización de llama (FID), una columna capilar Hewlett-Packard HP-1 (metil silicona) de 30 m de longitud, 0,2 mm de diámetro interno y 0,33 µm de espesor de película.

El programa de temperatura de la columna utilizado fue 60°C durante cinco minutos, con un gradiente de 3°C/min hasta llegar a 180°C, a continuación, se empleó un gradiente de 20°C/min hasta llegar a 280°C, manteniendo esta temperatura durante diez minutos.

El gas portador, fue helio a un flujo de 1 ml/min. El FID fue mantenido a una temperatura de 250°C y el inyector a 220°C.

Los índices de retención de Kovats, empleados para identificar los compuestos, fueron calculados usando una mezcla de hidrocarburos $C_8 - C_{32}$, que se cromatografió cuando se analizaron las muestras. Una vez obtenidos los tiempos de retención, expresados en minutos, de cada uno de los componentes del aceite esencial, se determinó el índice de Kovats a partir de la siguiente fórmula:

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

Siendo:

$n^{\circ} C HC_{n-1}$: número de carbonos del hidrocarburo anterior al compuesto

TRX: tiempo de retención del compuesto

TR HC_{n-1} : tiempo de retención del hidrocarburo anterior al compuesto

TR HC_{n+1} : tiempo de retención del hidrocarburo posterior al compuesto

3.1.3.2 Análisis cualitativo

La cromatografía de gases-espectrometría de masas se realizó con un aparato Varian Saturn 2000 equipado con una columna capilar Varian C.S. VA-5MS de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de película. El modo de inyección empleado fue en Split con una ratio de 1:25.

Los espectros de masas fueron obtenidos dentro de un rango de masas (m/z) de 28-400 u.m.a., con un voltaje de ionización de 70 eV.

Se usaron las mismas condiciones de trabajo que para el cromatógrafo de gases.

Junto con las muestras se cromatografió una mezcla de hidrocarburos $C_8 - C_{32}$ para calcular posteriormente los índices de retención de Kovats, de la forma descrita en el apartado anterior.

Los compuestos fueron identificados por su espectro de masas, confirmando su identidad con los índices de Kovats y comparando sus espectros de masas y sus tiempos de retención con otros de muestras patrón o con datos disponibles en la librería NIST 98 y en la literatura (Adams, 2007).

3.2 Determinación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales

3.2.1 Hongos

Los hongos utilizados en el presente trabajo fueron los siguientes: *Alternaria alternata* CECT 20923, *Bipolaris spicifera* CECT 2776, *Curvularia hawaiiensis* CECT 20934, *Fusarium equiseti* CECT 20925 y *Fusarium graminearum* CECT 20924. Se aislaron en el Laboratorio de Botánica del Departamento de Ecosistemas Agroforestales a partir de cariósides de arroz de la variedad Bomba, procedente de la albufera de Valencia. Los hongos se identificaron mediante métodos morfológicos y moleculares, y posteriormente se depositaron en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Rhizoctonia solani CECT 2819, *Colletotrichum gloeosporoides* CECT 20250, *Fusarium oxysporum lycopersici* CECT 2715, *Penicillium expansum* CECT 20906 y *Penicillium italicum* CECT 2294 fueron suministrados por la CECT.

3.2.2 Determinación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales. Cálculo de la inhibición del crecimiento micelial (MGI)

El aceite esencial fue disuelto, mezclado y homogeneizado por agitación en matraces con medio de cultivo PDA/Tween 20 (0.1%), previamente esterilizado, cuando aún está líquido, se adicionó a la concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$ y 200 $\mu\text{g/mL}$, y se repartió en cápsulas Petri de 90x15 mm y 150x15 mm.

El hongo se sembró a modo de explantes discoidales de 8 mm de diámetro tomados con un sacabocados de una colonia de siete días de desarrollo, y se colocaron en el centro de las cápsulas Petri conteniendo el aceite esencial. El experimento se incubó a 25°C durante 7 días. El crecimiento miceliar se evaluó midiendo a los 7 días dos diámetros perpendiculares de la colonia. Se realizaron diez repeticiones por tratamiento. Las cápsulas Petri control contenían únicamente PDA/Tween 20 (0.1%) y el hongo analizado.

La inhibición del crecimiento miceliar (MGI) se calculó el día 7 utilizando la siguiente fórmula (Albuquerque et al., 2006).

$$\text{MGI} = \frac{(\text{DC} - \text{DO})}{\text{DC}} \times 100$$

Donde DC es la media del diámetro de las colonias en placas no tratadas con aceite y DO es la media del diámetro de las colonias en placas tratadas con aceite esencial, ambos a día 7.

3.2.3 Análisis estadístico

Los resultados de crecimiento miceliar de los hongos ensayados se sometieron al análisis de la varianza (ANOVA). También se representaron los intervalos HSD de Tukey de comparación de medias de los factores simples, especie y tratamiento, y su interacción, con valores de significación de $P \leq 0,05$. El programa estadístico utilizado fue Statgraphics Centurion XVI.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización química de los aceites esenciales

En la Tabla 3 se muestran los compuestos identificados en el aceite esencial de *Lavandula angustifolia* y de *Thymus zygis* procedentes de una muestra comercial.

En el aceite esencial de *Lavandula angustifolia*, se identificaron 38 compuestos de los cuales un 60,5% corresponde a monoterpenos oxigenados e hidrocarbonados. En esta fracción encontramos los componentes que están en mayor proporción como linalyl acetate (37,34%), linalool (31,55%) y β -ocimene (4,8%).

Existe mucha bibliografía sobre la composición del aceite esencial de *L. angustifolia* y sobre las diferencias encontradas entre el aceite esencial obtenido de sus flores y el obtenido cuando la planta está en estado vegetativo (Lis-Balchin y Hart, 1999; Hassiotis et al., 2010) y también sobre la influencia del tipo de suelo, la altura y el clima en la de composición del aceite esencial (Verma et al., 2010).

Respecto al aceite esencial de *Thymus zygis* posee un contenido elevado en monoterpenos oxigenados e hidrocarbonados, de 13 compuestos identificados en la muestra comercial el 38,5% son monoterpenos hidrocarbonados y el 54,8% son monoterpenos oxigenados, encontrándose en mayor proporción el Thymol (51,34%), p-Cimeno (35,16%), γ -terpineno (3,5%) y carvacrol (3,5%).

Se han descrito diferentes quimiotipos de *T. zygis* (Thompson et al., 2003; Kaloustian et al., 2005) en función de sus principales componentes y su biosíntesis (Chizzola et al., 2008). El aceite esencial comercial es quimiotipo timol. Probablemente la secuencia biogénica (γ -terpineno \rightarrow p-cimeno \rightarrow timol) define este quimiotipo (Piccaglia y Marotti, 1991). La composición que hemos obtenido coincide con las descritas por otros autores entre ellos (Porte y Godoy, 2008).

Tabla 3. Composición química del aceite esencial de *Lavandula angustifolia* y *Thymus zygis*. Compuestos en orden de elución en columna HP-1 (trazas > 0,05)

IK	Compuestos	<i>Lavandula</i>	<i>Thymus</i>
		<i>angustifolia</i>	<i>zygis</i>
		Area %	Area %
931	2-tuyeno	0,092	
938	alpha-pineno	0,174	0,484
954	camfeno	0,129	
978	mentano		0,116
984	beta-pineno	0,171	
990	3-octanona	0,804	
994	beta mirceno	0,414	0,706
998	5-metil-3-heptanol	0,232	
1018	acetato de hexilo	0,38	
1027	limoneno	0,207	
1038	p-cimeno		35,159
1047	beta-ocimeno	4,801	
1051	1,8- cineol	1,946	0,8
1063	gamma-terpineno	2,405	3,532
1090	terpinoleno	0,097	
1121	linalol	31,55	2,207
1125	beta-tuyona	0,786	
1133	acetato de 3-octanol	0,08	
1153	alcamfor	0,248	
1155	isobutirato de hexilo	0,057	
1157	iso-borneol		0,363
1170	borneol	0,658	1,123
1177	lavandulol	0,563	
1184	terpinen-4-ol	3,311	
1188	4-isopropil-2-ciclohexenona	0,26	
1193	alpha-terpineol	0,63	
1195	butanoato de hexilo	0,417	
1210	gamma- terpineol		0,162
1240	nerol	0,056	
1273	acetato de linalilo	37,342	
1288	formato de nerilo	0,098	
1298	acetato de lavandulilo	2,868	
1314	Thymol		51,34
1318	carvacrol		3,532
1367	acetato de nerilo	0,209	
1387	acetato de geranilo	0,314	
1389	monoterpeno	0,118	
1417	beta-cariofileno	4,088	0,131
1451	alpha- cariofileno	0,092	
1453	beta-farneseno	2,675	
1480	gamma-muroleno	0,439	
1483	monoterpeno	0,051	
1510	gamma-cadineno	0,128	
1583	oxido de cariofileno	0,256	
1637	gamma-eudesmol	0,078	

IK: Índice de Kovats relativo a C8-C32 n-alcanos en la columna HP-1

4.2 Determinación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales. Cálculo de la inhibición del crecimiento micelial (MGI)

En la Tabla 4 se muestra el crecimiento medio micelial (mm) de *Alternaria alternata*, *Bipolaris spicifera*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporoides*, *Curvularia hawaiiensis*, *Fusarium oxysporum lycopersici*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium italicum* en los distintos tratamientos ensayados: PDA (control), PDA-200L, PDA-300L, PDA-200T y PDA-300T. En esta tabla se observa que el crecimiento en el PDA-lavanda para ambas concentraciones es muy similar, mostrándose, sólomente, una ligera desviación en *Rhizoctonia solani* y *Fusarium graminearum*.

Por otro lado, se observa que el crecimiento en el medio PDA-300T disminuyó significativamente, mostrándose en algún caso con valor nulo. Respecto al medio PDA-200T, disminuyó visiblemente el crecimiento micelial, pero en menor medida.

Tabla 4. Crecimiento medio (mm) de los distintos hongos ensayados para cada medio y concentración a los 7 días de incubación

HONGO	<u>PDA</u>	<u>LAVANDA</u>		<u>TOMILLO</u>	
	Control	200 µg/mL	300 µg/mL	200 µg/mL	300 µg/mL
RS	116,6	108,5	120,7	0,0	0,0
FE	74,4	83,4	85,4	1,3	0,0
BS	81,8	83,4	85,4	0,0	0,0
PI	21,3	31,2	32,4	11,3	2,4
PE	26,7	33,9	32,3	11,2	2,1
FOL	59,6	61,7	57,7	12,6	4,3
FG	112,6	114,7	107,1	26,6	0,0
CH	23,2	30,5	32,5	1,2	0,0
AA	55,2	60,4	58,4	12,0	0,3
CG	68,7	61,4	58,9	30,5	0,0

MGI (%) Micelial Growth Inhibition

Aceite de lavanda

A continuación, se calcula y se representa la inhibición del crecimiento micelial (MGI) para el medio de cultivo con aceite esencial de lavanda (Tabla 5 y Figura 11). Muchos porcentajes son de valor negativo por lo que podemos observar que no hay inhibición del crecimiento de algunos de los hongos ensayados como son, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium oxysporum lycopersici*, *Bipolaris spicifera*, *Fusarium graminearum* o *Alternaria alternata*. Llegando incluso a favorecer el desarrollo de otros como *Penicillium italicum*, *Penicillium expansum* o *Curvularia hawaiiensis*. El único hongo que presentó valores positivos del MGI para ambas concentraciones fue *Colletotrichum gloeosporoides*.

Tabla 5. Cálculo del MGI en cada especie para el medio de cultivo PDA con lavanda.

Concentración (µg/ml)	RS	FE	BS	PI	PE	FOL	FG	CH	AA	CG
200	6,9	-12,1	-2,0	-46,5	-27,0	-3,5	-1,9	-31,5	-9,4	10,6
300	-3,5	-14,8	-4,4	-52,1	-21,0	3,2	4,9	-40,1	-5,8	14,3

MGI: Porcentaje de inhibición

Tanto los hongos *Penicillium expansum*, *Penicillium italicum* y *Curvularia hawaiiensis*, presentan un marcado MGI con valores negativos lo que nos lleva a afirmar que el aceite esencial de lavanda favorece el crecimiento miceliar del hongo respecto al crecimiento en medio de cultivo PDA. En otros géneros también aparecen datos negativos del MGI, pero en menor medida. Son valores bajos y despreciables como inhibidos. Cabe destacar que en *Colletotrichum gloeosporoides* presenta un MGI positivo de 10,6% para concentración de 200 µg/mL y de 14,3% para concentración de 300 µg/mL. En el hongo *Penicillium italicum*, tanto para la concentración de 200 µg/mL como para la de 300 µg/mL los valores del MGI están cercanos al 50% de incremento del crecimiento respecto al PDA (control). En el hongo *Penicillium expansum* los valores sobrepasan el 20% y en *Curvularia hawaiiensis* están entre el 30 y el 40%

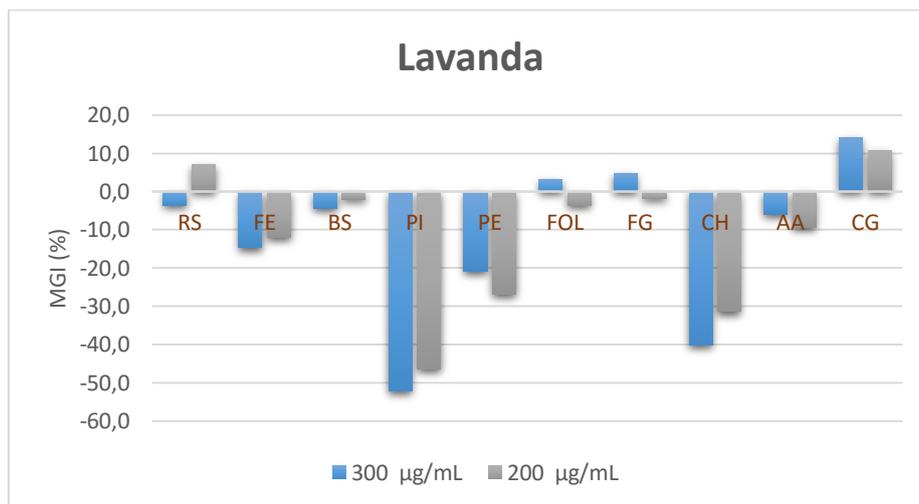


Figura 11. Representación gráfica del MGI (%) para concentración de 300 µg/mL y 200 µg/mL en cada especie para lavanda.

Aceite de tomillo

En el caso de la representación de la inhibición del crecimiento miceliar para el medio de cultivo con aceite esencial de tomillo (Tabla 6 y Figura 12), se observan unos resultados muy satisfactorios. Mostrándose en los hongos ensayados una inhibición del 90 al 100%, a la dosis de 300 µg/mL, en casi todos los casos, con la única excepción de *Penicillium italicum* que muestra un nada despreciable 88,7%. A la dosis de 200 µg/mL, también se observa una inhibición del 90 al 100% del crecimiento miceliar en los hongos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium equiseti*, *Bipolaris spicifera* y *Curvularia hawaiiensis*. La inhibición es del orden del 70 al 80% en *Fusarium oxysporum lycopersici*, *Alternaria alternata* y *Fusarium graminearum* y menor actividad antifúngica sobre *Colletotrichum gloeosporoides*, *Penicillium expansum* y *Penicillium italicum* en los que la reducción del crecimiento fúngico es del orden del 50 al 60%; valores, por otra parte,

nada despreciables. En los hongos *Rhizoctonia solani*, *Bipolaris spicifera* o *Fusarium equiseti* no habría diferencia alguna entre aplicar una dosis o la otra, puesto que los valores de las respectivas concentraciones no varían entre ellos.

Tabla 6. Cálculo del MGI para cada especie en el medio de cultivo PDA con tomillo.

Concentración (µg/ml)	RS	FE	BS	PI	PE	FOL	FG	CH	AA	CG
200	100	98,3	100	46,8	58,2	78,8	76,4	94,6	78,3	55,6
300	100	100	100	88,7	92,1	92,8	100	100	99,5	100

MGI: Porcentaje de inhibición

Gráficamente se observa el gran poder de inhibición del aceite esencial de tomillo. En clave general, el resultado es muy satisfactorio. En gran parte de las muestras el hongo no crece para concentraciones de 300 µg/mL, o si lo hace es en pequeñas proporciones. En *Rhizoctonia solani* y *Bipolaris spicifera* el hongo presenta crecimiento nulo para ambas concentraciones, con lo que se puede concluir que no haría falta aplicar una concentración de 300 µg/mL para obtener un resultado óptimo.

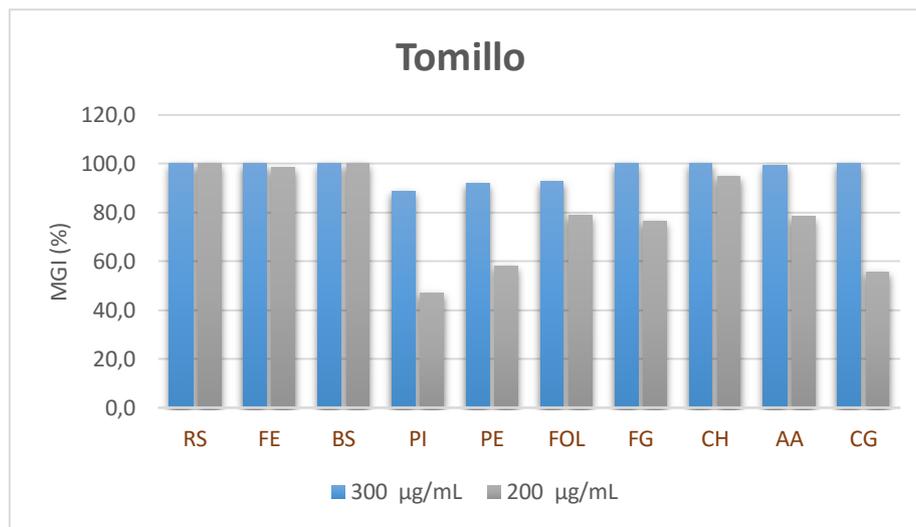


Figura 12. Representación gráfica del MGI (%) para concentración de 300 µg/mL y 200 µg/mL en cada especie para tomillo.

En las siguientes figuras se representa el crecimiento miceliar de los hongos que han sido objeto de estudio en el presente trabajo. Se compara el crecimiento del hongo en medio PDA, sin adicionar aceite esencial en el medio, con el crecimiento del hongo crecido en PDA a las distintas concentraciones de aceite esencial tanto de lavanda como de tomillo. Los hongos *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani* y *Bipolaris spicifera* se caracterizan por un crecimiento rápido, ya que a los 7 días de inoculación ocupan la totalidad, o gran parte, de la placa. En cambio, los hongos *Curvularia hawaiiensis*, *Penicillium italicum* y *Penicillium expansum* presentan un crecimiento más lento, teniendo poco desarrollo a los 7 días de inoculación.

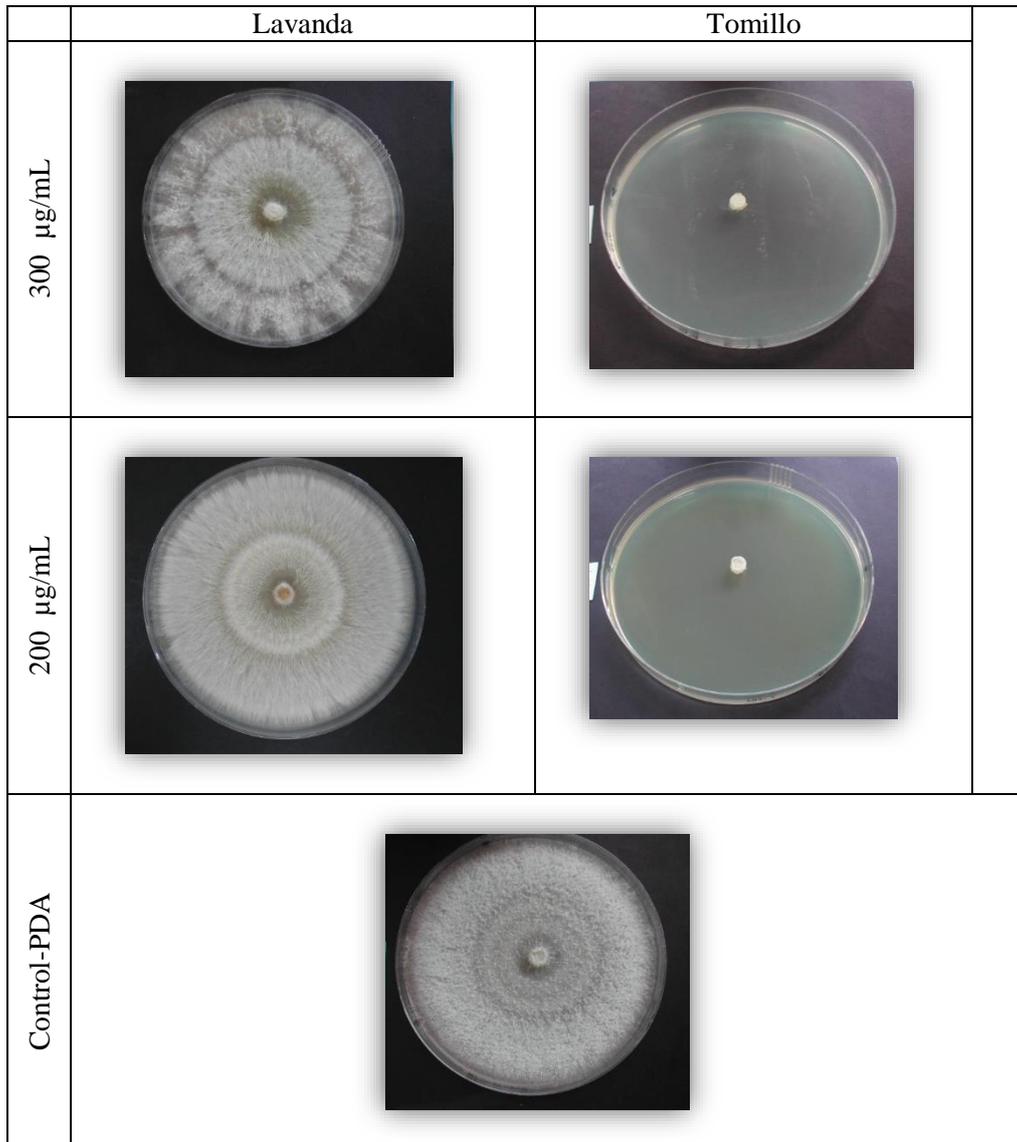
Rhizoctonia solani

Figura 13. Crecimiento de RS en PDA (control) y en PDA con los aceites esenciales de lavanda y tomillo a las dosis de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a los 7 días de incubación.

Rhizoctonia solani en el medio PDA con aceite esencial de lavanda tiene un comportamiento similar al medio PDA sin aceite esencial para ambas concentraciones. Respecto al medio con PDA y aceite esencial de tomillo inhibió completamente el crecimiento micelial para ambas concentraciones.

Fusarium equiseti

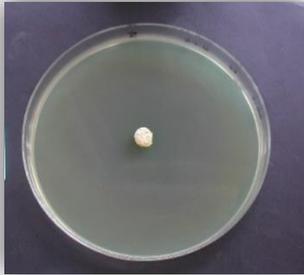
	Lavanda	Tomillo
300 $\mu\text{g/mL}$		
200 $\mu\text{g/mL}$		
Control-PDA		

Figura 14. Crecimiento de FE en PDA (control) y en PDA con los aceites esenciales de lavanda y tomillo a las dosis de 200 $\mu\text{g/mL}$ y 300 $\mu\text{g/mL}$, a los 7 días de incubación.

Fusarium equiseti en el medio PDA con aceite esencial de lavanda tiene un comportamiento diferente al medio PDA sin aceite esencial. El aceite esencial de lavanda potencia el crecimiento entre un 12 y un 14%. Respecto al medio con PDA y aceite esencial de tomillo inhibió completamente el crecimiento miceliar para ambas concentraciones.

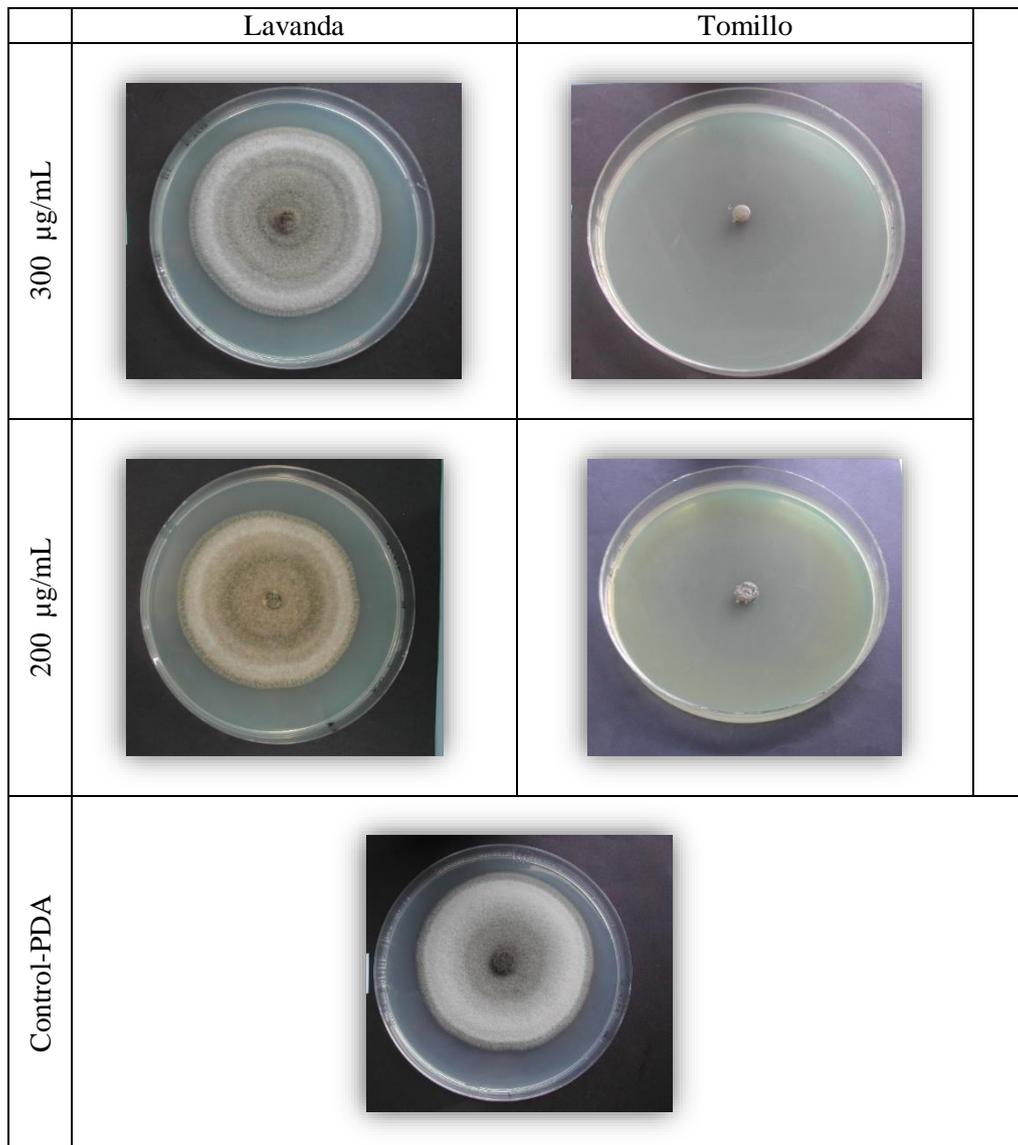
Bipolaris spicifera

Figura 15. Crecimiento de BS en PDA (control) y en PDA con los aceites esenciales de lavanda y tomillo a las dosis de 200 $\mu\text{g/mL}$ y 300 $\mu\text{g/mL}$, a los 7 días de incubación.

Bipolaris spicifera en el medio PDA con aceite esencial de lavanda tiene un comportamiento similar al medio PDA sin aceite esencial para ambas concentraciones. Destacar la influencia en la coloración, hacia tonos más oscuros (arenáceos), para 200 $\mu\text{g/mL}$. Respecto al medio con PDA y aceite esencial de tomillo inhibió completamente el crecimiento miceliar para ambas concentraciones.

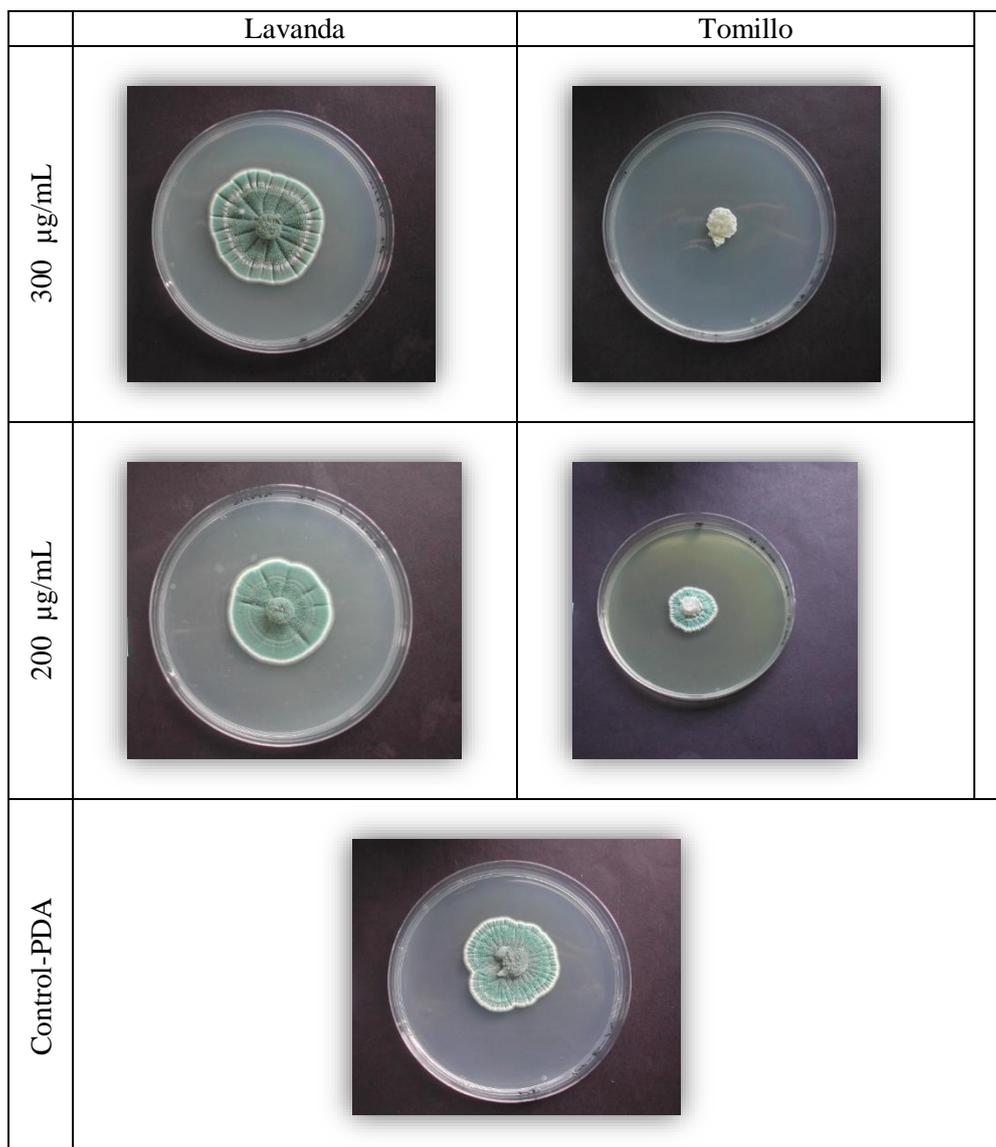
Penicillium italicum

Figura 16. Crecimiento de PI en PDA (control) y en PDA con los aceites esenciales de lavanda y tomillo a las dosis de 200 $\mu\text{g/mL}$ y 300 $\mu\text{g/mL}$, a los 7 días de incubación.

Penicillium italicum en el medio PDA con aceite esencial de lavanda es el hongo que presenta un incremento del crecimiento mayor, alrededor del 50%. Respecto al medio PDA con el aceite esencial de tomillo significativamente el crecimiento, inhibiéndolo un 88,7% para la concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$ y un 46,8% para 200 $\mu\text{g/mL}$.

Penicillium expansum

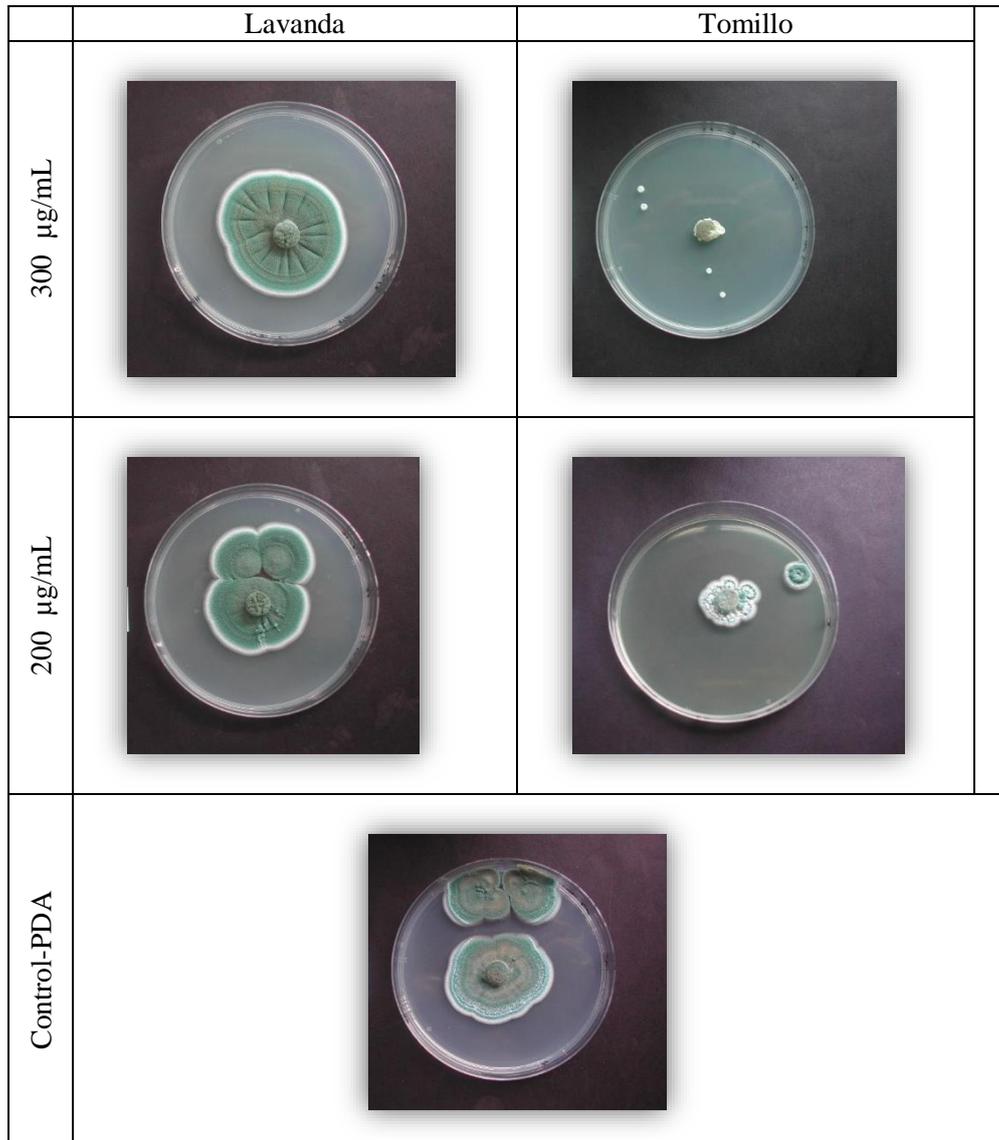


Figura 17. Crecimiento de PE en PDA (control) y en PDA con los aceites esenciales de lavanda y tomillo a las dosis de 200 $\mu\text{g/mL}$ y 300 $\mu\text{g/mL}$, a los 7 días de incubación.

Penicillium expansum en el medio PDA con aceite esencial de lavanda presenta una potenciación del crecimiento del orden del 20 al 30%. Respecto al medio PDA con el aceite esencial de tomillo disminuyó el crecimiento, inhibiéndolo casi totalmente para la concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$ y alrededor del 60% para 200 $\mu\text{g/mL}$.

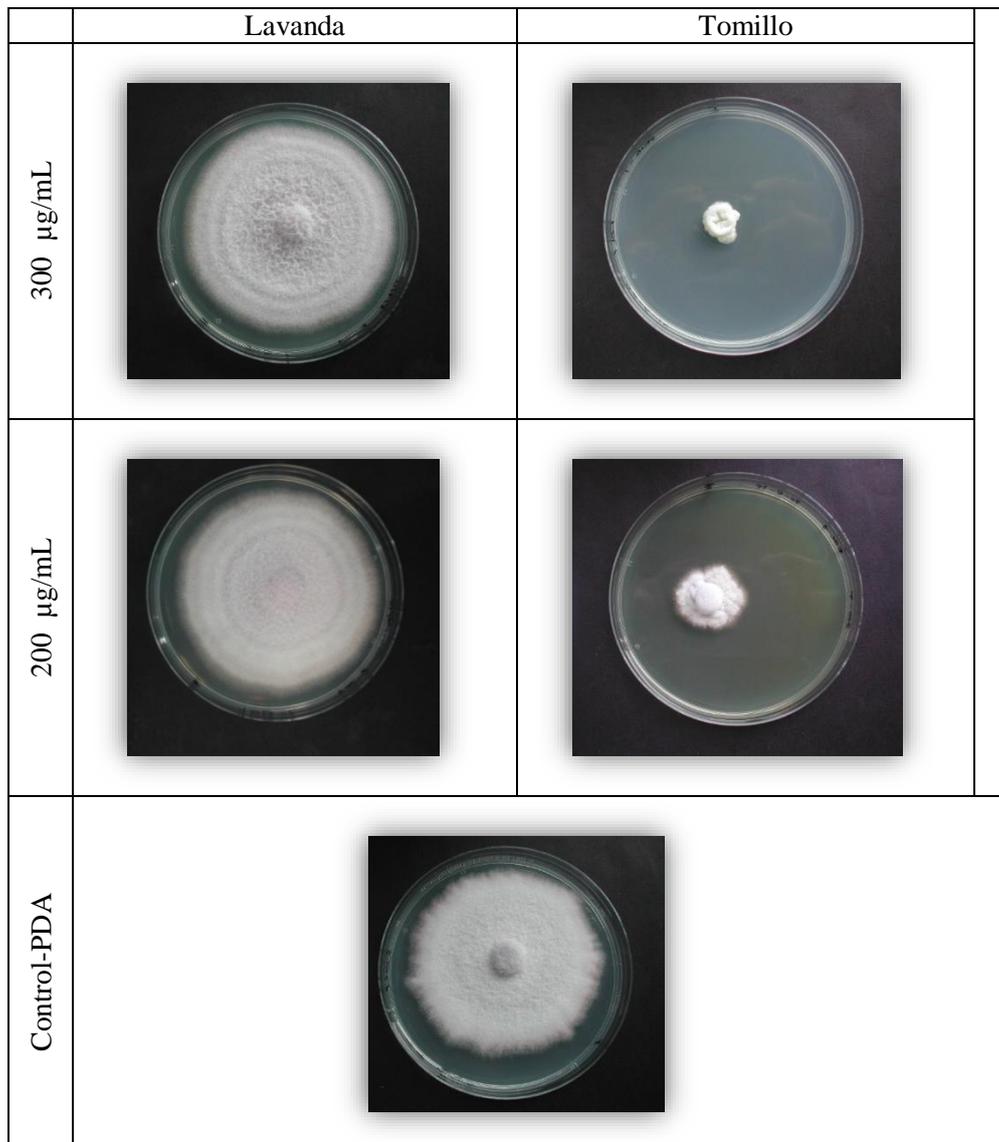
Fusarium oxysporum lycopersici

Figura 18. Crecimiento de FOL en PDA (control) y en PDA con los aceites esenciales de lavanda y tomillo a las dosis de 200 $\mu\text{g/mL}$ y 300 $\mu\text{g/mL}$, a los 7 días de incubación.

Fusarium oxysporum lycopersici en el medio PDA con aceite esencial de lavanda presenta un crecimiento similar al del hongo en PDA, datos bajos y despreciables para considerarse como inhibidos. Respecto al medio PDA con el aceite esencial de tomillo disminuyó el crecimiento, inhibiéndolo un 92,8% para la concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$ y un 78,8% para 200 $\mu\text{g/mL}$.

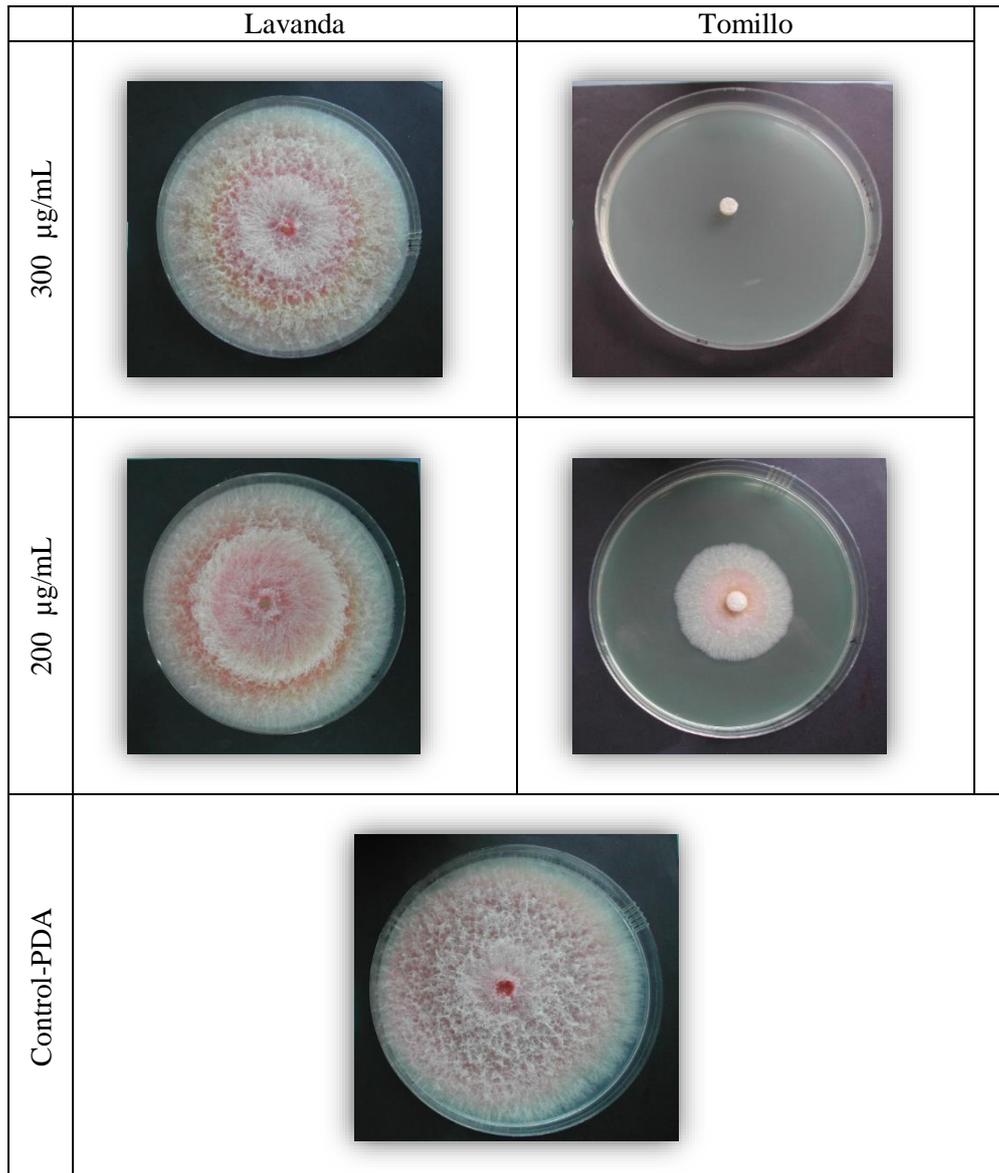
Fusarium graminearum

Figura 19. Crecimiento de FG en PDA (control) y en PDA con los aceites esenciales de lavanda y tomillo a las dosis de 200 $\mu\text{g/mL}$ y 300 $\mu\text{g/mL}$, a los 7 días de incubación.

Fusarium graminearum en el medio PDA con aceite esencial de lavanda presenta un crecimiento similar al del hongo crecido en PDA. Respecto al medio PDA con el aceite esencial de tomillo para la concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ disminuyó un 76% el crecimiento miceliar; destacar la influencia en la coloración, hacia tonos más claros. Para concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$ inhibió completamente el crecimiento.

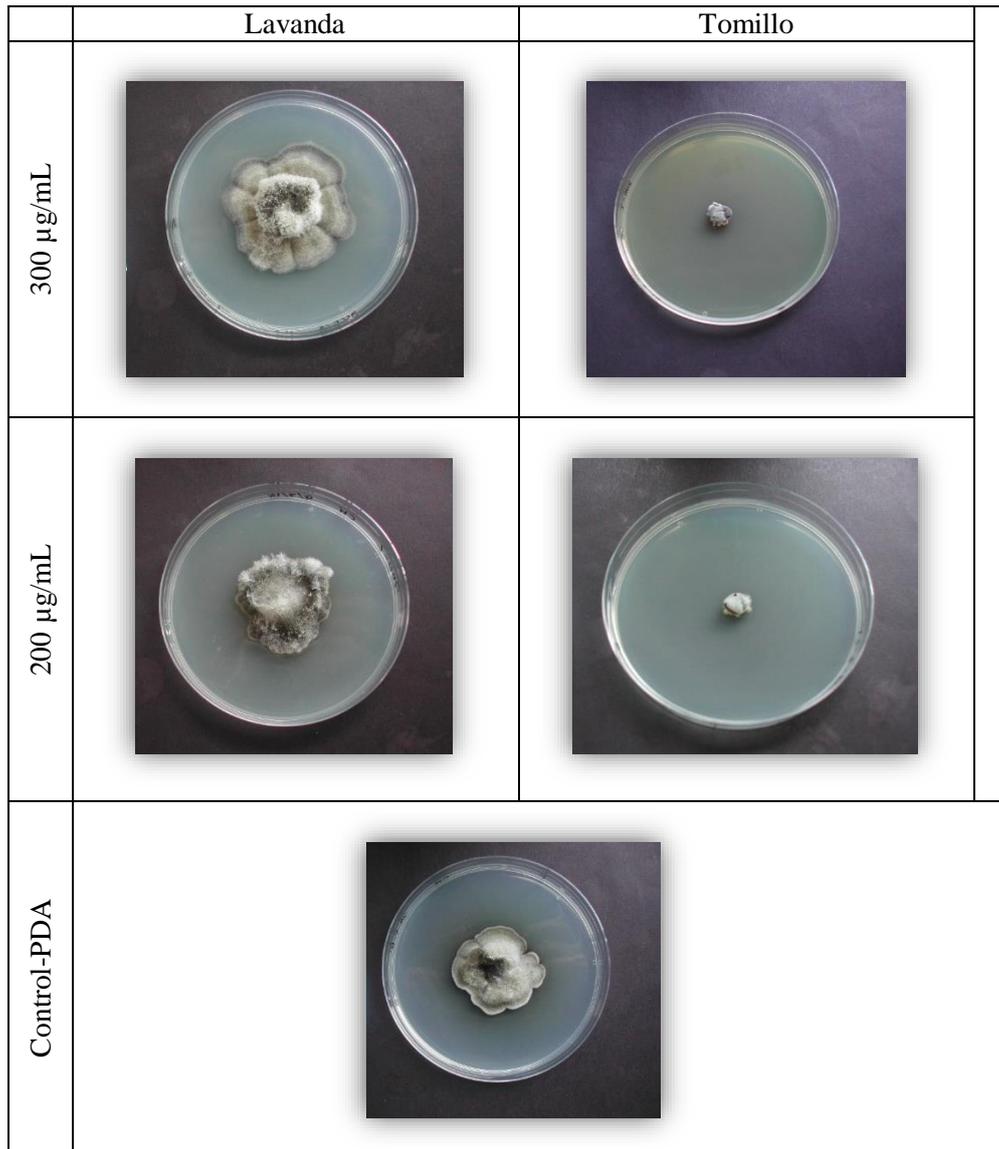
Curvularia hawaiiensis

Figura 20. Crecimiento de CH en PDA (control) y en PDA con los aceites esenciales de lavanda y tomillo a las dosis de 200 $\mu\text{g/mL}$ y 300 $\mu\text{g/mL}$, a los 7 días de incubación.

Curvularia hawaiiensis en el medio PDA con el aceite esencial de lavanda presenta un crecimiento muy diferente al del hongo en PDA, incluso llega a favorecer su crecimiento del 30 al 40%. Respecto al medio con PDA y con aceite esencial de tomillo inhibió completamente el crecimiento micelial para concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$ y un 94,6% para concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$.

Alternaria alternata

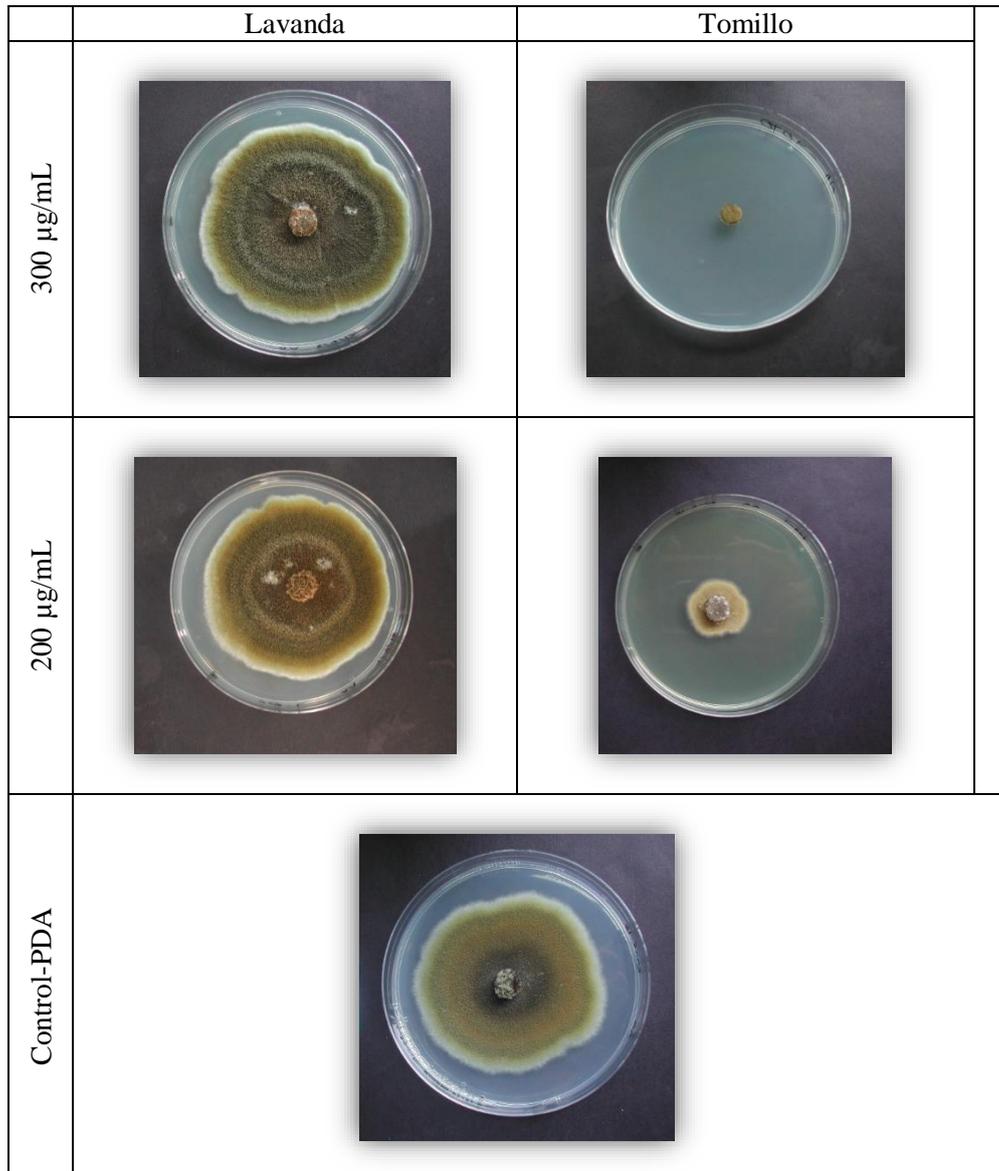


Figura 21. Crecimiento de AA en PDA (control) y en los medios con los aceites esenciales de lavanda y tomillo a las dosis de 200 $\mu\text{g/mL}$ y 300 $\mu\text{g/mL}$, a los 7 días de incubación.

Alternaria alternata en el medio PDA con el aceite esencial de lavanda se caracteriza por un crecimiento similar al control, presentando un ligero aumento del crecimiento en ambas concentraciones. Respecto al medio PDA con el aceite esencial de tomillo disminuyó el crecimiento, inhibiéndolo completamente para la concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$ y un 78,3 para 200 $\mu\text{g/mL}$. Destacar el cambio en la coloración, hacia tonos más claros, para 200 $\mu\text{g/mL}$ en tomillo.

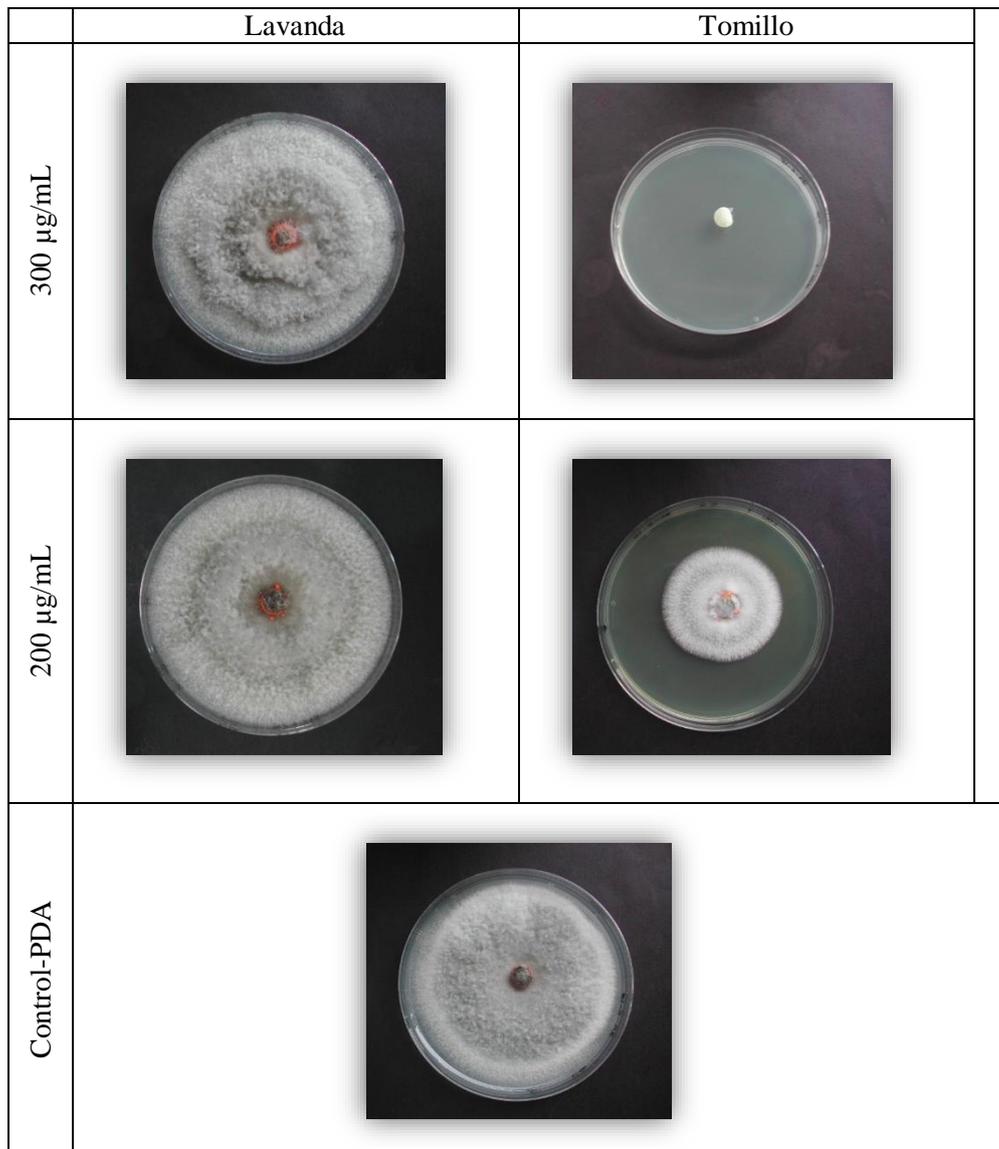
Colletotrichum gloeosporoides

Figura 22. Crecimiento de CG en PDA (control) y en los medios con los aceites esenciales de lavanda y tomillo a las dosis de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a los 7 días de incubación.

Colletotrichum gloeosporoides en el medio PDA con el aceite esencial de lavanda se caracteriza por ser el único hongo que presenta una inhibición en su crecimiento para ambas concentraciones, entre el 10 y el 15%. Respecto al medio PDA con el aceite esencial de tomillo para la concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mostró una inhibición del crecimiento del 55%, mostrando tonalidades más blanquecinas. Para concentración de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inhibió completamente el crecimiento.

4.3 Análisis estadístico

LAVANDA

El aceite esencial de lavanda en las experiencias realizadas frente a los hongos estudiados y a las dosis de 200 $\mu\text{g/mL}$ y 300 $\mu\text{g/mL}$ no inhibe el crecimiento de los mismos, por tanto, no presenta actividad antifúngica, e incluso en algunos casos potencia su crecimiento.

Realizado el análisis de la varianza (ANOVA) para el factor tratamiento sobre el crecimiento de los hongos, dicho análisis nos pone de manifiesto que no tiene efecto significativo sobre el crecimiento de las especies.

La representación gráfica de los intervalos Tukey HSD de comparación de medias (Figura 23) nos muestra el fuerte solapamiento en la respuesta de las diferentes especies a los distintos tratamientos. En algunos casos la respuesta de las especies al control se separa de la respuesta a los aceites, no habiendo diferencias entre las dosis de aceite ensayadas.

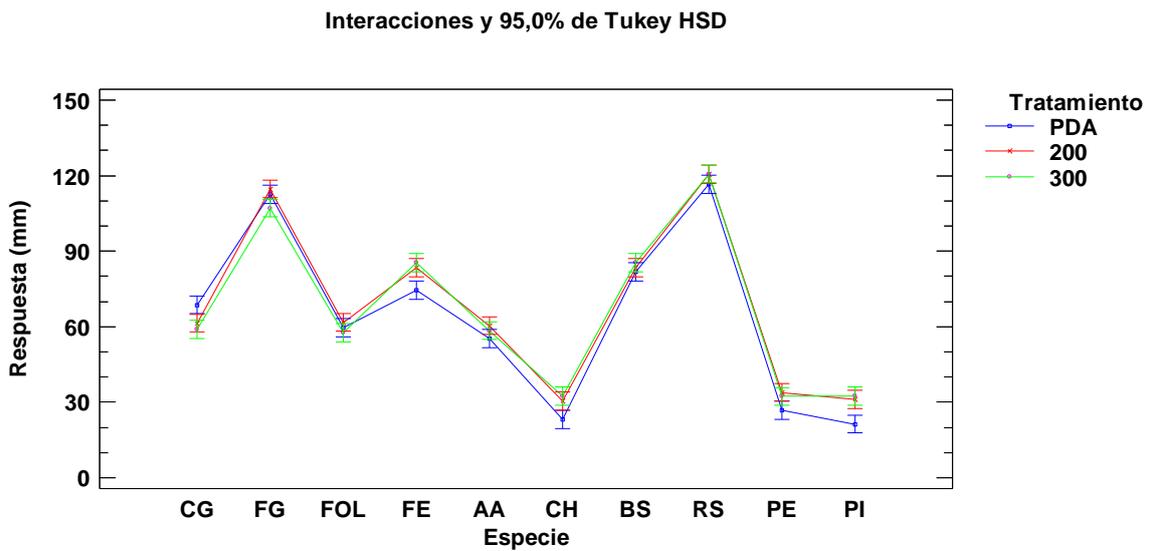


Figura 23. Representación gráfica Intervalo Tukey HSD para la lavanda.

TOMILLO

El análisis de la varianza representado en la Tabla 7 muestra los efectos de los factores simples especie y tratamiento, como su interacción, sobre el crecimiento medio de las especies tratadas. Este análisis indica que tanto los factores simples, como su interacción tienen efecto significativo ($P < 0,05$) sobre el crecimiento de los hongos.

Tabla 7. ANOVA del crecimiento de las especies tratadas con el aceite esencial de tomillo; significancia de los factores especie y tratamiento y sus interacciones.

Fuente	GL	CM	F-ratio	P-valor
A:Especie	9	4112,71	362,77	0,0000*
B:Tratamiento	2	112914,	9959,98	0,0000*
AB	18	4116,81	363,14	0,0000*

GL: Grados de libertad; CM: Cuadrado Medio; F-ratio: F- Snedecor
*Significativo $P < 0,05$

En la representación de los intervalos de Tukey HSD de comparación de medias en las diferentes especies y tratamientos (Figura 24) se comprueba si existen diferencias significativas entre las medias de crecimiento de las distintas especies de hongos ensayadas. Dicho gráfico pone de manifiesto que realmente existen diferencias significativas con un nivel del 95,0% de confianza, para las especies *Colletotrichum gloeosporoides*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum lycopersici*, *Alternaria alternata*, *Penicillium expansum* y *Penicillium italicum* en los tratamientos ensayados. En las especies *Fusarium equiseti*, *Curvularia hawaiiensis*, *Bipolaris spicifera*, y *Rhizoctonia solani* no hay diferencias significativas de crecimiento a las 2 dosis de aceite ensayadas (200 y 300 $\mu\text{g/mL}$).

Interacciones y 95,0% de Tukey HSD

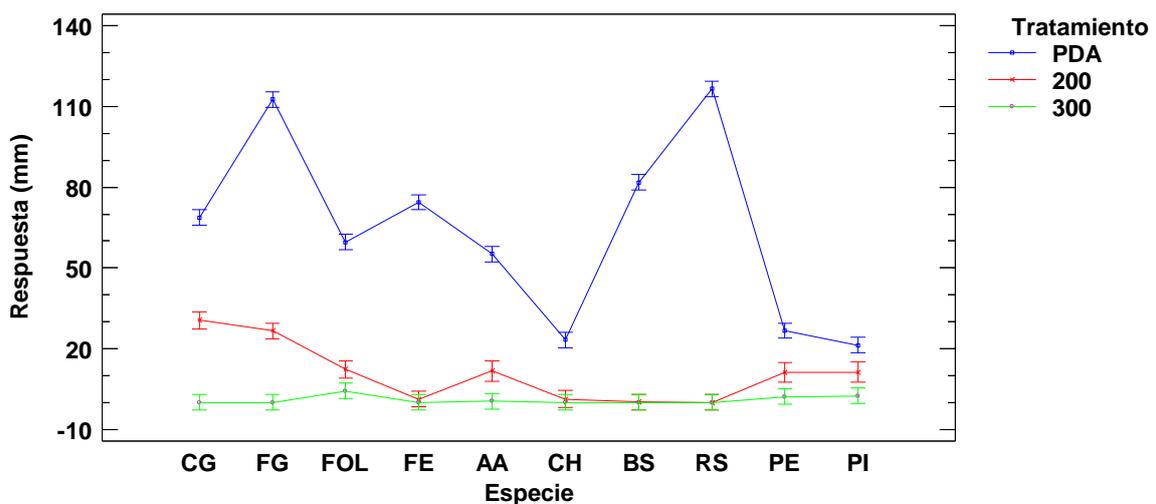


Figura 24. Representación gráfica Intervalo Tukey HSD para el tomillo.

4.4 Discusión

En la revisión realizada acerca de la actividad antifúngica y antimicrobiana de los aceites esenciales parece indicar que la actividad no se puede atribuir a un único componente mayoritario, sino que, al tratarse de mezclas muy complejas, su actividad antimicrobiana es el resultado de una sinergia entre todos sus componentes. Algunos autores indican que los aceites esenciales son significativamente más efectivos que sus componentes mayoritarios, mientras que otros muestran resultados contrarios (Santamarina et al., 2015).

En el aceite esencial de tomillo se ha encontrado una importante cantidad de compuestos fenólicos thymol (51,34%) y carvacrol (3,7%) y de sus precursores biogénicos p-cymene (35,16%) y γ -terpinene (3,53%). Este aceite ha mostrado en el presente trabajo una elevada actividad antifúngica frente a *Alternaria alternata*, *Bipolaris spicifera*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporoides*, *Curvularia hawaiiensis*, *Fusarium oxysporum lycopersici*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium expansum* y *Penicillium italicum*, llegando incluso a valores de MGI del 100%. Resultados que concuerdan con los obtenidos por Bouchra et al., (2003) frente a *Botrytis cinerea*, y por los obtenidos por Bluma y Etcheverry (2008) en ensayos realizados frente a hongos productores de micotoxinas en maíz almacenado. En otros estudios realizados con aceite esencial de orégano en el que los compuestos mayoritarios también son los compuestos fenólicos carvacrol (43%) y thymol (22%) se obtuvieron muy buenos resultados frente a los hongos aislados del arroz *Fusarium culmorum* y *Fusarium verticillioides* (Roselló et al., 2015) y también frente a *Alternaria alternata*, *Bipolaris oryzae*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium verticillioides* (Santamarina et al., 2015). Además, estudios recientes (Janatova et al., 2015) confirman que la eficacia del thymol como antifúngico es mayor cuando se encapsuló en material mesoporoso de sílice MCM-41 que cuando se encuentra en estado puro.

Por otra parte, el thymol ha sido recientemente aprobado (Reg. (EU) N° 568/2013 (Dossier completo 2011/266/EU) por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) como sustancia activa autorizada en la categoría de fungicida, con fecha de aprobación de 01/12/2013 hasta el 30/11/2023.

El aceite de lavanda ensayado con un elevado contenido en monoterpenos oxigenados, linalyl acetate y linalool, no ha mostrado actividad antifúngica sobre los hongos ensayados a las dosis de 200 y 300 $\mu\text{g/mL}$, e incluso en las especies del género *Penicillium* y en *Curvularia hawaiiensis* ha llegado a potenciar su crecimiento del orden del 20 al 50%.

5. CONCLUSIONES

- En el aceite esencial de lavanda el compuesto mayoritario es el acetato de linalilo que aparece en una proporción del 37,34%.
- Los compuestos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de lavanda pertenecen al grupo de los monoterpenos oxigenados e hidrocarbonados, que representan el 60,5% del total.
- En el aceite esencial de tomillo el compuesto mayoritario es el thymol con una proporción del 51,34 %.
- De los 13 compuestos identificados en el aceite esencial de tomillo el 38,5% son monoterpenos hidrocarbonados y el 54,8% son monoterpenos oxigenados.
- El aceite esencial de lavanda en las experiencias realizadas frente a los hongos estudiados y a las dosis de 200 µg/mL y 300 µg/mL no inhibe el crecimiento de los mismos, por tanto, no presenta actividad antifúngica, incluso en algunos casos potencia su crecimiento.
- El valor del MGI para la experiencia realizada en el aceite esencial de tomillo fue de alrededor del 100% para concentración de 300 µg/mL, en la casi totalidad de los hongos ensayados.
- Para el aceite esencial de tomillo el valor más bajo del MGI lo encontramos a concentración de 200 µg/mL para el hongo *Penicillium italicum* con una inhibición próxima al 50%, valor nada despreciable.
- En el caso de los hongos *Fusarium equiseti*, *Bipolaris spicifera*, *Curvularia hawaiiensis* y *Rhizoctonia solani* las dosis de 200 y 300 µg/mL de aceite esencial de tomillo son igualmente efectivas, siendo la inhibición de su crecimiento del 100%.
- El aceite esencial de tomillo presentó una excelente inhibición del crecimiento micelial en los hongos ensayados, por lo que este aceite y/o sus componentes podrían ser una alternativa para el control de estos hongos, y para alargar la vida útil de los productos agrícolas en post-cosecha y almacenados.

6. BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, R. P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry (No. Ed. 4). *Allured publishing corporation*.

ADENA (1996). Fondo mundial para la naturaleza. Plantas medicinales, incidencia ambiental y económica de uso de las plantas aromáticas y medicinales en España. Informe técnico elaborado por M. Dolores Fernández, J.J. Breaux y Emilio Blanco en colaboración con otros autores y editores

AGRIOS, G. N. (2004). Plant pathology. *Elsevier Academic Press*.

ALMELA CAMAÑAS, CELIA. (2012). *Incorporación de aceites esenciales en la conservación del caqui "rojo brillante" y melón "piel de sapo" mínimamente procesados* (doctoral dissertation).

AL-MUSTAFA, A. H., & AL-THUNIBAT, O. Y. (2008). Antioxidant activity of some Jordanian medicinal plants used traditionally for treatment of diabetes. *Pak J Biol Sci*, 11(3), 351-358.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., & IDAOMAR, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.

BLÁZQUEZ, M.A. (2014). Role of natural essential oils in sustainable agriculture and food preservation. *Journal of Scientific Research & Reports*, 3(14), 1843-1860

BLUMA, R. V., & ETCHEVERRY, M. G. (2008). Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus* section Flavi growth parameters and aflatoxin accumulation. *Food Microbiology*, 25(2), 324-334.

BOUCHRA, C., ACHOURI, M., HASSANI, L. I., & HMAMOUCI, M. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan *Labiatae* against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(1), 165-169.

BOUNATIROU, S., SMITI, S., MIGUEL, M. G., FALEIRO, L., REJEB, M. N., NEFFATI, M., & PEDRO, L. G. (2007). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food chemistry*, 105(1), 146-155.

BURT, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.

CASTROVIEJO, S., AEDO, C., CIRUJANO, S., LAÍNIZ, M., MONTSERRAT, P., MORALES, R., MUÑOZ GARMENDIA, F., NAVARRO, C., PAIVA, J. & SORIANO, C. (eds.). 1993. *Flora iberica* 12. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.

- COȘOVEANU, A., CABRERA, R., MARÍÑO, C. G., IACOMI, B. M., & GONZÁLEZ-COLOMA, A. (2013). Antifungal activity of plant extracts against pre and postharvest pathogens. *Scientific Papers-Series A, Agronomy*, 56, 206-211.
- CROUS, P. W., VERKLEY, G. J., GROENEWALD, J. Z., & SAMSON, R. A. (2009). Fungal biodiversity. *Fungal biodiversity*.
- CURIONI, A., & ARIZIO, O. (2006). *Plantas aromáticas y medicinales labiadas* (No. 635.7 C975p).
- DARDIOTI, A., KAROUSOU, R., LANARAS, T., & KOKKINI, S. (2012). Diversity of *Satureja pilosa* subsp. *origanita* essential oils: a new “oregano” from East Mediterranean. *Biochemical Systematics and Ecology*, 40, 178-183.
- DA SILVEIRA, S.M., BITTENCOURT, F.L., FRONZA, N., CUNHA, A., JR., SCHEUERMANN, G.N., & WERNECK VIEIRA, C.R. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7 °C. *LWT- Food Science & Technology*, 59, 86-93.
- DAWIDOWICZ, A. L., RADO, E., & WIANOWSKA, D. (2009). Static and dynamic superheated water extraction of essential oil components from *Thymus vulgaris* L. *Journal of separation science*, 32(17), 3034-3042.
- DAYAN, F. E., CANTRELL, C. L., & DUKE, S. O. (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(12), 4022-4034.
- DE CORATO, U., MACCIONI, O., TRUPO, M., & DI SANZO, G. (2010). Use of essential oil of *Laurus nobilis* obtained by means of a supercritical carbon dioxide technique against post-harvest spoilage fungi. *Crop protection*, 29(2), 142-147.
- DIKBAS, N., KOTAN, R., DADASOGLU, F., & SAHIN, F. (2008). Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis*. *International Journal of Food Microbiology*, 124(2), 179-182.
- DOOHAN, F. M., BRENNAN, J., & COOKE, B. M. (2003). Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals in Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi (pp. 755-768). *Springer Netherlands*.
- DO PRADO, A. C. P., DA SILVA, H. S., DA SILVEIRA, S. M., BARRETO, P. L. M., VIEIRA, C. R. W., MARASCHIN, M., & BLOCK, J. M. (2014). Effect of the extraction process on the phenolic compounds profile and the antioxidant and antimicrobial activity of extracts of pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] shell. *Industrial Crops and Products*, 52, 552-561.

- DORMAN, H. J. D., & DEANS, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.
- DUPUY, N., GAYDOU, V., & KISTER, J. (2014). Quantitative Analysis of Lavender (*Lavandula angustifolia*) Essential Oil Using Multiblock Data from Infrared Spectroscopy. *American Journal of Analytical Chemistry*, 2014.
- EBRAHIMI, S. N., HADIAN, J., MIRJALILI, M. H., SONBOLI, A., & YOUSEFZADI, M. (2008). Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food chemistry*, 110(4), 927-931.
- FANLO, M., MELERO, R., MORÉ, E., & CRISTÓBAL, R. (2009). Cultivo de plantas aromáticas, medicinales y condimentarias en Cataluña. *Centro Tecnológico Forestal de Cataluña. España*.
- FERNÁNDEZ, A. (2006). Las plantas aromáticas y medicinales PAM, un potencial con gran necesidad de reorientación. *Revista Española de Estudios Agrosociales y Pesqueros*, 209, 177-214
- FISHER, K., & PHILLIPS, C. A. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 101(6), 1232-1240.
- GUERRERO-RODRÍGUEZ, E., SOLÍS-GAONA, S., HERNÁNDEZ-CASTILLO, F. D., FLORES-OLIVAS, A., SANDOVAL-LÓPEZ, V., & JASSO-CANTÚ, D. (2007). Actividad Biológica in vitro de Extractos de *Flourensia cernua* DC en Patógenos de Postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.: Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y *Penicillium digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc. *Revista mexicana de Fitopatología*, 25(1), 48-53.
- JAMALI, C. A., EL BOUZIDI, L., BEKKOUCHE, K., LAHCEN, H., MARKOUK, M., WOHLMUTH, H.,... & ABBAD, A. (2012). Chemical composition and antioxidant and anticandidal activities of essential oils from different wild Moroccan *Thymus* species. *Chemistry & biodiversity*, 9(6), 1188-1197.
- KLEIN, G., RÜBEN, C., & UPMANN, M. (2013). Antimicrobial activity of essential oil components against potential food spoilage microorganisms. *Current microbiology*, 67(2), 200-208.
- LLORENS, A., MATEO, R., HINOJO, M. J., VALLE-ALGARRA, F. M., & JIMÉNEZ, M. (2004). Influence of environmental factors on the biosynthesis of type B trichothecenes by isolates of *Fusarium* spp. from Spanish crops. *International journal of food microbiology*, 94(1), 43-54.

- MICELI, A., TOMMASI, L., NEGRO, C., DE LEO, P. (2002). Composizione e variabilità dell'olio essenziale di *T. capitatus*. *Proceeding of LXV Congress of SIFV, Riva del Garda (TN), 20–23 September*.
- MLEDANER, T., & PERKOWSKI, J. (1996). Correlations among *Fusarium culmorum* head blight resistance, fungal colonization and mycotoxin contents in winter rye. *Plant Breeding, 115*(5), 347-351.
- MOGHADDAM, M., TAHERI, P., PIRBALOUTI, A.G., & MEHDIZADEH, L (2015). Chemical composition and antifungal activity of essential oil from the seed of *Echinophora platyloba* DC. Against phytopathogens fungi by two different screening methods. *LWT- Food Science and Technology, 61*, 536-542
- MOON, T., CAVANAGH, H. M., & WILKINSON, J. M. (2007). Antifungal activity of Australian grown *Lavandula* spp. essential oils against *Aspergillus nidulans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Leptosphaeria maculans* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Essential Oil Research, 19*(2), 171-175.
- MOON, T., WILKINSON, J. M., & CAVANAGH, H. M. (2006). Antiparasitic activity of two *Lavandula* essential oils against *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Hexamita inflata*. *Parasitology research, 99*(6), 722-728.
- PAPACHRISTOS, D. P., & STAMOPOULOS, D. C. (2004). Fumigant toxicity of three essential oils on the eggs of *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research, 40*(5), 517-525.
- PAVELA, R. (2005). Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. *Fitoterapia, 76*(7), 691-696.
- PIGNATI, E. (1982). *Bromus* In. *Flora d'Italia, 3*.
- PITT, J. I., & HOCKING, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage* (Vol. 519). New York: Springer.
- ROLLER, S., ERNEST, N., & BUCKLE, J. (2009). The antimicrobial activity of high-necrodane and other lavender oils on methicillin-sensitive and-resistant *Staphylococcus aureus* (MSSA and MRSA). *The Journal of Alternative and Complementary Medicine, 15*(3), 275-279.
- ROMEO, F. V., DE LUCA, S., PISCOPO, A., & POIANA, M. (2008). Antimicrobial effect of some essential oils. *Journal of Essential Oil Research, 20*(4), 373-379.
- SANTAMARINA, M.P., ROSELLÓ, J., CHIRALT, A., & SEMPERE, F. (2015). Antifungal activity and potential use of essential oils against *Fusarium culmorum* and *Fusarium verticilloides*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants. 18* (2), 359-367.

- SANTAMARINA, M.P., ROSELLÓ, J., SEMPERE, F., GIMÉNEZ, S., & BLÁZQUEZ, M.A. (2015). Commercial *Origanum compactum* Benth. and *Cinnamomum zeylanicum* Blum. Essential oils against natural mycoflora in Valencia rice. *Natural Products Research*, 29(23), 2215–2218.
- SANTAMARINA, M.P., ROSELLÓ, J., GIMÉNEZ, S., BLÁZQUEZ, M.A. (2015). Commercial *Laurus nobilis* L. and *Syzygium aromaticum* L. Merr. & Perry essential oils against post-harvested phytopathogenic fungi on rice. *Food science and technology*, 65, 325-332.
- SANTIAGO PINAZO, BEATRIZ. (2015). *Los aceites esenciales de Laurel (Laurus nobilis) y Clavo (Syzygium aromaticum) una alternativa frente a Fusarium sambucinum aislado del arroz* (Doctoral dissertation).
- SORIANO DEL CASTILLO, J. M. (2007). *Micotoxinas en alimentos*. Ediciones Díaz de Santos.
- SUWALSKY, M., OYARCE, K., AVELLO, M., VILLENA, F., & SOTOMAYOR, C. P. (2009). Human erythrocytes and molecular models of cell membranes are affected in vitro by *Balbisia peduncularis* (Amancay) extracts. *Chemico-biological interactions*, 179(2), 413-418.
- THEODORIDIS, S., STEFANAKI, A., TEZCAN, M., AKI, C., KOKKINI, S., & VLACHONASIOS, K. E. (2012). DNA barcoding in native plants of the Labiatae (Lamiaceae) family from Chios Island (Greece) and the adjacent Çeşme-Karaburun Peninsula (Turkey). *Molecular ecology resources*, 12(4), 620-633.
- WINWARD, G. P., AVERY, L. M., STEPHENSON, T., & JEFFERSON, B. (2008). Essential oils for the disinfection of grey water. *Water research*, 42(8), 2260-2268.