

UNIVERSIDAD POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL



Variación estacional del aceite esencial obtenido de diferentes quimiotipos de *Mentha longifolia* L.

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA
Y DEL MEDIO RURAL

ALUMNA:

Amal El Ahrar

TUTOR ACADÉMICO:

Dr. Juan Antonio Lns. Molina

COTUTOR ACADÉMICO:

Vicente Castell Zeising

COTUTORA COLABORADORA:

Dra. Sandra Vacas González

Curso Académico: 2015 / 2016

VALENCIA, 29 DE JULIO DE 2016

Título

Variación estacional del aceite esencial obtenido de diferentes quimiotipos de *Mentha longifolia* L.

Resumen

Se ha estudiado la variabilidad estacional de los componentes químicos mayoritarios del aceite esencial de *Mentha longifolia* L. en cinco quimiotipos claramente definidos en trabajos anteriores (Bonet 2013,2015).

El estudio se ha realizado sobre cultivares químicamente homogéneos obtenidos a partir de individuos con idéntica composición química y seleccionados mediante la cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía de gases y espectroscopia de masas (CG/MS).

Desde el punto de vista metodológico, los principales objetivos de éste trabajo son la confirmación de la identidad de los quimiotipos previamente identificados y cultivados en cada una de las cinco parcelas experimentales, y el estudio del efecto de la estacionalidad sobre la variabilidad de los componentes mayoritarios de cada quimiotipo.

Para la validación de la identidad de cada quimiotipo se aplicó una CCF a los extractos en diclorometano de cada uno. La observación de los resultados obtenidos permitió la verificación de la similitud existente entre los quimiotipos anteriormente definidos y los cultivados actualmente.

Se realizó el seguimiento estacional efectuando tres muestreos con las plantas en desarrollo avanzado, comienzo floración y plena floración. Se reunió el material vegetal, hojas, correspondiente a cada quimiotipo que fue sometido a extracción-destilación simultánea mediante un equipo (Likens-Nickerson) para la obtención de fracción volátil de las muestras utilizando diclorometano como disolvente. La fracción volátil obtenida de cada muestra fue analizada por cromatografía gaseosa mediante GC/MS para la identificación de sus componentes mayoritarios y para la cuantificación se utilizó la ionización de llama como sistema de detección (CG/FID).

Los resultados de este análisis han permitido estudiar el efecto causado por la variabilidad ontogenética sobre la media de los componentes mayoritarios en los quimiotipos estudiados. Tras el análisis estadístico se puede decir que, al controlar la variabilidad genética, la

ambiental y la debida a la elección del órgano de la planta que se utiliza para la extracción, la planta ha mostrado una estabilidad química a lo largo del ciclo vegetativo para ciertos quimiotipos, mientras que para otros ha mostrado variaciones estadísticamente significativas.

Palabras clave:

Mentha longifolia L., variación estacional, aceite esencial, quimiotipo, extracción-destilación simultaneas, cromatografía de gases, espectroscopia de masas CG/MS, cromatografía de gases con detector FID

Abstract

The study carried out on the influence of season on chemical composition of essential oils of *Mentha longifolia L.* in five chemotype clearly defined in previous study (Bonet, 2015).

The study was performed on chemically homogeneous cultivars, they obtained from individuals with identical chemical composition and selected by the thin layer chromatography (TLC), gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS).

From the methodological point of view, the main objectives of this work are the confirmation of the identity of the chemotype previously identified and cultivated in each one of the five experimental plots, and the study of the effect of seasonality on the variability of the major components of each chemotype.

For the validation of the identity of each chemotype applied a TLC to the dichloromethane extracts of each one. The observation of the results obtained allowed verification of the similarity between the quimiotipos defined above and the cultivated today.

We followed up by performing three sampling seasonal plants in advanced development, top blooming and full blooming. Met the plant material, leaves, corresponding to each chemotype that he was subjected to simultaneous extarction-distillation using a apparatus (Likens-Nickerson) for obtaining fraction of the volatile compounds samples using dichloromethane as solvent. The Volatile fraction obtained from each sample was analyzed by gas chromatography using GC/MS for identification of its major components and for the quantification was used the flame ionization as a system of detection (GC/FID).

The results of this analysis have allowed to study the effect caused by the variability ontogenic over the average of the major components in the chemotyps studied. After the statistical analysis it can be said that by controlling the genetic variability, environmental and due to the choice of the organ of the plant that is used for the extraction, the plant has shown a chemical stability throughout the vegetative cycle for certain chemotyps, while for others it has shown statistically significant variations.

Key words:

Mentha longifolia L, seasonal variation, essential oil, chemotype, simultaneous extractio-distillation SDE, gas chromatography, mass spectroscopy GC/MS, gas chromatography with FID detector.

Alumna: Amal El ahrar

Tutor Académico: Prof. D. Juan Antonio Llorens Molina

Cotutora colaboradora: Dña. Sandra Vacas González

Cotutor: D. Vicente Castell Zeising

Valencia, 29 de Julio 2016

Agradecimientos

Me gustaría expresar me profundo agradecimiento a los directores de este trabajo.

A Juan Antonio Llorens Molina, por ofrecerme la oportunidad de realizar este estudio, por el seguimiento, la orientación, la supervisión continua y por sus correcciones realizadas.

A D. Vicente Castell Zeising , por ser mi cotutor , agradezco sus consejos y orientaciones.

A Dña. Sandra Vacas González por el tiempo dedicado a este trabajo.

Gracias por hacer posible la realización de este trabajo, por su paciencia, tiempo y dedicación.

A mis padres, por darme la vida y apoyarme en todo lo que me he propuesto.

A mi marido, por ser el apoyo más grande durante los momentos más difíciles. Gracias por cuidar de mí y de las plantas de este trabajo cuando yo no podía acudir.

A mi hermano, te agradezco el ayudarme a acabar mi educación universitaria, sin él no hubiera logrado mis metas y sueños.

A mis queridas amigas, Hiba, Karen, Elena, Vicky y Ángela sois el motor que me impulsa a ser mejor cada día, me habéis ayudado a integrar aquí, gracias por compartir las risas y los momentos más difíciles. Os quiero

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. ANTECEDENTES.....	1
1.2. IMPORTANCIA DEL GENERO <i>MENTHA</i>.....	1
1.3. <i>MENTHA LONGIFOLIA L</i>	2
1.3.1. Taxonómica y descripción de la <i>Mentha longifolia L</i>.....	2
1.3.2. Hábitat y ecología.....	3
1.3.3. Aplicación y usos	4
1.3.4. Composición química del aceite esencial.....	4
1.3.4.1. Definición de aceite esencial. Principales aplicaciones y métodos de obtención.....	4
1.3.4.2. Composición del aceite esencial obtenido de <i>Mentha longifolia L</i>	5
1.3.4.3. Variabilidad química en los aceites esenciales y quimiotaxonomía.....	6
1.3.4.4. Caracterización de los quimiotipos de <i>Mentha Longifolia L</i>	8
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	10
2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
2.2. OBJETIVOS	10

2.2. PLAN DE TRABAJO.....	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS	11
3.1. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	11
3.1.1. Material vegetal	11
3.1.2. Método de obtención y preparación de las muestras	12
3.2. OBTENCION DE LOS EXTRACTOS.....	14
3.2.1. Fundamentos.....	14
3.2.2. Reactivos y materia de laboratorio	15
3.2.3. Equipos de laboratorio.....	15
3.2.4. Método de obtención de los componetes volátiles: extracción y destilación simultáneas en equipo Likens-Nickerson.....	17
3.3. MATRIAL Y METODOS EN LAS TECNICAS CROMATOGRAFICA.....	18
3.3.1. Equipos y métodos de trabajo.....	18
3.3.1.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM).....	18
3.3.1.2. Cromatógrafía de gases con detector FID	19
3.3.2. Análisis e interpretación de los datos procedentes de los análisis por cromatografía de gases.....	19

3.3.2.1. Análisis cualitativo. Identificación de los componentes del aceite esencial de <i>Mentha longifolia</i> L.....	19
3.3.2.2 Datos procedentes de los análisis por GC-FID. Aproximación cuantitativa a la composición de las muestras.....	22
3.4. MATERIAL Y REACTIVOS UTILIZADOS PARA LA OBTENCION DE LOS EXTRACTOS CCF.....	22
3.4.1. Obtención de los extractos	23
3.4.2. Material y reactivos para CCF	23
3.4.2.1. Eluyentes.....	23
3.4.2.2. Reactivos.....	24
3.4.3. Procedimiento experimental.....	24
3.4.4. Clasificación de las parcelas según el perfil cromatográfico en CCF. Validación del método por GC/MS.....	25
3.5. MÉTODOS ESTADISTICOS.....	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1. CLASIFICACIÓN DE LAS PARCELAS SEGÚN EL PERFIL CROMATOGRAFICO EN CCF.....	27
4.2. Validación del método de clasificación por CCF mediante GC/MS.....	28

4.3. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS QUE FORMAN PARTE DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL DE <i>MENTHA LONGIFOLIA</i>	
L.....	30
4.3.1. Muestreo 1	30
4.3.1.1. Quimiotipo A.....	30
4.3.1.2. Quimiotipo B.....	30
4.3.1.3. Quimiotipo C.....	31
4.3.1.4. Quimiotipo D.....	31
4.3.1.5. Quimiotipo E.....	31
4.3.2. Muestreo 2	32
4.3.2.1. Quimiotipo A.....	32
4.3.2.2. Quimiotipo B.....	32
4.3.2.3. Quimiotipo C.....	32
4.3.2.4. Quimiotipo D.....	33
4.3.2.5. Quimiotipo E.....	33
4.3.3. Muestreo 3.....	33
4.3.3.1. Quimiotipo A.....	33
4.3.3.2. Quimiotipo B.....	34
4.3.3.3. Quimiotipo C.....	34
4.3.3.4. Quimiotipo D.....	34
4.3.3.5. Quimiotipo E.....	35
4.4. COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DURANTE EL SEGUIMIENTO.....	35
4.5. RESULTADOS DE LOS SEGUIMIENTOS DE TEMPERATURA Y HUMEDAD RELATIVA	36

4.6. ESTUDIO Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DEL ANALISIS DE ANOVA DE LOS MUESTREOS EFECTUADOS A CADA UNO DE LOS QUIMIOTIPOS.....	37
4.6.1. Quimiotipo A.....	37
4.6.2. Quimiotipo B.....	37
4.6.3. Quimiotipo C.....	38
4.6.4. Quimiotipo D.....	40
4.6.5. Quimiotipo E.....	41
5. CONCLUSIONES.....	44

6. BIBLIOGRAFÍA

7. ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Mentha Longifolia</i> L.....	2
Figura 2. Mapa de distribución de <i>Mentha longifolia</i> L. según los datos obtenidos en Asturnatura.com.....	3
Figura 3. Hábitat característico de la <i>Mentha longifolia</i> L. (confluencia de los ríos Jiloca y Pancrudo, provincia de Teruel)	4
Figura 4. Biosíntesis fundamental de la pulegona.....	6
Figura 5. Efecto de la edad de la hoja sobre la composición del aceite esencial de <i>Mentha piperita</i> L. (García Vallejo, 1990).....	7
Figura 6. Mapa de localización de la población anteriormente estudiada de <i>Mentha Longifolia</i> L.	11
Figura 7. Mapa localización de las parcelas de <i>Mentha longifolia</i> L. en el campus de la UPV.....	11
Figura 8. Plantas clasificadas por quimiotipos, a partir de las cuales se crearon las parcelas experimentales.....	12
Figura 9. Imagen de las cinco parcelas de <i>Mentha longifolia</i> L. en el primer muestreo....	12
Figura 10. Imagen de las cinco parcelas de <i>Mentha longifolia</i> L. en el segundo muestreo.....	13
Figura 11. Imagen de las cinco parcelas de <i>Mentha longifolia</i> L. en el tercer muestreo....	13
Figura 12. Esquema de un montaje para Destilación-Extracción Simultáneas (Likens-Nickerson)	14
Figura 13. Esquema Likens-Nickerson, (detalles fase orgánica y fase acuosa).....	14
Figura 14. Extractor Likens-Nickerson (Vidrafoc).....	16

Figura 15. Fotografía del Rotavapor Buchi.....	16
Figura 16. Fotografía de cromatógrafo de gases y un detector de masas Clarus 500 GC-M.....	19
Figura 17. Cromatograma de los patrones de la serie homóloga de los n-alcanos considerados.....	20
Figura 18. Ejemplo de cromatograma obtenido por CG-EM.....	20
Figura 19. Espectro de masas de un pico procedente del cromatograma.....	21
Figura 20. Espectro de masas de la sustancia.....	21
Figura 21. Informe que indica el listado de posibles sustancias a las que corresponde el pico considerado.....	21
Figura22. Cubeta	25
Figura23. Vitrina de gases.....	25
Figura 24. Lámpara UV con cabina de visualización (Vilbert Lourmat 254 y 365 nm).....	25
Figura 25. Cálculo del intervalo de Rf para una mancha representativa del quimiotipo A.....	25
Figura 26. Cromatogramas obtenidos utilizando los tres reactivos mencionado anteriormente en su orden respectivo (vainillina, anisaldehído sulfúrico y ácido fosfomolíbico).....	27
Figura 27. Cromatogramas obtenidos con vainillina y anisaldehído sulfúrico. En este último se marcan las zonas posteriormente analizadas mediante espectroscopía de masas.....	28
Figura 28. Espectros de masas de las bandas analizadas (indicadas en la figura 27). En ellas se representa el tiempo de retención en abcisas.....	28

Figura 29. Cromatogramas obtenidos con vainillina y anisaldehído sulfúrico. En este experimento, análogo al descrito en la figura 29, se analizan de nuevo algunas zonas para verificar a qué compuesto.....	29
Figura 30. Espectros de masas de las bandas identificadas en las zonas indicadas en la figura 29.....	29
Figura 31. Grafica de temperatura y humedad relativa diarias a lo largo de ciclo vegetativo.....	36
Figura 32. Intervalos LSD para, piperitone oxide (cis + trans) + carvone oxide y beta cariofilene.....	37
Figura 33. Intervalos LSD para (acetato de α -terpineol, β -cariofilene, germacrene-D y acetato de carvona).....	39
Figura 34. Intervalos LSD de 1,8-cineol, Dihydrocarvone cis+trans, β -cariofilene y germacrene-D.....	41
Figura 35. Intervalos LSD de isomentona, pulegona, β -cariofilene, germacrene-D...	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de la composición de <i>Mentha Longifolia</i> L. procedente de 4 orígenes geográficos distintos.....	5
Tabla 2. Composición del aceite esencial del quimiotipo A en el muestreo 1....	30
Tabla 3. Composición del aceite esencial del quimiotipo B en el muestreo 1....	30
Tabla 4. Composición del aceite esencial del quimiotipo C en el muestreo 1.....	31
Tabla 5. Composición del aceite esencial del quimiotipo D en el muestreo 1.....	31
Tabla 6. Composición del aceite esencial del quimiotipo E en el muestreo 1.....	31
Tabla 7. Composición del aceite esencial del quimiotipo A en el muestreo 2.....	32
Tabla 8. Composición del aceite esencial del quimiotipo B en el muestreo 2.....	32
Tabla 9. Composición del aceite esencial del quimiotipo C en el muestreo 2.....	32
Tabla 10. Composición del aceite esencial del quimiotipo D en el muestreo 2.....	33
Tabla 11. Composición del aceite esencial del quimiotipo E en el muestreo 2....	33
Tabla 12. Composición del aceite esencial del quimiotipo A en el muestreo 3.....	33
Tabla 13. Composición del aceite esencial del quimiotipo B en el muestreo 3.....	34
Tabla 14. Composición del aceite esencial del quimiotipo C en el muestreo 3....	34
Tabla 15. Composición del aceite esencial del quimiotipo D en el muestreo 3....	34
Tabla 16. Composición del aceite esencial del quimiotipo E en el muestreo 3.....	35

Tabla 17. Resultados de la composición química a lo largo del ciclo vegetativo de la planta..... 35

Tabla 18. Resultado del análisis estadístico utilizando el análisis múltiple de rangos mediante el test de Tukey para $P < 0.05$ 43

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCION

1.1. ANTECEDENTES.

El cultivo de plantas aromáticas y medicinales, también conocidas como PAM, es tradicional en los climas mediterráneos. Estas plantas forman parte del paisaje característico de la Península Ibérica y se utilizan desde la antigüedad para muy diversas aplicaciones, destacando, entre otras, las medicinales y gastronómicas.

El cultivo de las PAM goza de gran relevancia, ya que:

- Es una alternativa social, económica y medioambiental interesante.
- Desempeña una labor dinamizadora del sector agrario y del medio rural, ya que supone una buena alternativa de rotación de cultivos en zonas de rendimientos bajos o en zonas de limitaciones naturales.
- Genera puestos de trabajo, en el proceso de transformación y comercialización del producto, es decir, implica una actividad industrial.
- Forma parte del paisaje mediterráneo y evita la erosión del mismo además de fomentar el turismo rural.
- Posee bajas exigencias nutricionales; de este modo, está adaptado al suelo y clima de nuestra zona. El uso de fertilizantes es bajo y es bastante resistente a plagas y enfermedades.

Según ANIPAM (Asociación Nacional Interprofesional De Plantas Aromáticas Y Medicinales) en España se cultiva 7000 ha de PAM más las plantas procedentes de recolección silvestre. El sector de PAM es muy amplio, diverso y poco delimitado, abarcando muchas especies. Los principales productos derivados de las PAM son:

1. Material vegetal consumido en fresco.
2. Material vegetal consumido en seco, constituido por la planta entera o partes de la misma.
3. Extractos obtenidos mediante la aplicación de diferentes técnicas de extracción de los principios activos. Cuando estos son el resultado de la destilación con vapor de agua o de la expresión en frío, dichos extractos son los denominados aceites esenciales, productos de especial importancia comercial por sus numerosas aplicaciones.

Las características que determinan la calidad de las plantas aromáticas y medicinales son el contenido en metabolitos secundarios, el rendimiento en biomasa, la fácil trazabilidad, la buena identificación de especies y el conocimiento de la calidad y variación de compuestos químicos a lo largo de su ciclo biológico.

1.2. IMPORTANCIA DEL GENERO MENTHA.

La familia de las *Lamiaceae* comprende unas 3.000 especies de plantas distribuidas por las regiones cálidas y templadas de todo el mundo. Son fundamentalmente hierbas y arbustos, muy

aromáticos y ricos en principios activos, por lo que son muy valoradas en la medicina natural y en la farmacopea.

Comprende unos 200 géneros y entre los más significativos se encuentra la *Mentha*. El género *Mentha* L. (subfam. *Nepetoideae*, tribu *Mentheae*), originario de las regiones templadas de Europa y Asia, se encuentra distribuido en los 5 continentes (Harley y Brighton, 1977; Gobert et al., 2002). Su taxonomía es complicada dada la alta frecuencia de hibridación, la cantidad de especies poliploides y la gradual variación morfológica, tanto intra- como interespecífica; ello se agudiza aún más en los híbridos ya que algunas de las poblaciones presentan caracteres predominantes de uno u otro progenitor (Harley y Brigton, 1977, Mabberley, 1997).

Dentro del género *Mentha*, las cinco especies básicas de Eurasia y África son:

M. arvensis L. o Menta negra o japonesa.

M. aquatica L. o Menta blanca.

M. spicata L. o Hierbabuena.

M. longifolia L. o Menta silvestre o borde.

M. suaveolens L. o Mastranzo.

1.3. *MENTHA LONGIFOLIA* L.

1.3.1. Taxonomía y descripción de la *Mentha Longifolia* L.

El encuadre sistemático de la especie *Mentha Longifolia* L. es el siguiente:

División: *Magnoliophyta*.

Clase: *Magnoliopsida*.

Orden: *Labiales*.

Familia: *Lamiaceae*.

Género: *Mentha*.

Especie: *Mentha longifolia* L.

Su nombre común es menta de caballo, hortolana, menta silvestre o mentastro.



Figura 1. *Mentha Longifolia* L.

Esta especie cubre la más extensa zona geográfica y en consecuencia muestra la mayor variabilidad. Por lo tanto, a finales del siglo XX algunos taxonomistas, tales como Borissova

(1954) y Jamzad (1987), publicaron incluso más especies nuevas en total, que no habían sido claramente identificadas en estudios anteriores (Lawrence, 2006).

La *M. longifolia* es una planta aromática perenne, herbácea, cuyas hojas poseen el siguiente tamaño: 15 – 115 x 6 – 42 mm y son sésiles o cortamente pecioladas, de forma lanceolada, lisa o algo rugosa en la base, con el margen provisto de dientes irregulares y patentes. El haz es gris tomentoso y el envés de color ceniciento por la presencia de una pilosidad afelpada gris o blanquecina. Crece sobre todo en lugares de semi-sombra y suelos húmedos (Qaiser y Nazimuddin, 1981; Shinwari y Chaudheri, 1992; Ibrar et al, 2007; Sher y Khan, 2007; Shinwari et al., 2011). Presenta en ocasiones estolones acuáticos, erguidos, que llegan a 120 cm de altura.

Al igual que otros miembros del género *Mentha* se utiliza como remedio debido a sus propiedades antisépticas y efectos beneficiosos sobre la digestión (Karousou et al., 2007). Los brotes en época de floración poseen efectos antiasmáticos, antiespasmódicos, carminativos y estimulantes considerables (Chopra et al., 1986). El té preparado a partir de sus hojas se utiliza en el tratamiento de la fiebre, dolores de cabeza, trastornos digestivos y diversas enfermedades menores (Foster & Duke, 1990).

Las flores, hermafroditas y pediceladas, se reúnen en inflorescencias bracteadas y ramificadas formadas por numerosos verticilastros que forman espigas densas y cilíndricas, unas 6 por tallo, de 4 – 10 x 1 – 1.5 cm. El cáliz, de hasta 3 mm, está formado por un tubo estrechamente campanulado, piloso, verde, aunque a veces coloreado en la parte superior, que se abre al exterior por 5 dientes de hasta 1.2 mm, subiguales, ya que a veces los dos inferiores son algo más largos. La corola, de 3 – 3.5 mm, de color lila o blanco, está formada por un tubo que tiene en el extremo dos pequeños labios apenas marcados, el superior escotado y rosado, y el inferior con 3 pequeños lóbulos iguales. El androceo está formado por 4 estambres exsertos, con anteras púrpuras de forma elipsoidal; el gineceo consta de un ovario súpero dividido en 4 del que surge un estilo con un estigma bifido. Florece de mayo a octubre. El fruto es una núcula de 0.54 – 0.79 mm, de elipsoide a subtrígono, de color pardo claro.

1.3.2. Hábitat y Ecología.

Esta especie crece en juncales, pastizales y herbazales en suelos hidromorfos, frecuentemente al borde de acequias, ríos y ramblas. En la siguiente figura se muestra su distribución en la Península Ibérica (Figura. 2)



Figura 2. Mapa de distribución de *Mentha longifolia* L. según los datos obtenidos en www.asturnatura.com

Sus principales requerimientos ecológicos son:

Luz: Penumbra.

Temperatura: Calor moderado.

Humedad: Suelos húmedos o muy húmedos.

Acidez: Suelos ricos en bases; pH 5,5-8.

Nitrógeno: Principalmente suelos ricos, indicadora en riqueza de nutrientes



Figura 3. Hábitat característico de la *Mentha longifolia L.* (confluencia de los ríos Jiloca y Pancrudo, provincia de Teruel).

1.3.3. Aplicaciones y Usos.

Se ha utilizado desde tiempos remotos en la medicina popular para tratamientos de bronquitis, flatulencia, anorexia, colitis, úlceras y problemas del hígado.

Estos efectos son debidos a la actividad antiinflamatoria, carminativa, antiemética, diaforética, antiespasmódica, analgésica, estimulante, emenagogo y anticatarral. (Gulluce et al., 2007). También tiene aplicaciones culinarias. Las hojas, crudas o cocinadas, se emplean como aditivo a las comidas, especialmente para aromatizar ensaladas o cocidos. El aceite esencial de sus hojas se emplea también en repostería.

1.3.4. Composición química del aceite esencial

1.3.4.1. Definición de aceite esencial. Principales aplicaciones y métodos de obtención

Según la *International Standard Organization (I.S.O.)*, un aceite esencial se define como “Un conjunto de productos volátiles que se obtienen de materiales naturales por destilación con agua o por corriente de vapor o, si se trata de frutos de cítricos, por un proceso mecánico de expresión en frío, con un proceso posterior de separación de la fase acuosa”; por lo tanto, productos obtenidos por otras técnicas como extracción con disolventes o extracción con fluidos supercríticos no son técnicamente considerados aceites esenciales (Baser, 1995). Desde un punto de vista más amplio, que abarca aquellos extractos en los que predomina la fracción volátil o semivolátil de los metabolitos secundarios, pueden emplearse además de los estrictamente relacionados con la definición de aceite esencial, otros métodos extractivos en base a las propiedades del material vegetal procesado. Algunos de los más importantes son: extracción con disolventes, maceración, métodos de prensado, “enfleurage”, extracción con fluidos supercríticos, extracción con líquidos presurizados, extracción-destilación simultánea,

extracción con Soxhlet o hidrodestilación asistida por microondas (MAHD), entre otros (Zellner et al., 2010). Por otro lado, existen algunos métodos como son la evaporación de aromas asistida con disolventes (SAFE), la microextracción sólido-fase (SPME) o la desorción térmica directa (DTD), que se aplican directamente al material vegetal

Desde el punto de vista químico, los aceites esenciales son mezclas de diferentes tipos de compuestos, entre los que destacan los monoterpenos y sesquiterpenos, con sus derivados oxigenados, así como otros tipos de sustancias como fenilpropanoides o alcoholes y cetonas alifáticas. Estos compuestos, principalmente los oxigenados, proporcionan el aroma característico a algunas flores, árboles, frutos, hierbas, especias, semillas y a ciertos extractos de origen animal. Se trata de productos químicos intensamente aromáticos, volátiles por naturaleza y livianos. Son poco solubles en agua, y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales y pueden oxidarse por exposición al aire.

Las denominadas “plantas aromáticas” son las especies que producen aceites esenciales que tienen algún tipo de interés comercial. Más del 90% de la producción se utiliza como materia prima en la industria de la cosmética (perfumes y productos para la piel y el cabello), alimentaria (aromatizantes), farmacéutica (antimicrobianos principalmente) y herboristería (aromaterapia) (Isman et al., 2011; Lubbe & Verpoorte, 2011).

1.3.4.2. Composición del aceite esencial obtenido de *Mentha longifolia* L.

El examen de la literatura publicada sobre la composición del aceite de *M. longifolia ssp. longifolia* revela una elevada quimiodiversidad. La Tabla 1 muestra, a modo de ejemplo, la composición de los aceites esenciales procedentes de 4 orígenes distintos.

Tabla 1. Comparación de la composición de *Mentha Longifolia* L. procedente de 4 orígenes geográficos distintos.

COMPUESTO	% Composición (Túnez)	% Composición (Senegal)	% Composición (Turquia)	% Composición (Irán)
α -Pino				14.28
Camfeno				1.86
Sabineno				7.06
β -Mirceno				3.98
1,8-cineol	7.41	13.1		20.72
Óxido de linalool	1.17			
Alcanfor	1.67		1,6	
Mentona		14.3	7,9	
Isomentona	12.02	9.0	6,6	
Borneol	6.85			
Isopulegona				1.17
α -terpineol	1.52	1.8		
Pulegona	54.41	52.0	15,5	7.81
Carvona			4,9	
Piperitenona		1.4	1	
Óxido de piperitenona	3.19		14,7	26.71
β -cariofileno	2.04		2,6	
α -humuleno	2.97		4.23	

1.3.4.3. Variabilidad química en los aceites esenciales y quimiotaxonomía

Una de las peculiaridades del reino vegetal es la capacidad de producción de sustancias que no son imprescindibles para su supervivencia, denominados metabolitos secundarios. Son sustancias que no participan en el crecimiento y desarrollo de la planta pero que, sin embargo, aportan al individuo que la produce la capacidad de responder a estímulos externos y permiten interacciones ecológicas de la planta con su entorno. En las plantas del género *Mentha*, los metabolitos secundarios más importantes son los terpenoides (o isoprenoides) como, por ejemplo: carvona, óxido de piperitona, pulegona, óxido de piperitenona, etc., cuyo esqueleto molecular común es el mentano (1-isopropil-4-metilciclohexano). Muchos de estos metabolitos secundarios poseen una importante actividad biológica. Es necesario entonces determinar en qué medida los taxones vegetales se corresponden con una determinada composición química, ya que no son tan fáciles de distinguir a partir de rasgos morfológicos.

La quimiotaxonomía ha sido ampliamente utilizada para clasificar las plantas intraespecíficamente en polimorfismos. La composición química de los aceites esenciales ha jugado un papel importante para este fin. El polimorfismo químico en las plantas aromáticas es, por tanto, un fenómeno ampliamente descrito. En este sentido, es necesario investigar sobre las poblaciones y sobre individuos concretos para conocer la variabilidad intraespecífica de las especies. Los aceites esenciales son el producto final de un complejo proceso biológico, y un prerequisite para mejorar la productividad en cultivo es el conocimiento de los factores que determinan dicha variabilidad, tanto en su cantidad (rendimiento) y calidad (composición química) (Franz & Novak, 2010).

Entre dichos factores figuran: **1. Factores ambientales.** (Intensidad de la luz, duración de los periodos de iluminación, temperatura); tienen una influencia decisiva en la composición y calidad de ciertos aceites esenciales, como el de *Mentha piperita L.*, porque determinan que la biosíntesis fundamental siga una vía u otra diferente. El proceso (1) de la Figura 15, en que la pulegona se transforma principalmente en mentona, y ésta, sucesiva y parcialmente, en mentol y acetato de mentilo, se ve favorecido por una alta intensidad de la luz, bajas temperaturas nocturnas y días largos y templados (temperatura media en torno a 20° C).

La riqueza de estos componentes aumenta la calidad de esta esencia. Por el contrario, una intensidad de luz baja, temperaturas nocturnas altas, días cortos y temperaturas diurnas muy variables, favorecen el proceso (2), formación de mentofurano, provocando la disminución de la calidad de la esencia (García et al., 1987).

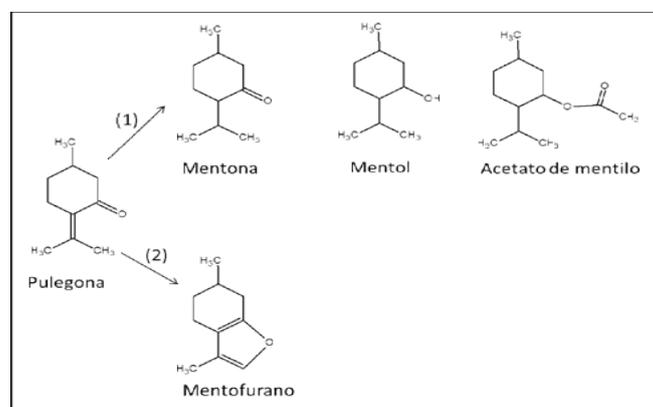


Figura 4. Etapa final de la biosíntesis de la pulegona

2. Condiciones geobotánicas del medio. Clima, altitud, tipo de suelo, cantidad de lluvias, etc. La concentración del aceite esencial en las plantas es más elevada durante el tiempo cálido y ésta es la mejor época de recolección (Figueiredo et al., 2008).

3. Método de cultivo. Uso de fertilizantes, abono, pesticidas, otros químicos, etc.

4. Edad de la planta y estado fenológico. En muchas especies en las que la biosíntesis del aceite esencial y su acumulación tienen lugar principalmente en las hojas, la composición del aceite esencial varía con la edad de éstas; como ejemplo tenemos *la Mentha piperita*. En la figura 16 se representa la variación de las composiciones de los aceites esenciales con la edad de sus hojas.

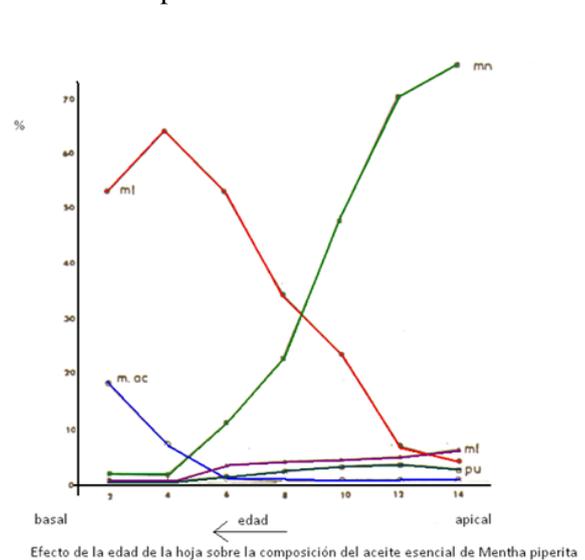


Figura 5. Efecto de la edad de la hoja sobre la composición del aceite esencial de *Mentha piperita* L. (García Vallejo, 1990).

Como se aprecia en esta figura, las hojas apicales (las más jóvenes) dan un aceite formado principalmente por mentona; mientras que las hojas basales (las más viejas) están constituidas fundamentalmente por mentol y acetato de mentilo. Para una calidad satisfactoria de este aceite esencial se requieren concentraciones equilibradas de mentol, mentona y acetato de mentilo. El contenido de estos compuestos debe ser por lo menos 45% de mentol y 15-18% de mentona e isomentona, mientras que la cantidad indeseable de mentofurano debe ser inferior al 1,5% (Aflatuni, 2005). Por este motivo, el material vegetal destilado debe estar formado por una mezcla equilibrada de hojas jóvenes y adultas y, a ser posible, con una cantidad mínima de flores.

5. Época de recolección y parte de la planta. Los aceites esenciales se encuentran localizados en determinados órganos del vegetal: flores, tallos, hojas, frutos o raíces. En ocasiones las diferentes partes de la misma planta suministran esencias distintas en su composición; por ejemplo, los aceites extraídos de la raíz, el tallo, y las hojas del hinojo. La canela de Ceilán encierra en la corteza una esencia rica en el aldehído cinámico, mientras que en sus hojas y en las raíces predominan el eugenol y el alcanfor, respectivamente. La cantidad y composición del aceite varía de una especie a otra, y dentro de los mismos géneros de la planta.

Cuando se tiene el objetivo de estudiar o mejorar especies para su cultivo es determinante considerar que la variación química de los aceites esenciales está causada por factores genéticos y fisiológicos. Por lo tanto, caracterizar e identificar quimiotipos es un requisito fundamental cuando se trabaja con material vegetal para estudios químicos, agronómicos o farmacológicos,

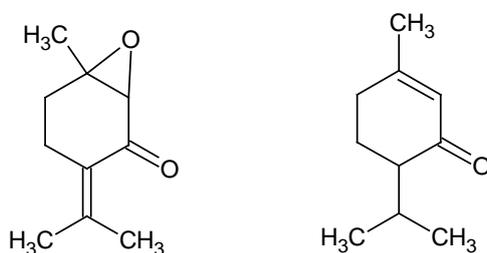
ya que las actividades biológicas de los productos derivados de este material vegetal (en este caso aceites esenciales) pueden variar si hay cambios en su composición química.

1.3.4.4. Caracterización de los quimiotipos de *Mentha longifolia* L.

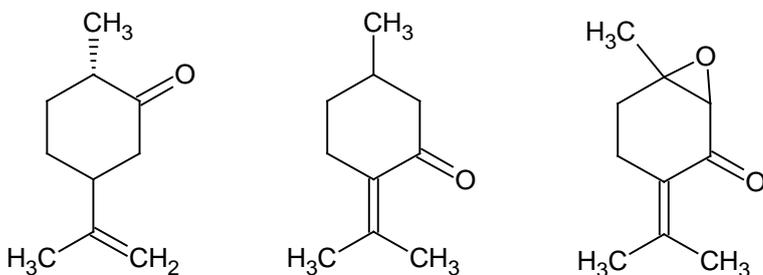
En otro trabajo anterior (c), se estudió la quimiodiversidad de varias poblaciones de *Mentha Longifolia* L. localizadas en la provincia de Teruel, mediante el análisis del aceite esencial obtenido de plantas individuales. Uno de los principales resultados de este trabajo fue evidenciar la coexistencia en una de las poblaciones de hasta cuatro quimiotipos claramente definidos en una extensión muy limitada de unos 300-400 m de las riberas de los ríos Jiloca y Pancrudo en su confluencia. En un trabajo posterior (Bonet, 2015) se trasladaron muestras individuales (raíces) para su propagación vegetativa y posterior desarrollo en invernadero, caracterizando el perfil cromatográfico por CCF de las muestras individuales, lo que permitió discriminar claramente hasta cinco perfiles químicos diferentes, que son los considerados en este trabajo.

Posteriormente, se reunió el material vegetal correspondiente a las plantas que presentaban el mismo perfil cromatográfico y se obtuvieron los aceites esenciales por hidrodestilación, analizando su composición mediante cromatografía de gases con detector de espectroscopía de masas. De este modo, se establecieron cinco quimiotipos caracterizados por los siguientes compuestos mayoritarios:

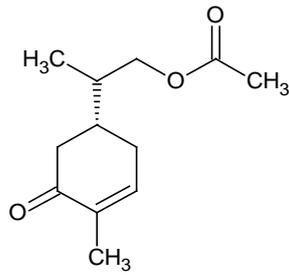
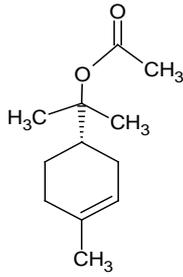
A: Óxidos de piperitenona y piperitona, respectivamente:



B: (*E*)-Dihidrocarvona, pulegona y óxido de piperitona, respectivamente:

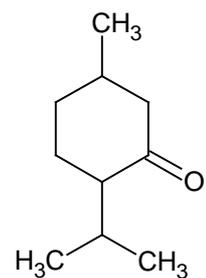
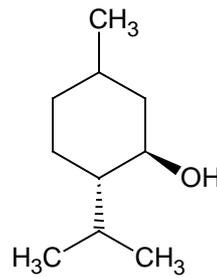
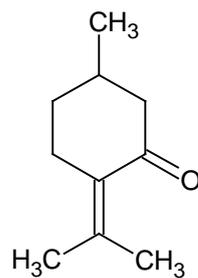
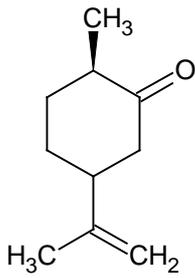


C: Acetato de α -terpineol y acetato de carvona



D: (Z)-Dihidrocarvona

E: Pulegona, mentol e isomentona, respectivamente.



Con el material vegetal correspondiente se crearon cinco pequeños cultivares, químicamente homogéneos desde el punto de vista de la composición del aceite esencial.

OBJETIVOS

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como ya se indicó anteriormente, a través de anteriores trabajos se ha llegado a disponer de cinco pequeñas parcelas correspondientes a cinco quimiotipos bien definidos de *M. longifolia*. Dado que se hallan en el mismo emplazamiento, la variabilidad debida a factores edafoclimáticos puede descartarse. Por otra parte, si centramos el estudio en la composición de las hojas utilizando un mismo método de extracción, podemos evaluar la influencia de la variabilidad ontogenética (variabilidad a lo largo del ciclo vegetativo), controlando así el resto de factores de variabilidad. Su conocimiento permitiría obtener finalmente un producto que se ajuste a los estándares de composición deseados.

2.2. OBJETIVOS

Sobre la base de las consideraciones anteriores, los objetivos de este trabajo son:

- I. Confirmar la identidad de los quimiotipos previamente identificados y cultivados en cada una de las cinco parcelas experimentales.
- II. Estudiar mediante las herramientas estadísticas apropiadas la variabilidad química de dichos cultivares a lo largo de su ciclo vegetativo comparando la composición de a ceite esencial en tres estados fenológicos característicos: desarrollo vegetativo avanzado, comienzo floración y floración avanzada.

2.3. PLAN DE TRABAJO

Para el logro de estos objetivos, se ha desarrollado el siguiente plan de trabajo:

- Cultivo de los quimiotipos definidos en el trabajo de (Bonet 2015) en cinco parcelas independientes del campus de Vera Universidad politécnica de valencia.
- Seguimiento de las plantas desde el inicio del desarrollo vegetativo hasta la post-floración.
- Llevar a cabo un ensayo mediante cromatografía en capa fina (CCF) para validar el método de selección de quimiotipos introducido en estudios anteriores, verificando mediante CCF preparativa y GC/MS, la identidad de las manchas que permiten discriminar la naturaleza de los quimiotipos.
- Recolección del material vegetal en tres muestreos: (Desarrollo vegetativo avanzado), (comienzo floración), (plena floración).
- Extracción de la fracción volátil de las muestras
- Identificación y cuantificación de la composición del aceite esencial para cada quimiotipo en los tres estados fenológicos considerados.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

3.1.1. Material vegetal

El material vegetal que se utilizó para la propagación en las cinco parcelas de cada quimiotipo procede de un enclave situado en la provincia de Teruel, denominado Entrambasaguas, próximo a la ermita de la Virgen del Rosario, en la confluencia del río Jiloca y su afluente el Pancrudo. Las coordenadas geodésicas son: latitud: 40° 58' 05.87'' N, longitud: 1° 18' 45.42'' O y altitud: 854 m.



Figura 6. Mapa de localización de la población anteriormente estudiada de *Mentha longifolia L.*

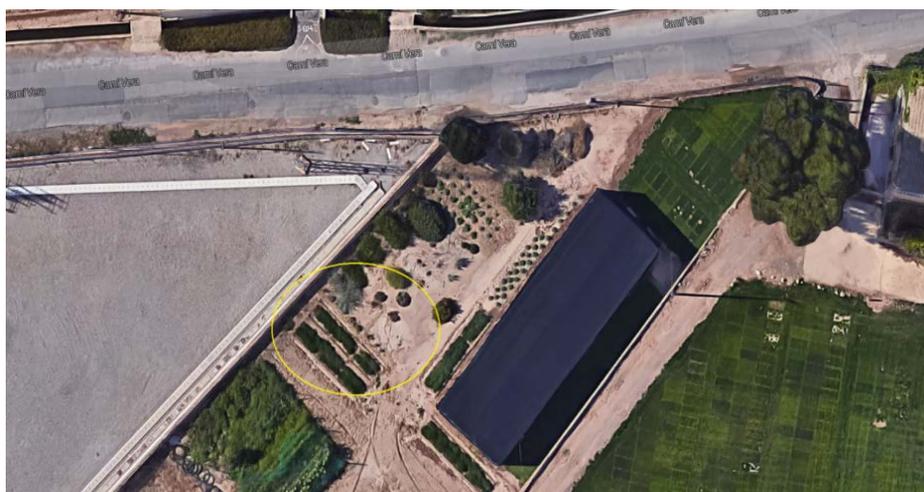


Figura 7. Mapa localización de las parcelas de *Mentha longifolia L.* en el campus de la UPV.

3.1.2. Método de obtención y preparación de las muestras



Figura 8. Plantas clasificadas por quimiotipos, a partir de las cuales se crearon las parcelas experimentales.

El seguimiento de las plantas empezó en el mes de enero, al comienzo de su desarrollo vegetativo. Las condiciones edafoclimáticas de las parcelas eran idénticas y la frecuencia de riego de 3 a 4 veces por semana. Para el correcto desarrollo de los individuos en estudio se procedió a la eliminación y el control de las malas hierbas manualmente. La recolección de las muestras del material vegetal se efectuó en tres estados fenológicos característicos: El primer muestreo se realizó el 28 de abril, cuando las plantas se encontraban en una fase avanzada de desarrollo o prefloración. El segundo muestreo se hizo el 26 de mayo, cuando comenzó la floración. El tercero se efectuó el 8 de junio en plena floración. Uno de los quimiotipos tuvo una floración tardía (el quimiotipo C) como se puede apreciar en la figura 10.



Figura 9. Imagen de las cinco parcelas de *Mentha longifolia* L. en el primer muestreo



Figura 10. Imagen de las cinco parcelas de *Mentha longifolia L.* en el segundo muestreo



Figura11. Imagen de las cinco parcelas de *Mentha longifolia L.* en el tercer muestreo

En los muestreos se seleccionaron 40 hojas aleatoriamente sobre toda la superficie de cada una de las parcelas, se repitió el proceso 3 veces para cada quimiotipo.

Posteriormente se almacenaron en bolsas de polietileno. Una vez las muestras estaban en el laboratorio, se conservaron a -40°C hasta el momento del análisis.

3.2. OBTENCION DE EXTRACTOS

3.2.1. Fundamentos

La obtención de la fracción volátil y semivolátil de cada una de las muestras se llevó a cabo mediante extracción-destilación simultáneas con un equipo Likens-Nickerson (Figura 18) (Chaintreau, 2001).

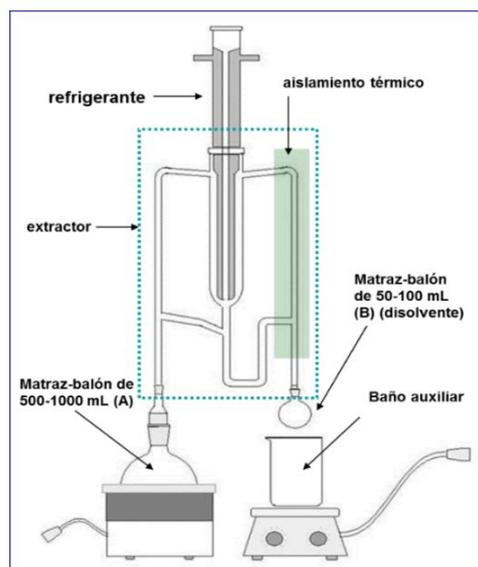


Figura 12. Esquema de un montaje para Destilación-Extracción Simultáneas (Likens-Nickerson)

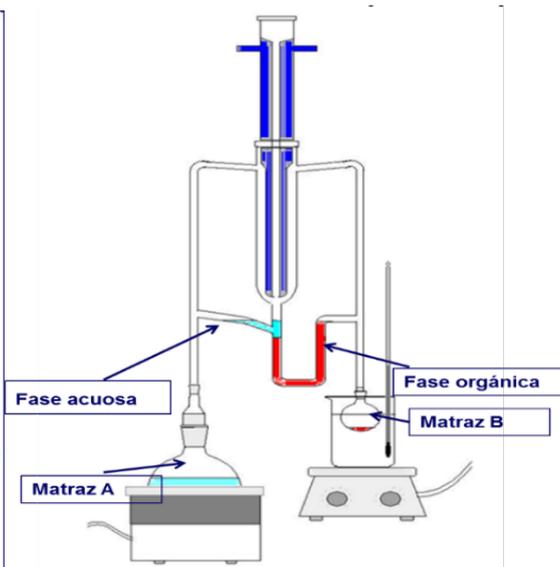


Figura 13. Esquema Likens-Nickerson, (detalles fase orgánica y fase acuosa)

Inicialmente, se introduce el material vegetal triturado en el matraz A con agua destilada, (Figura 11), en una proporción aproximada de 10 ml de agua/g de material vegetal fresco. Se calienta a ebullición, con lo cual se produce un arrastre de la fracción volátil de la planta por el vapor de agua. Simultáneamente, en el matraz B, se introduce una pequeña cantidad de disolvente que se calienta con un baño de agua auxiliar (Figura 11), de manera que los vapores del disolvente y el vapor de agua que arrastra la fracción volátil del material vegetal llegan a un mismo refrigerante donde entran en contacto, produciéndose una extracción de los componentes del aceite esencial arrastrados del material vegetal, por el disolvente orgánico. En el refrigerante se condensan los vapores que se separan en dos fases líquidas: la fase orgánica con los compuestos extraídos y la fase acuosa. El equipo se completa con un sistema que, aprovechando la separación en dos fases, envía la fase orgánica al matraz que inicialmente contenía el disolvente puro (B) y la fase acuosa al matraz con el material vegetal (A) (Figura 12).

De esta forma el matraz con disolvente orgánico se va enriqueciendo en productos extraídos, ya que el sistema funciona durante un tiempo prolongado (2 h en este caso), la extracción siempre se lleva a cabo con disolvente puro a su temperatura de ebullición.

3.2.2. Reactivos y material de laboratorio

El desarrollo de las extracciones, así como el conjunto de las experiencias preliminares fue llevado a cabo con los siguientes reactivos y material de laboratorio:

- Agua destilada, utilizada en las extracciones con el equipo Likens-Nickerson
- Diclorometano (DCM) Panreac para análisis de residuos por cromatografía de gases, estabilizado con aproximadamente 500 ppm de amileno, para la disolución del aceite esencial en la preparación de muestras para ser analizadas por cromatografía de gases
- Sulfato de sodio anhidro, PANREAC, para la deshidratación de los extractos
- Soporte con dos nueces y pinzas para el montaje del extractor Likens-Nickerson
- 2 vasos de precipitados de 1 L
- Matraz-balón de 500 mL (esmerilado 29/32) con manta calefactora
- Matraz-balón de 100 mL (esmerilado 14/23)
- Placa calefactora
- Termómetro
- Adaptador 14/23-29/32 para Likens-Nickerson (Vidrafoc)
- Clips de sujeción para los matraces balón (dos para 14/23 y uno para 29/32)
- Matraz-balón rotavapor
- Embudo de vidrio
- Embudo de sólidos
- Pipetas Pasteur
- Probeta 10 mL
- Viales 10 mL
- Espátula
- Parafilm.

3.2.3. Equipos de Laboratorio

1. Un equipo Likens-Nickerson marca Vidrafoc, descrito a continuación:



Figura 14. Extractor Likens-Nickerson (Vidrafoc)

2. Rotavapor marca Buchi R-3000, con bomba de vacío marca Buchi V-700 y un módulo de vacío Buchi V-801 Easy Vac. El rotavapor consta de cuatro partes:

- baño de agua.
- matraz con el disolvente.
- refrigerante que ajusta herméticamente en el extremo superior con la parte superior del matraz con el disolvente y en el extremo inferior con el matraz colector del disolvente.
- matraz colector del disolvente.
-

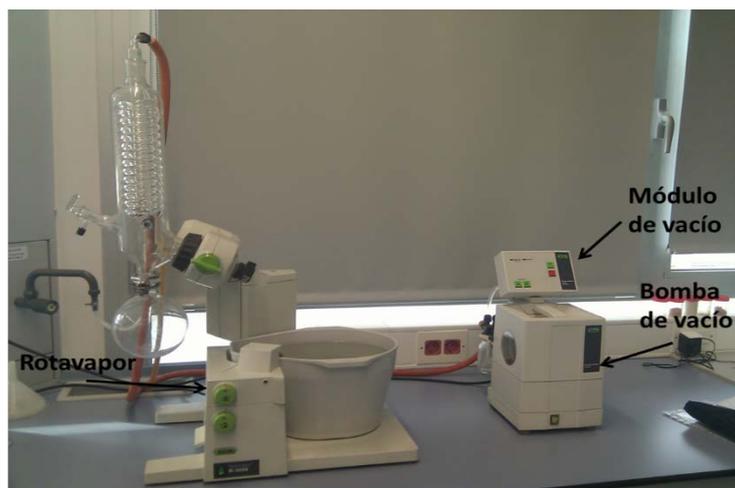


Figura 15. Fotografía del Rotavapor Buchi

Con el rotavapor se elimina el disolvente a presión reducida. Sirve para la concentración del aceite esencial. Si se desea disponer del aceite esencial puro y determinar el rendimiento (m/m), no hay más que separar el diclorometano con el rotavapor.

3.2.4. Método de obtención de los componentes volátiles: extracción y destilación simultáneas en equipo Likens-Nickerson

Puesta en marcha y desarrollo de la extracción-destilación:

1. Se pesa la muestra en el matraz-balón de 500 mL (matraz A). Se añade 300 mL de agua destilada y se coloca en su manta calefactora.
2. Se incorpora el extractor-destilador Likens-Nickerson que debe estar perfectamente limpio y seco. Se conecta la manta calefactora.
3. Se introduce DCM en el extractor-destilador. Se añaden también 10 mL de DCM en el matraz-balón de 100 mL (matraz B) y se incorpora al equipo.
4. Se coloca el refrigerante y se conecta el equipo de refrigeración cuando comienza la ebullición en el matraz A (El agua de refrigeración debe estar a una temperatura no superior a 20°C). Se calienta agua en un vaso de precipitados de 1 L en el horno microondas hasta una temperatura de 65-70°C.
5. Poco antes de que comience a condensar vapor de agua procedente del matraz A, se sumerge el matraz B en el baño caliente, situándolo sobre una placa calefactora de manera que su temperatura se mantenga en torno a 60-65°C durante todo el proceso.
6. A lo largo de todo el proceso de extracción-destilación debe mantenerse una ebullición suave y constante en el matraz A y apreciarse un flujo de retorno constante de DCM hacia el matraz B.

Finalización y obtención de la muestra para el análisis:

1. Se desconecta la manta calefactora unos 10 min antes del tiempo previsto para la finalización del proceso. Cuando cesa la ebullición y deja de apreciarse condensación en el refrigerante, se espera unos minutos, se quita el matraz B del baño caliente y se introduce en un baño de agua fría.
2. Transcurridos unos 10 min, se quita el refrigerante y se suelta el extractor-destilador del matraz A. Se inclina cuidadosamente de modo que todo el DCM del codo del extractor-destilador se vierta en el matraz B, evitando que pase agua al mismo.
3. Se añade en el matraz B dos cucharadas de sulfato de sodio anhidro con ayuda de un embudo de sólidos, se agita y se deja reposar 2 o 3 min. A continuación, se trasvasa el extracto por decantación al matraz del rotavapor.
4. Se concentra el extracto obtenido en el rotavapor hasta un volumen ligeramente inferior a 5 mL. Con ayuda de una pipeta Pasteur, se trasvasa el extracto concentrado a un vial.

5. Posteriormente, se sella con parafilm, se etiqueta convenientemente y se guarda a -18 °C.

3.3. MATERIAL Y MÉTODOS EN LA TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

En las determinaciones analíticas realizadas en este trabajo se ha utilizado la cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) para la cuantificación aproximada basada en el método de normalización de las áreas de los picos, al que nos referiremos posteriormente, y con detector de espectroscopia de masas (CG-EM) para la identificación inicial de los componentes de las muestras de aceite esencial.

3.3.1. Equipos y métodos de trabajo

3.3.1.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM)

El equipo empleado consta de un cromatógrafo de gases y un detector de masas Clarus 500 GC-MS (Perkin-Elmer Inc. Wellesley, EEUU) equipado con una columna capilar ZB-5 (5% fenil – 95% dimetilpolisiloxano) (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm; Phenomenex Inc., Torrance, EEUU). La fase móvil es el gas Helio con un caudal de 1,2 mL/min. La temperatura del inyector es de 250°C, mientras que la temperatura del horno se programó desde 50°C a 250°C a razón de 3°C/min. La detección se realizó en modo de ionización de impacto electrónico (modo: impacto electrónico (EI), 70 eV), siendo la temperatura de la fuente de ionización 200°C. Los espectros se obtuvieron mediante el modo de escaneo total de iones (rango de masas m/z 45-500 uma).

Los cromatogramas y espectros se procesaron con el *software* Turbomass 5.4 (Perkin-Elmer Inc.). Los datos obtenidos son registrados y comparados con los de la base de datos NIST MS Search 2.0 (Thermo Electron Corp., Waltham, EEUU), de forma que las sustancias correspondientes a cada pico del cromatograma son identificadas según las coincidencias de alta probabilidad con los espectros de masas dados por la base de datos.



Figura 16. Fotografía de cromatógrafo de gases y un detector de masas Clarus 500 GC-MS

3.3.1.2. Cromatógrafo de gases con detector FID

La cuantificación de las muestras es realizada mediante un cromatógrafo de gases Clarus 500 GC de Perkin-Elmer Inc. (Wellesley, MA, EEUU), equipado con una columna capilar ZB-5 de las mismas características mencionadas anteriormente. En este caso, el gas portador también es Helio, utilizando un flujo de 1.2 mL/min.

La temperatura del inyector es de 250°C y la del detector de 250°C. La temperatura del horno se programa igualmente desde 50°C a 250°C a razón de 3°C/min. Los cromatogramas obtenidos se procesan con el *software* TotalChrom 6.2 (Perkin Elmer Inc.). Para llevar a cabo cada análisis se inyecta 1-2 µL de muestra.

3.3.2. Análisis e interpretación de los datos procedentes de los análisis por cromatografía de gases.

3.3.2.1. Análisis cualitativo. Identificación de los componentes del aceite esencial de *Mentha longifolia* L

En el análisis llevado a cabo en este trabajo, la identificación ha sido realizada combinando el cálculo de los índices de retención de Kovats y el análisis mediante CG-EM.

Para realizar el cálculo del índice de Kovats de cada pico, es necesario determinar, en las mismas condiciones de trabajo, los tiempos de retención de la serie homóloga de los *n*-alcanos considerados, obteniendo el cromatograma correspondiente:

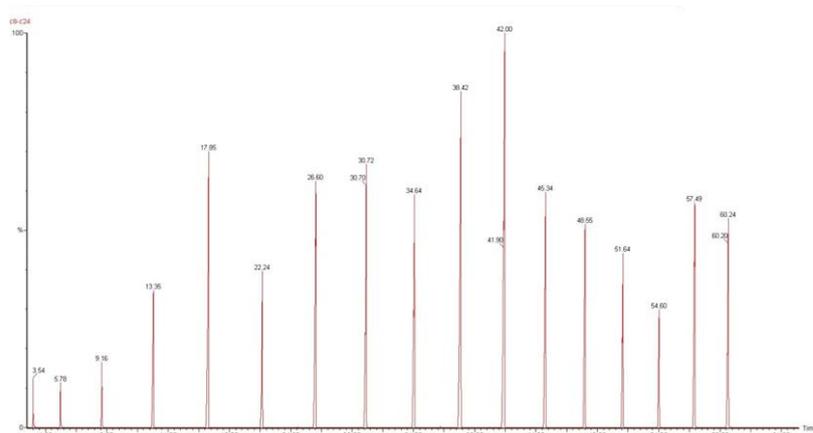


Figura 17. Cromatograma de los patrones de la serie homóloga de los n-alcenos considerados. A partir de aquí, mediante una sencilla hoja de cálculo, podemos aplicar la fórmula del índice de Kovats:

$$IK = \frac{100 \times n \times 100 \times (\log_{10} t - \log_{10} x)}{(\log_{10} y - \log_{10} x)}$$

En cuanto a la aplicación de la espectrometría de masas para la identificación de los componentes del aceite esencial estudiado, se ha aplicado el programa AMDIS (D'Arcy y Mallard, 2004) que permite analizar el espectro de masas de cada pico del ión-cromatograma y compararlo con los de la librería NIST 2.0., de modo que se obtiene un informe en el que se proporciona un número predeterminado de sustancias ordenadas según la mayor similitud de sus espectros de masas con el del pico estudiado. Dada la múltiple procedencia de los datos que constituyen dicha librería, es habitual que varias de las posiciones iniciales en la lista proporcionada correspondan a la misma sustancia, lo que habitualmente significa que dicha sustancia corresponde muy probablemente al pico estudiado.

El siguiente ejemplo muestra el proceso de identificación mediante CG-EM

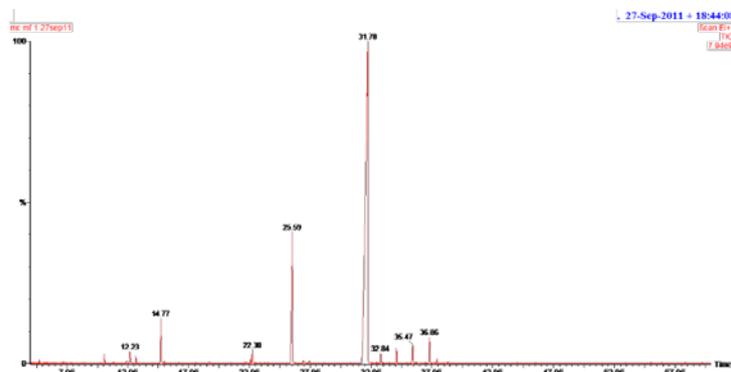


Figura 18. Ejemplo de cromatograma obtenido por CG-EM

Por ejemplo, para un pico de $t_r = 13,78$ minutos, el informe muestra el espectro de masas y un listado de un número predeterminado de sustancias por orden de mayor a menor similitud de

sus espectros de masas correspondientes. Debe tenerse en cuenta al interpretar el informe que según la fuente de procedencia de los datos puede aparecer indistintamente alguno de los nombres comunes o el sistemático.

Espectro de masas del pico problema:

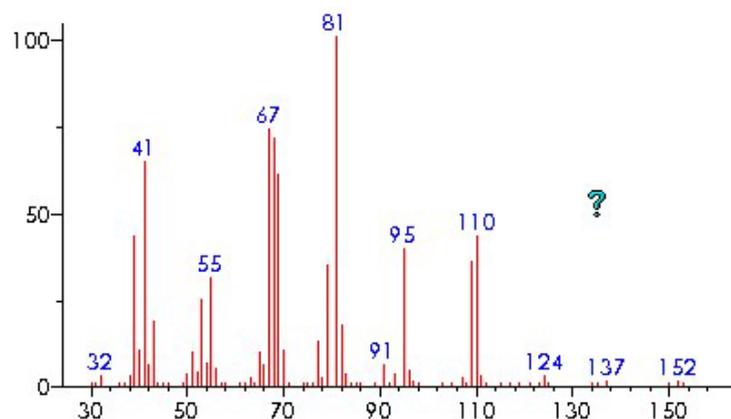


Figura 19. Espectro de masas de un pico procedente del cromatograma

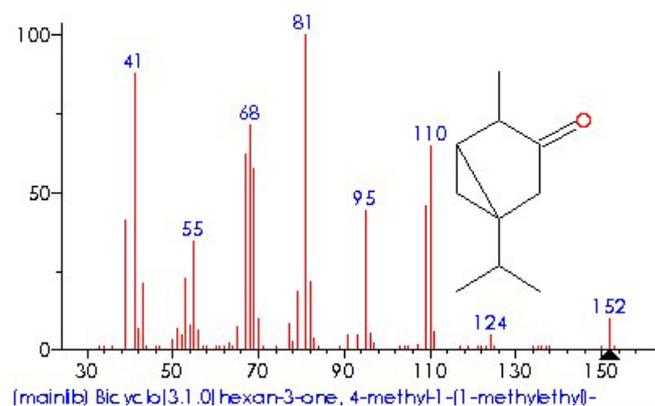


Figura 20. Espectro de masas de la sustancia

#	Lib.	Match	R.Match	Prob.	Name
1	M	895	907	29.4	Bic yc lb[3.1.0]hexan-3-one, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-
2	R	893	924	27.2	Thujone
3	M	882	885	27.2	Thujone
4	R	880	884	29.4	Bic yc lb[3.1.0]hexan-3-one, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-
5	R	868	878	27.2	Thujone
6	M	863	906	7.54	Bic yc lb[3.1.0]hexan-3-one, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, [1S-[1 α ,4 β ,5 α]]-
7	R	836	838	7.54	Bic yc lb[3.1.0]hexan-3-one, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, [1S-[1 α ,4 β ,5 α]]-
8	M	820	830	1.66	3-Octyne
9	M	819	828	1.60	Cyclopropane, 1,1-dimethyl-2-(2-methyl-2-propenyl)-

Figura 21. Informe que indica el listado de posibles sustancias a las que corresponde el pico considerado.

La determinación del índice de Kovats servirá para discriminar entre las sustancias propuestas en las primeras posiciones. Si el tiempo de retención del pico estudiado concuerda con el IK de la librería citada, se confirma que el pico estudiado corresponde a la sustancia citada. En los casos en que se ha dispuesto de patrones puros la confirmación de la naturaleza de los picos también se ha realizado de este modo, aumentando así la fiabilidad de la identificación.

3.3.2.2. Datos procedentes de los análisis por GC-FID. Aproximación cuantitativa a la composición de las muestras.

El detector por ionización de llama (FID) permite una aproximación cuantitativa aceptable cuando la finalidad de los datos es de carácter relativo, es decir, cuando se trata de efectuar comparaciones entre diferentes factores que pueden afectar al % de los componentes: momento del periodo vegetativo, parte de la planta, factores ecológicos, etc. (por este motivo no ha sido necesaria la evaluación de los factores de respuesta). De este modo, puede admitirse que la proporción entre el área de cada pico, obtenida por integración gráfica, y el área total, equivale a la proporción de cada componente en la muestra.

En los análisis efectuados, una vez identificados los picos por CG-EM y el índice de retención de Kovats en los análisis iniciales, se ha calculado para cada cromatograma obtenido con el detector FID la relación de índices de Kovats, identificando así los componentes. Dado que las condiciones de trabajo (tipo de columna y programa de temperatura) son las mismas, cabe esperar una buena concordancia. No obstante, los valores de referencia para los tiempos de retención de los *n*-alcanos necesarios para el cálculo de los índices de Kovats, han sido determinados también para el equipo FID y repetidos cada cierto tiempo para poder corregir posibles fluctuaciones en el funcionamiento de la columna.

3.4. MATERIAL Y REACTIVOS UTILIZADOS PARA LA OBTENCION DE LOS EXTRACTOS EN CCF

La razón para volver a realizar la cromatografía en capa fina, aunque ya se dispone del análisis de componentes usando cromatografía de gases acoplada al detector

- Material vegetal
- Vidrio de reloj
- Espátula
- Balanza
- Pipeta 2 ml

- Micropipeta
- Vaso de precipitados
- Embudo de sólidos
- Viales de 10 ml
- Tolueno para Análisis ACS,ISO (Panreac)
- Diclorometano (SCHARLAU, estabilizado con aproximadamente 500 ppm de amileno)
-

3.4.1. Obtención de los extractos

De cada una de las plantas se tomaron 5 hojas sanas de tamaño intermedio, uniformemente distribuidas en la planta. Después del secado al aire se trituraron con un mortero de laboratorio y se pesaron 0.2 g en un vial de 10 mL .

Se añadieron 2 mL de diclorometano para análisis de residuos por cromatografía de gases, estabilizado con aproximadamente 500 ppm de amileno (SCHARLAU) y se agitaron durante 30 minutos en un agitador orbital Shaker S01. El extracto filtrado de cada planta se introdujo en un nuevo vial, dejándose abiertos en vitrina de gases (Figura 23) hasta la completa evaporación del disolvente. Al extracto seco de cada planta se añadieron 200 μ L de tolueno para Análisis ACS, ISO (Panreac) siguiendo la metodología propuesta por Wagner y Bladt (2001) para el análisis de aceites esenciales por CCF. Los nuevos extractos en tolueno se sellaron herméticamente con parafilm y fueron conservados a 4°C hasta el análisis.

3.4.2. Material y reactivos para CCF

- Cubeta cromatográfica
- Capilares (Blaubrand intraMark, 25 μ l)
- Cromatofolios (DC-Fertigfolien Alugram Sil G/UV, Indicador fluorescencia de UV 254)
- Lámparas UV con cabina de visualización (Vilber Lourmat 254 y 365 nm)
- Pulverizador comercial
- Probeta de 100 mL y matraces aforados de 25 mL

3.4.2.1. Eluyentes

Se utilizó la mezcla 93:7 de los siguientes disolventes (Wagner y Bladt, 2001) Tolueno para Análisis ACS, ISO (Panreac)

Acetato de etilo, Grado síntesis (Scharlau)

3.4.2.2. Reactivos

Vainillina-ácido sulfúrico (Panreac): 1% de vainillina en etanol 96 % (disolución 1) y 10% de ácido sulfúrico en etanol (disolución 2). La placa se pulveriza con 10 ml de la solución 1, seguido inmediatamente por 10 ml de la solución 2. Después de calentar la placa a 110°C durante 5-10 minutos bajo observación, se evalúa la placa. Se puede detectar, por ejemplo, componentes de los aceites esenciales como terpenoides y fenilpropanoides.

Anisaldehído-ácido sulfúrico: Se mezclan 0,5 ml de anisaldehído con 10 ml de ácido acético glacial, seguido de 85 ml de metanol y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, en ese orden. La placa de CCF se pulveriza con 10 ml aproximadamente, calentándola durante 5-10 minutos. Se evalúa la placa a simple vista o en UV-365 nm. El reactivo tiene una estabilidad limitada y ya no se puede utilizar cuando el color se vuelve a rojo-violeta. Se utiliza para la detección de terpenoides, fenilpropanoides, principios amargos y saponinas.

Ácido fosfomolibdico (PMA): 20% de ácido fosfomolibdico en etanol. Se pulveriza la placa con 10 ml de la solución. Después se calienta a 100°C por 5 min bajo observación se evalúa la placa. Se aplica principalmente para la detección de terpenoides.

3.4.3. Procedimiento experimental

Para el desarrollo de la CCF se utilizaron los cromatofolios indicados cortados en cuadrados de 10 cm x 10 cm y se utilizaron micropipetas de 25 µL para aplicar las manchas de extracto sobre la línea base del cromatofolio. En cada cromatofolio se aplicaron los extractos de cada uno de los cinco quimiotipos y ello se realizó por triplicado ya que se iban a utilizar tres reveladores distintos para la visualización de cromatograma.

Una vez evaporado el disolvente de los extractos, se colocan los cromatofolios en la cubeta a la que se ha añadido la cantidad necesaria de eluyente, dejándola tapada durante unos 15 minutos para que el interior de la cubeta quede saturado con sus vapores previamente. Cuando el frente del disolvente se halla aproximadamente a 1 cm del extremo superior del cromatofolio, se extrae éste de la cubeta y se marca con lápiz el frente del disolvente, dejándolo evaporar completamente en la vitrina de gases.

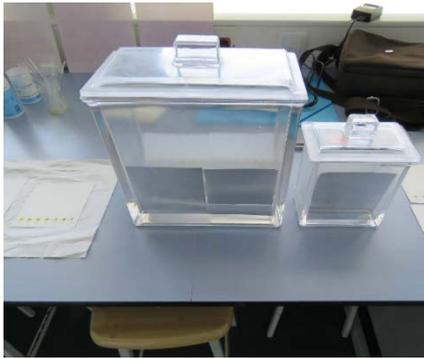


Figura 22. Cubeta



Figura 23. Vitrina de gases



Figura 24. Lámpara UV con cabina de visualización (Vilbert Lourmat 254 y 365 nm)

3.4.4. Clasificación de las parcelas según el perfil cromatográfico en CCF. Validación del método por GC/MS

Para validar el método se llevó a cabo una CCF preparativa, analizando posteriormente la composición de cada mancha. Para ello se eluyó un cromatofolio con las mismas muestras de extracto, pero sin aplicar ningún agente revelador. Posteriormente se calcularon los intervalos de R_f de las bandas que mostraban diferencias entre los perfiles correspondientes tomando como referencia la revelada con anisaldehído. Por ejemplo:

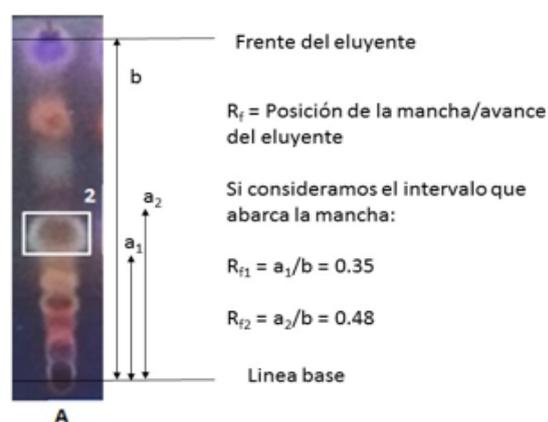


Figura 25. Cálculo del intervalo de R_f para una mancha representativa del quimiotipo A

Realizando este cálculo para cada una de las bandas seleccionadas, se identificaron las zonas correspondientes en el cromatofolio al que no se aplicó ningún revelador y se separó (mediante raspado) para cada una la fase estacionaria, extrayéndola con 1 mL de diclorometano. Posteriormente se filtró succionando con una pipeta Pasteur a través de algodón y se redujo dicho volumen hasta 200 μ L por evaporación en vitrina de gases, introduciéndolo en un vial cromatográfico de inserto para su análisis por GC/MS.

3.5. METODOS ESTADISTICOS

Se ha utilizado el programa Statgraphics Centurion XVI.ITM (*StatPoint Technologies, Warrenton, VA, EEUU*) para estudiar la variabilidad existente o no entre los muestreos efectuados a lo largo del periodo de estudio del individuo en cuestión. Dado que los resultados experimentales vienen expresados como % de las áreas de los picos en el cromatograma, fueron sujetos a la transformación $ASEN(RAIZ(x/100))$ en la aplicación Microsoft Excel TM para ser procesados posteriormente con Statgraphics. Para establecer las diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios se aplicó el análisis múltiple de rangos mediante el test de Tukey para $P < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CLASIFICACION DE LAS PARCELAS SEGÚN EL PERFIL CROMATOGRAFICO EN CCF

En la figura 26 se muestran los perfiles cromatográficos (CCF) para los extractos de las hojas representativas de cada quimiotipo, utilizando como revelador vainillina sulfúrica, anisaldehído sulfúrico y ácido fosfomolibdico, respectivamente.



Figura 26. Cromatogramas obtenidos utilizando los tres reactivos mencionados anteriormente en su orden respectivo (vainillina, anisaldehído sulfúrico y ácido fosfomolibdico).

Los perfiles cromatográficos obtenidos por CCF, para las 5 parcelas, verificaron el grado de similitud existente entre los resultados obtenidos por (CG-EM), mostrando perfiles análogos a los obtenidos en el estudio en el que se estableció la clasificación (Bonet, 2015). Puede observarse cómo en cada perfil cromatográfico hay manchas que, por su color o posición, permite distinguirlo del resto.

4.2. VALIDACION DEL METODO DE CLASIFICACION POR CCF MEDIANTE GC/MS

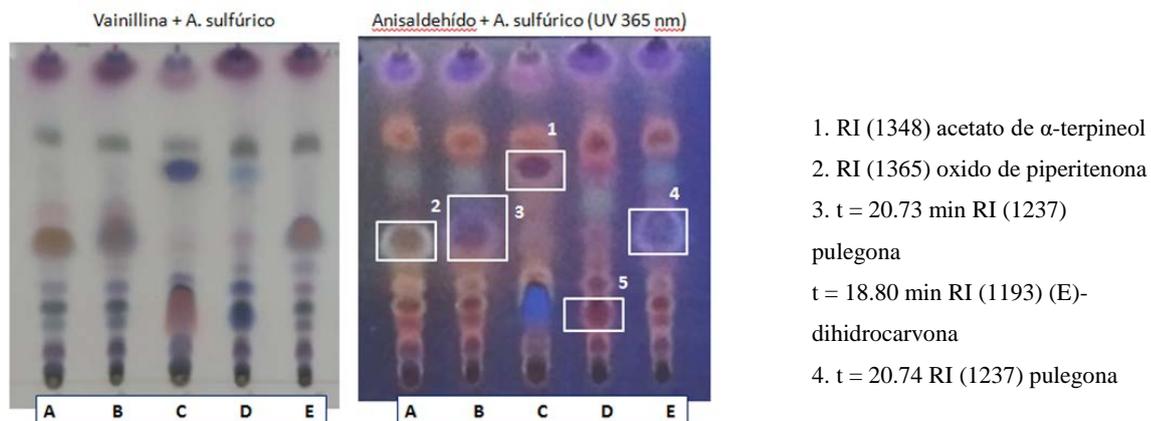


Figura 27. Cromatogramas obtenidos con vainillina y anisaldehído sulfúrico. En este último se marcan las zonas posteriormente analizadas mediante espectroscopía de masas.

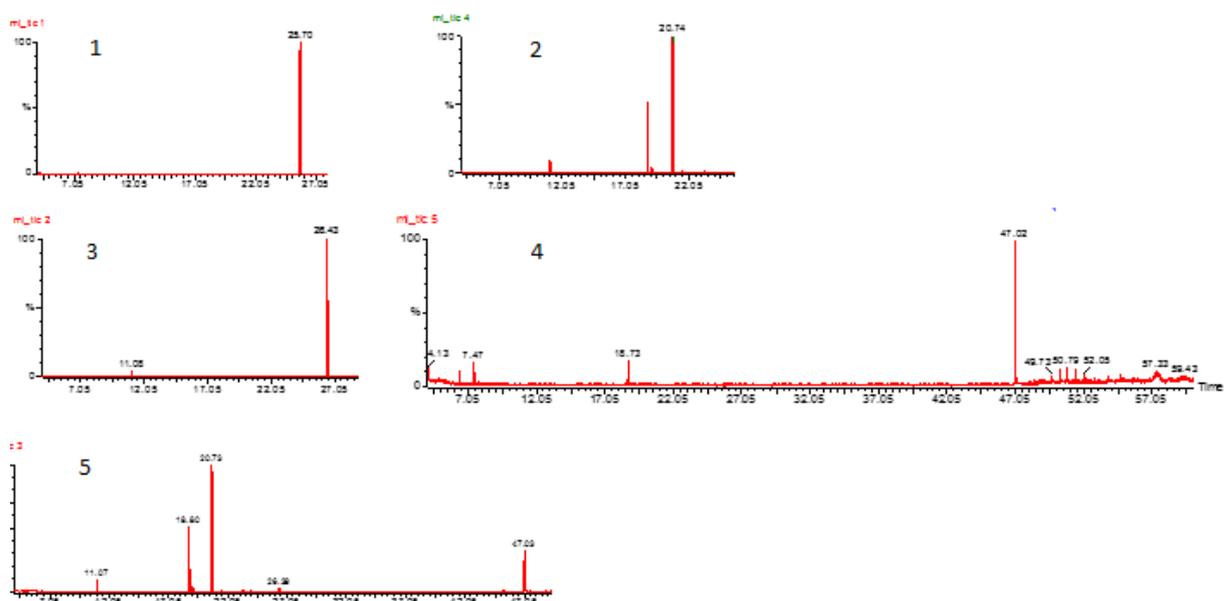


Figura 28. Espectros de masas de las bandas analizadas (indicadas en la figura 27). En ellas se representa el tiempo de retención en abcisas.

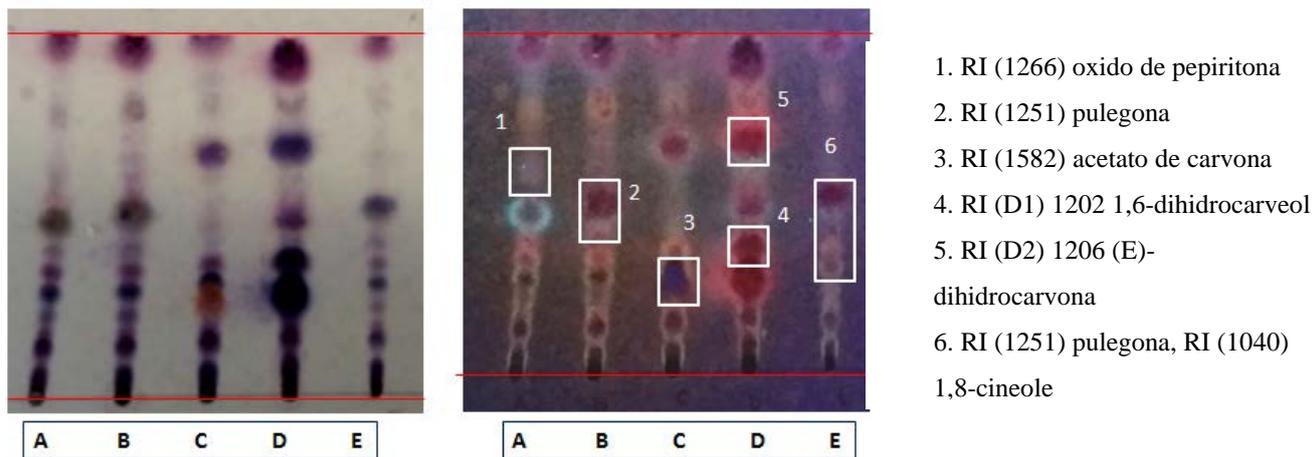
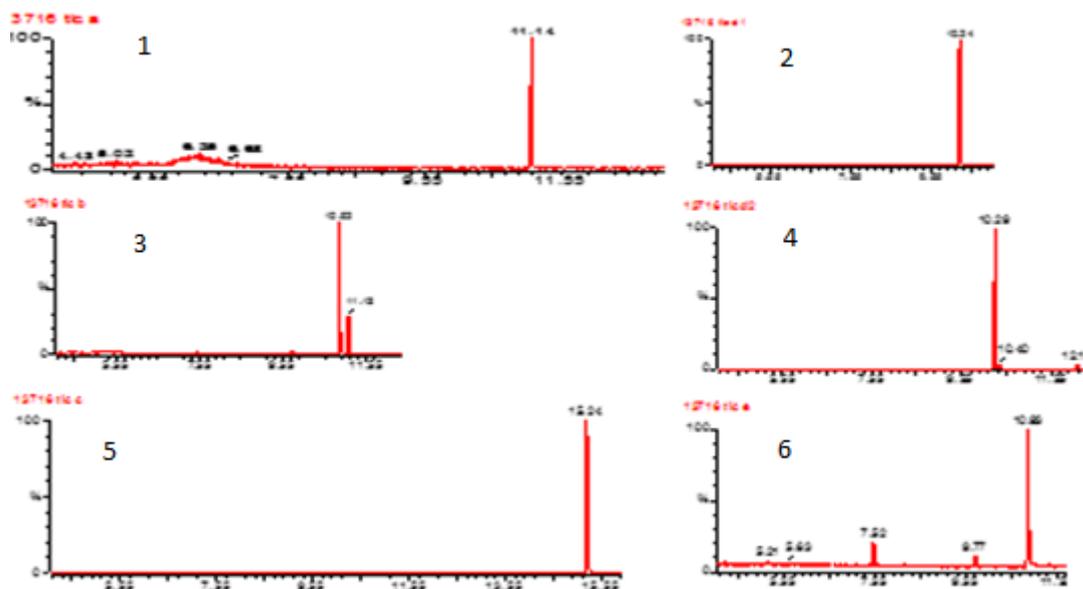


Figura 29. Cromatogramas obtenidos con vainillina y anisaldehído sulfúrico. En este experimento, análogo al descrito en la Figura 29, se analizan de nuevo algunos zonas para verificar a qué compuesto pertenecen.



4.3. IDENTIFICACION DE LOS COMPUESTOS QUE FORMAN PARTE DE LA FRACCION VOLATIL DE *MENTHA LONGIFOLIA L.*

A continuación, se presentan los resultados de los análisis por cromatografía de gases con espectroscopía de masas como sistema de detección, cuyo objetivo era la identificación de los componentes de las muestras. Se ha realizado 3 análisis por quimiotipo y por muestreo, habiendo cubierto toda la diversidad de compuestos identificados al cuantificar con cromatografía de gases (FID). Para cada cromatograma se incluye una tabla con los tiempos de retención, índices de retención y % de las áreas de los picos para los compuestos mayoritarios. En el anexo se muestra el análisis por GC/MS completo para cada uno de los quimiotipos al comienzo de la experimentación.

4.3.1. Muestreo 1

4.3.1.1. Quimiotipo A

Tabla 2. Composición del aceite esencial del quimiotipo A en el muestreo 1.

COMPUESTOS	DESARROLLO VEGETATIVO AVANZADO						
	tr	KI	A1	A2	A3	SD	Media
Pulegona	21,138	1244	0,15	0,01	0,03	0,08	0,06
Oxido de piperitona (cis + trans)	22,703	1278	43,25	45,73	45,17	1,30	44,72
Oxido de pepiritenona	27,479	1388	32,47	31,72	33,60	0,95	32,60
□-cariofileno	29,156	1430	2,69	2,60	2,25	0,23	2,51
Germacrene-D	31,706	1492	4,69	4,66	3,62	0,61	4,32

4.3.1.2. Quimiotipo B

Tabla 3. Composición del aceite esencial del quimiotipo B en el muestreo 1.

COMPUESTOS	DESARROLLO VEGETATIVO AVANZADO						
	tr	KI	B1	B2	B3	Media	SD
(Z)-Dihidrocarvona	19,657	1210	7,26	11,55	9,54	9,5	2,15
Pulegona	21,557	1254	31,24	25,48	24,78	27,2	3,54
Oxido de piperitona	22,432	1272	34,67	33,73	39,34	35,9	3,00
□-cariofileno	28,894	1423	2,3	1,25	2,51	2,0	0,68
Germacrene-D	31,0975	1478	2,3	7,91	7,1	5,8	3,03

4.3.1.3. Quimiotipo C

Tabla 4. Composición del aceite esencial del quimiotipo C en el muestreo 1.

COMPUESTOS	DESARROLLO VEGETATIVO AVANZADO						
	tr	KI	C1	C2	C3	Media	SD
Carvona	21,663	1256	3,54	2,24	4,11	3,30	0,96
Acetato de α -terpineol	26,1865	1359	36,22	28,9	40,64	35,25	5,93
α -cariofileno	28,873	1422	1,23	1,02	1,35	1,20	0,17
Germacrene-D	31,387	1484	0,97	0,78	1,05	0,93	0,14
Acetato de carvona	35,1195	1581	25,85	24,66	28,56	26,36	2,00

4.3.1.4. Quimiotipo D

Tabla 5. Composición del aceite esencial del quimiotipo D en el muestreo 1.

	DESARROLLO VEGETATIVO AVANZADO						
	tr	KI	D1	D2	D3	MEDIA	SD
1,8-cineol	11,807	1043	12,93	15,61	14,25	14,26	1,34
Dihidrocarvona (cis + trans)	20,073	1220	72,78	66,32	70,62	69,91	3,29
α -cariofileno	29,079	1428	2,26	2,31	2,24	2,27	0,04
Germacrene-D	31,669	1491	5,3	5,3	5,07	5,22	0,13

4.3.1.5. Quimiotipo E

Tabla 6. Composición del aceite esencial del quimiotipo E en el muestreo 1.

	DESARROLLO VEGETATIVO AVANZADO						
	tr	KI	E1	E2	E3	MEDIA	SD
Isomentona	17,719	1170	24,92	22,47	23	23,46	1,29
Mentol	17,986	1175	1,07	1,83	0,83	1,24	0,52
Pulegona	21,7285	1257	55,46	60,97	60,26	58,90	3,00
α -cariofileno	29,029	1426	1,9	2,01	1,68	1,86	0,17
Germacrene-D	31,573	1489	2,58	2,85	2,44	2,62	0,21

4.3.2. Muestreo 2

4.3.2.1. Quimiotipo A

Tabla 7. Composición del aceite esencial del quimiotipo A en el muestreo 2.

COMPUESTOS	COMIENZO FLORACIÓN						
	tr	KI	A1	A2	A3	SD	Media
Pulegona	21,138	1244	0,12	0,01	0,08	0,06	0,07
Óxido de piperitona (cis + trans)	22,703	1278	44,36	53,21	48,52	4,43	48,70
Oxido de piperitenona	27,479	1388	15,4	11,91	30,61	9,94	19,31
□-cariofileno	29,156	1430	3,82	4,77	2,96	0,91	3,85
Germacreno-D	31,706	1492	1	5,36	4,29	2,27	3,55

4.3.2.2. Quimiotipo B

Tabla 8. Composición del aceite esencial del quimiotipo B en el muestreo 2.

COMPUESTOS	COMIENZO FLORACIÓN						
	tr	KI	B1	B2	B3	Media	SD
(Z)-Dihidrocarvona	19,657	1210	4,87	9,33	13,55	9,25	4,34
Pulegona	21,557	1254	30,58	39,01	27,7	32,43	5,88
Óxido de piperitona	22,432	1272	39,6	26,54	34,92	33,69	6,62
□-cariofileno	28,894	1423	2,45	2,52	2,53	2,50	0,04
germacreno-D	31,0975	1478	6,7	6,35	6,75	6,60	0,22

4.3.2.3. Quimiotipo C

Tabla 9. Composición del aceite esencial del quimiotipo C en el muestreo 2.

COMPUESTOS	COMIENZO FLORACIÓN						
	tr	KI	C1	C2	C3	Media	SD
Carvona	21,663	1256	1,31	3,54	2,4	2,42	1,12
Acetato de □-terpineol	26,1865	1359	62,86	57,7	57,65	59,40	2,99
□-cariofileno	28,873	1422	2,42	2,41	2,42	2,42	0,01
Germacrene-D	31,387	1484	1,26	1,04	1,15	1,15	0,11
Acetato de carvona	35,1195	1581	15,45	14,72	10,59	13,59	2,62

4.3.2.4. Quimiotipo D

Tabla 10. Composición del aceite esencial del quimiotipo D en el muestreo 2.

COMPUESTOS	COMIENZO FLORACIÓN						
	tr	KI	D1	D2	D3	MEDIA	SD
1,8-cineol	11,807	1043	11,99	10,69	12,52	11,73	0,94
Dihidrocarvona (cis + trans)	20,073	1220	75,35	80	75,91	77,09	2,54
□-cariofileno	29,079	1428	1,98	1,72	1,88	1,86	0,13
Germacrene-D	31,669	1491	4,38	3,89	4,21	4,16	0,25

4.3.2.5. Quimiotipo E

Tabla 11. Composición del aceite esencial del quimiotipo E en el muestreo 2.

COMPUESTOS	COMIENZO FLORACIÓN						
	tr	KI	E1	E2	E3	MEDIA	SD
Isomentona	17,719	1170	9,49	17,11	15,72	14,11	4,06
Mentol	17,986	1175	1,03	2,24	3,39	2,22	1,18
Pulegona	21,7285	1257	70,37	65,47	66,53	67,46	2,58
□-cariofileno	29,029	1426	2,18	1,83	1,63	1,88	0,28
Germacrene-D	31,573	1489	2,93	2,87	2,9	2,90	0,03

4.3.3. Muestreo 3

4.3.3.1. Quimiotipo A

Tabla 12. Composición del aceite esencial del quimiotipo A en el muestreo 3

COMPUESTOS	PLENA FLORACIÓN						
	tr	KI	A1	A2	A3	SD	Media
Pulegona	21,138	1244	0,04	0,03	0,01	0,02	0,03
Oxido de piperitona (cis + trans)	22,703	1278	45,55	40,46	45,81	3,02	43,94
Oxido de piperitenona	27,479	1388	26,94	29,49	25,66	1,95	27,36
□-cariofileno	29,156	1430	4,97	4,19	4,38	0,41	4,51
Germacrene-D	31,706	1492	5,54	5,39	6,34	0,51	5,76

4.3.3.2. Quimiotipo B

Tabla 13. Composición del aceite esencial del quimiotipo B en el muestreo 3

COMPUESTOS	PLENA FLORACIÓN						
	tr	KI	B1	B2	B3	Media	SD
(Z)- Dihidrocarvona	19,657	1210	15,78	8,8	18,51	14,36	5,01
Pulegona	21,557	1254	29,02	20,57	28,28	25,96	4,68
Oxido de piperitona	22,432	1272	28,8	41,41	30,87	33,69	6,76
□-cariofileno	28,894	1423	2,33	2,78	2,63	2,58	0,23
Germacrene-D	31,0975	1478	5,93	7,22	6,6	6,58	0,65

4.3.3.3. Quimiotipo C

Tabla 14. Composición del aceite esencial del quimiotipo C en el muestreo 3

COMPUESTOS	PLENA FLORACIÓN						
	tr	KI	C1	C2	C3	Media	SD
Carvona	21,663	1256	2,69	2,7	2,01	2,47	0,40
Acetato de □-terpineol	26,1865	1359	56,64	59,43	62,31	59,46	2,84
□-cariofileno	28,873	1422	3,53	3,85	4,1	3,83	0,29
Germacrene-D	31,387	1484	2,15	2,29	2,12	2,19	0,09
Acetato de carvona	35,1195	1581	12,23	7,37	8,45	9,35	2,55

4.3.3.4. Quimiotipo D

Tabla 15. Composición del aceite esencial del quimiotipo D en el muestreo 3

COMPUESTOS	PLENA FLORACIÓN						
	tr	KI	D1	D2	D3	MEDIA	SD
1,8-cineol	11,807	1043	12,08	11,44	11,04	11,52	0,52
Dihidrocarvona cis + trans	20,073	1220	76,24	76,07	74,98	75,76	0,68
□-cariofileno	29,079	1428	1,68	1,98	2,11	1,92	0,22
germacrene-D	31,669	1491	3,35	3,95	4,3	3,87	0,48

4.3.3.5. Quimiotipo E

Tabla 16. Composición del aceite esencial del quimiotipo E en el muestreo 3

	PLENA FLORACIÓN						
	tr	KI	E1	E2	E3	MEDIA	SD
Isomentona	17,719	1170	3,46	3,71	5,66	4,28	1,20
Mentol	17,986	1175	0,86	0,35	0,94	0,72	0,32
Pulegona	21,7285	1257	79,38	78,93	76,4	78,24	1,61
□-cariofileno	29,029	1426	2,58	2,63	2,5	2,57	0,07
Germacrene-D	31,573	1489	3,1	3,07	2,91	3,03	0,10

4.4. COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DURANTE EL SEGUIMIENTO

Tabla 17. Resultados de la composición química a lo largo del ciclo vegetativo de la planta.

Quimiotipo	Compuesto ¹	IR ²	IR(Bib.) ³	Metodo de identificación ⁴	Muestreo		
					1	2	3
A	Pulegona	1244	1237	MS,RI	0,06±0,08	0,07±0,06	0,03±0,02
	Oxido de piperitona (cis + trans)	1278	1254- 1256	MS,RI	44,72±1,30	48,7±4,43	43,94±3,02
	Oxido de piperitenona	1388	1369	MS,RI	32,6±0,95	19,31±9,94	27,36±1,95
	□-cariofileno	1430	1419	MS,RI	2,51±0,23	3,85±0,91	4,51±0,41
	Germacrene-D	1492	1485	MS,RI	4,32±0,61	3,55±2,27	5,76±0,51
B	(Z)-Dihidrocarvona	1210	1193	MS,RI	9,5±2,15	9,25±4,34	14,36±5,01
	Pulegona	1254	1237	MS,RI	27,2±3,54	32,43±5,88	25,96±4,68
	Oxido de piperitona (cis+trans)	1272	1254-1256	MS,RI	35,9±3,00	33,69±6,62	33,69±6,76
	□-cariofileno	1423	1419	MS,RI	2±0,68	2,50±0,04	2,58±0,23
	Germacrene-D	1478	1485	MS,RI	5,8±3,03	6,60±0,22	6,58±0,65
C	Carvona	1256	1243	MS,RI, STD	3,30±0,96	2,42±1,12	2,47±0,40
	Acetato de □-terpineol	1359	1349	MS,RI	35,25±5,93	59,40±2,99	59,46±2,84
	□-cariofileno	1422	1419	MS,RI	1,20±0,14	2,42±0,01	3,83±0,29
	Germacrene-D	1484	1485	MS,RI	0,93±0,14	1,15±0,01	2,19±0,09
	Acetato de carvona	1581	1566	MS,RI	26,36±2,00	13,59±2,62	9,35±2,55
D	1,8-cineol	1043	1037	MS,RI, STD	14,26±1,34	11,73±0,94	11,52±0,52
	Dihidrocarvona (cis + trans)	1220	1193-1201	MS,RI	69,91±3,29	77,09±2,54	75,76±0,68
	□-cariofileno	1428	1419	MS,RI	2,27±0,04	1,86±0,13	1,92±0,22
	Germacrene-D	1491	1485	MS,RI	5,22±0,13	4,16±0,25	3,87±0,48
E	Isomentona	1170	1163	MS,RI	23,46±1,29	14,11±4,06	4,28±1,20
	Mentol	1175	1172	MS,RI	1,24±0,52	2,22±1,18	0,72±0,32
	Pulegona	1257	1237	MS,RI	58,90±3,00	67,46±2,58	78,24±1,61
	□-cariofileno	1426	1419	MS,RI	1,86±0,17	1,88±0,28	2,57±0,07
	Germacrene-D	1489	1485	MS,RI	2,62±0,21	2,90±0,03	3,03±0,10

1. Compuestos mayoritarios para cada quimiotipo.
2. Índice de retención de Kovats experimental.
3. Índice de Kovats según (Adams rp 2001).
4. Método de identificación.
 - MS comparación de espectro de masas con la librería NIST 2.0.
 - RI identificación mediante el índice de retención de Kovats.
 - STD identificación mediante la inyección de compuestos puros en las mismas condiciones cromatográficas.

4.5. RESULTADO DEL SEGUIMIENTO DE TEMPERATURA Y HUMEDAD RELATIVA

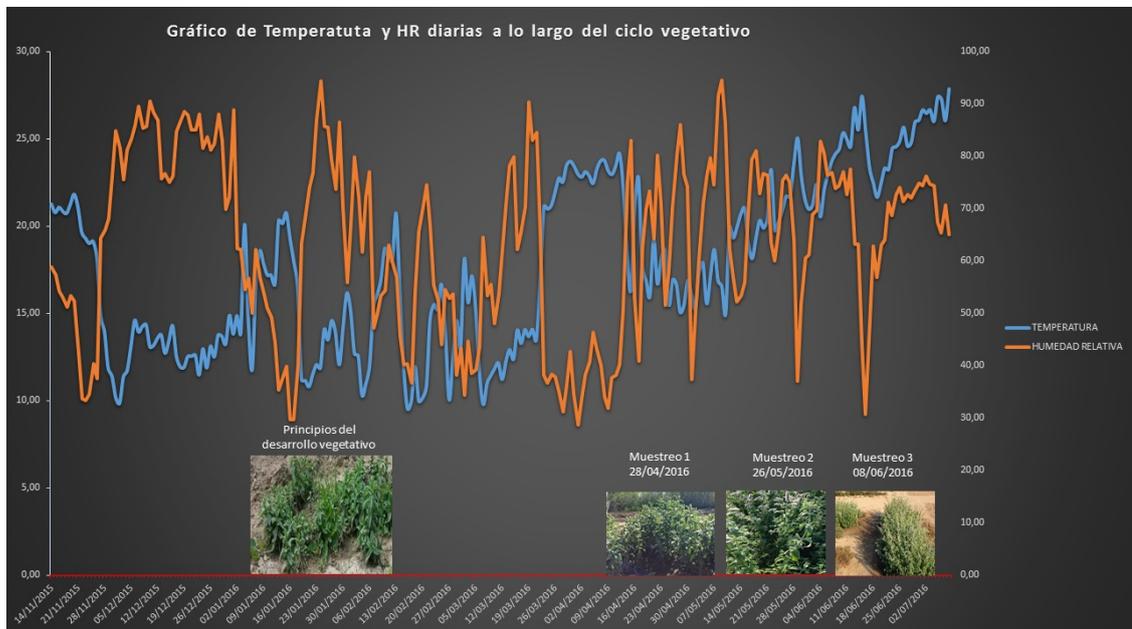


Figura 31. Grafica de temperatura y humedad relativa diarias a lo largo de ciclo vegetativo.

En la figura anterior se puede observar, las temperaturas máximas y mínimas y la humedad relativa diarias en el periodo de Enero A junio 2016, el cual barca la fase de toma de muestras. La grafica presenta irregularidades correspondientes a los típicos episodios de poniente muy comunes en nuestro ámbito geográfico. Eso ha influido en la periodicidad de los riegos, el seguimiento ha sido interesante para saber el peso que tiene todo esto sobre el desarrollo de la planta.

4.6. ESTUDIO Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DEL ANALISIS DE ANOVA DE LOS MUESTREOS EFECTUADOS A CADA UNO DE LOS QUIMIOTIPOS

4.6.1. Quimiotipo A

Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de óxido de piperitona (Z+E)+ óxido de carvona, β - cariofileno, entre un muestreo y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

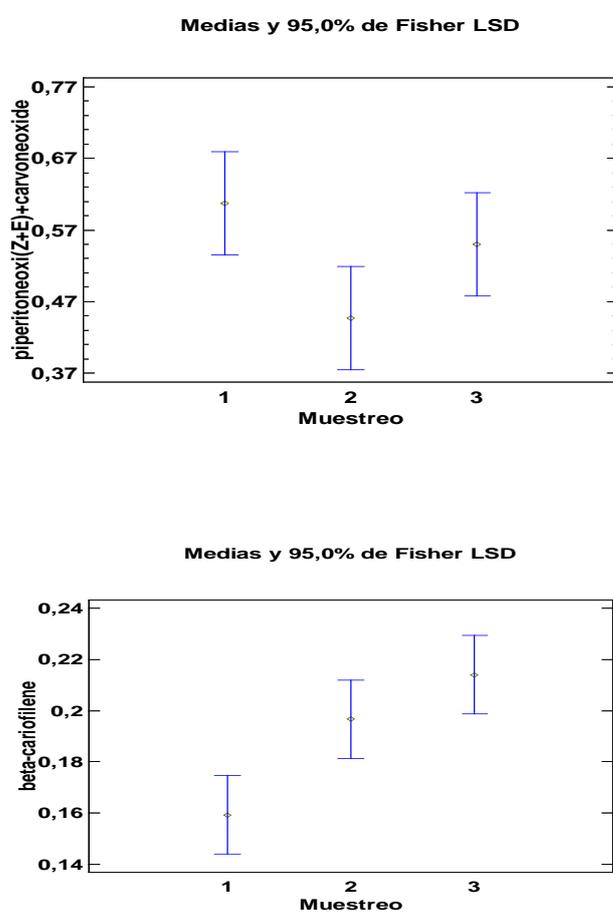


Figura 32. Intervalos LSD para el óxido de piperitona (cis + trans) y β -cariofileno.

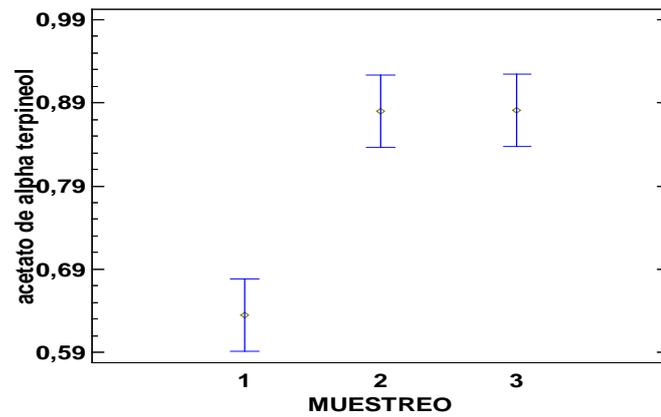
4.6.2. Quimiotipo B

No existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de los compuestos mayoritarios entre un nivel de muestreo y otro, con un nivel del 95,0% de confianza. Por lo que se puede decir que el quimiotipo B se ha comportado de la misma manera durante los tres muestreos efectuados.

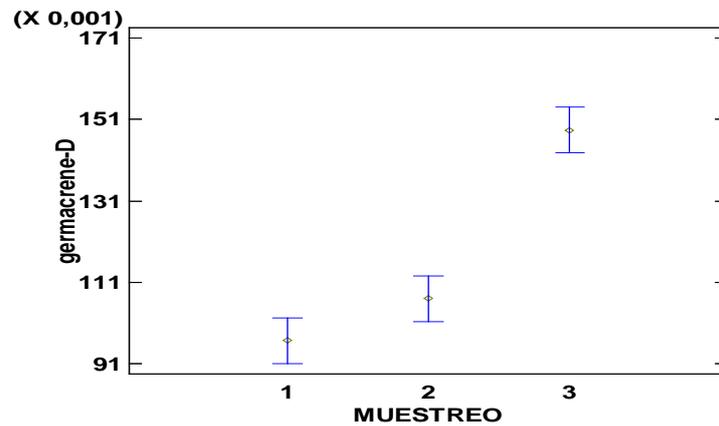
4.6.3. Quimiotipo C

Este quimiotipo es el que ha presentado una floración tardía, de modo que el comienzo de la floración tuvo lugar en el tercer muestreo, sin embargo la mayoría de sus componentes (acetato de α -terpineol, β -cariofileno, germacreno-D y acetato de carvona) han experimentado unas diferencias estadísticamente significativas entre sus medias a lo largo de los muestreos.

Medias y 95,0% de Fisher LSD



Medias y 95,0% de Fisher LSD



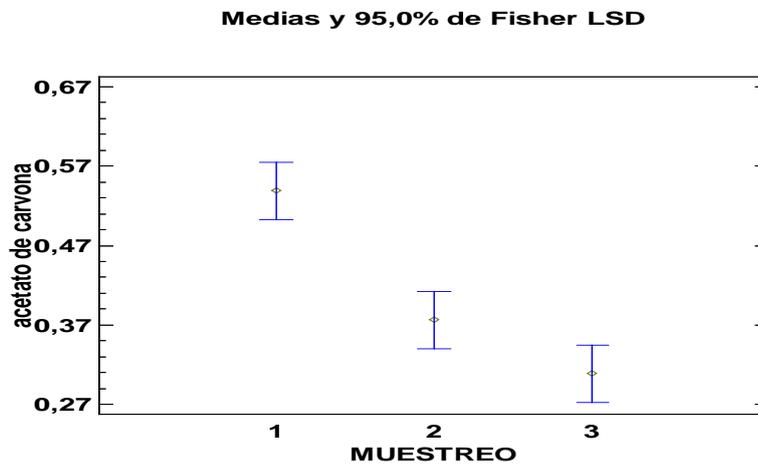
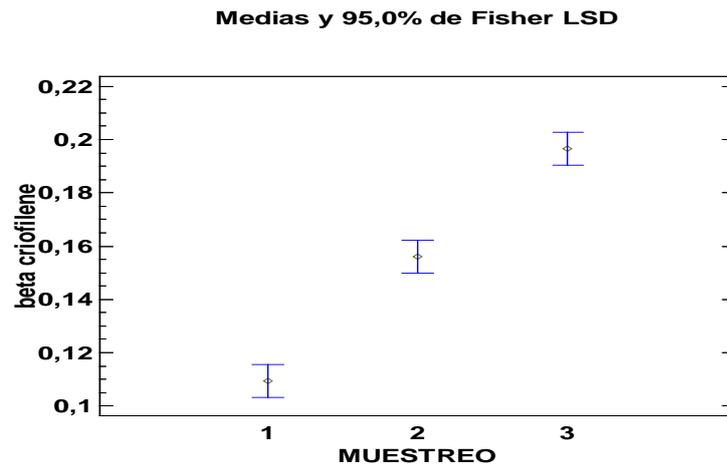
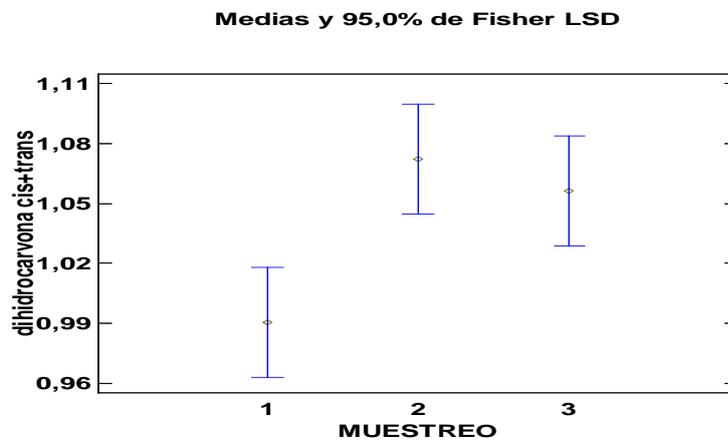
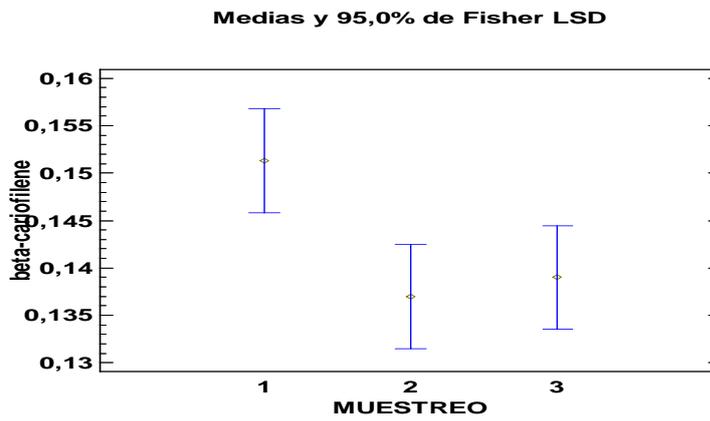
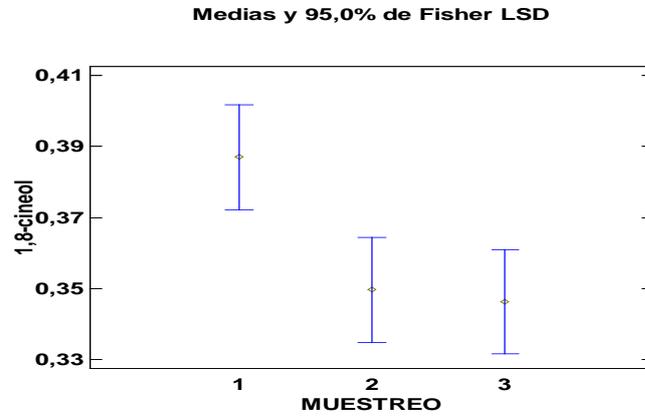


Figura 33. Intervalos LSD para (acetato de α -terpineol, β -cariofileno, germacrene-D y acetato de carvona)

4.6.4. Quimiotipo D

Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de (1,8-cineol, Dihidrocarvona (cis+trans), β -cariofileno y germacreno-D



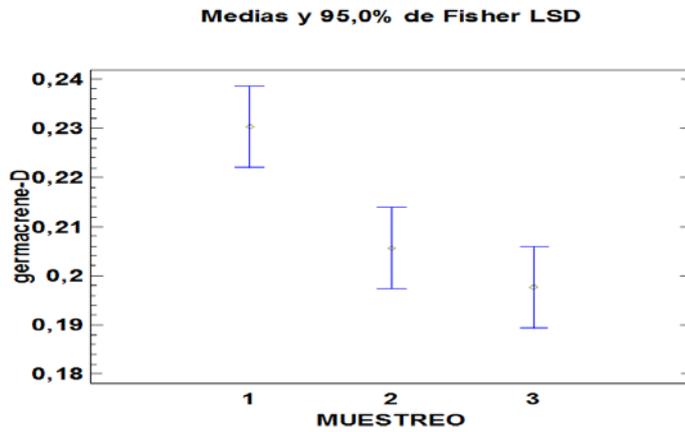
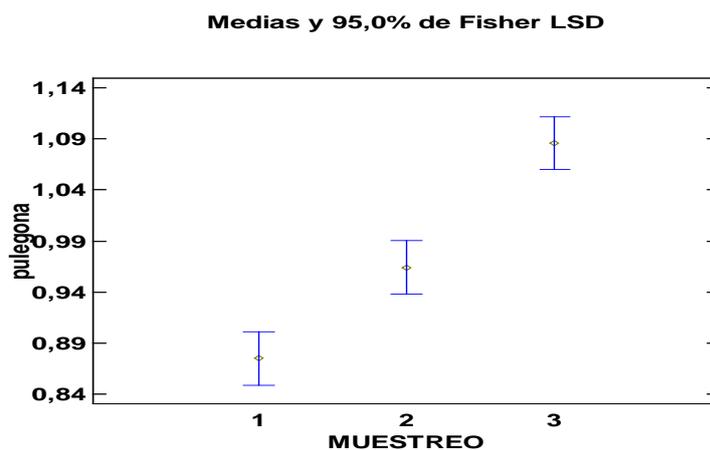


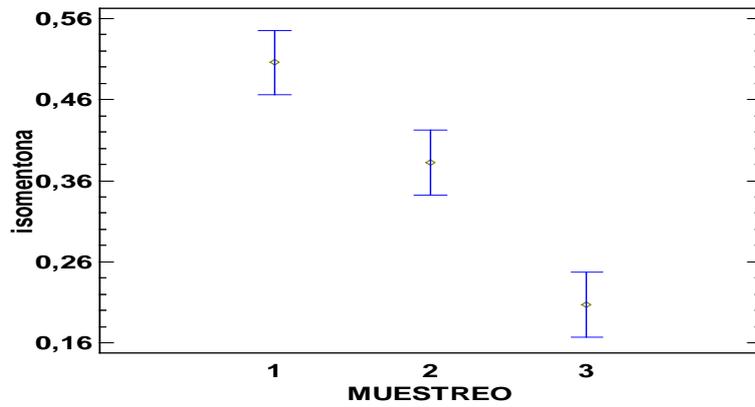
Figura 34. Intervalos LSD de 1,8-cineol, Dihydrocarvone cis+trans, β -cariofilene y germacrene-D.

4.6.5. Quimiotipo E

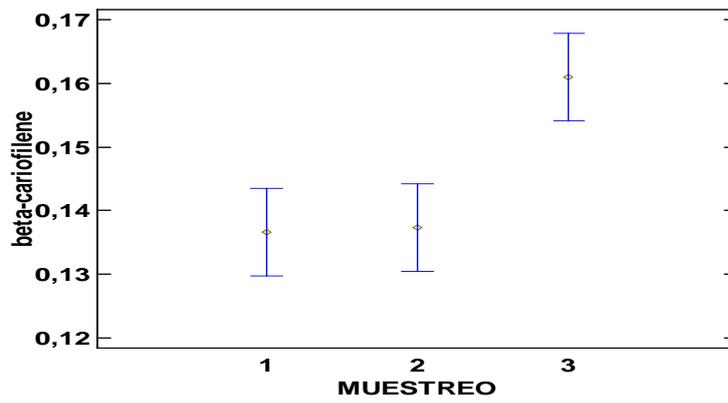
Puesto que el valor-P es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de todos los componentes mayoritarios entre un nivel de MUESTREO y otro menos el mentol, con un nivel del 95,0% de confianza.



Medias y 95,0% de Fisher LSD



Medias y 95,0% de Fisher LSD



Medias y 95,0% de Fisher LSD

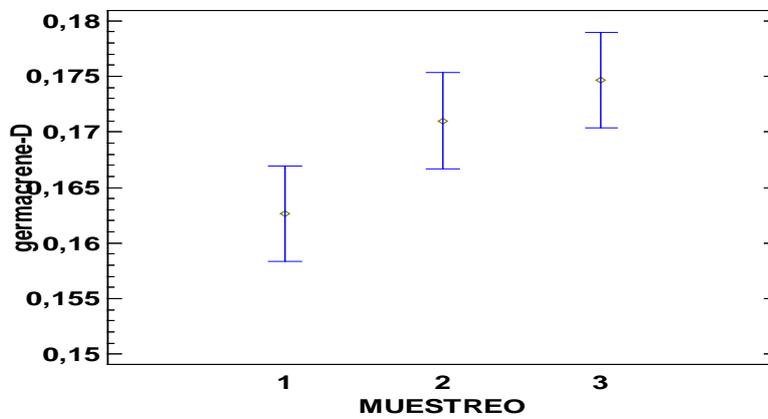


Figura 35. Intervalos LSD de isomentona, pulegona, β -cariofileno y germacrene-D

Tabla 18. Resultado del análisis estadístico utilizando el análisis múltiple de rangos mediante el test de Tukey para $P < 0.05$.

	Compuesto	P-valor	Variabilidad
A	pulegona	0.2234	NO Significativa
	oxido de piperitona (Z+E)+ oxido de carvona	0.0865	Significativa
	□-cariofileno	0.0123	Significativa
	germacreno-D	0.285	NO Significativa
B	Dihidrocarvona cis	0.3152	NO Significativa
	pulegona	0.2921	NO Significativa
	oxido de pepiritona	0.8516	NO Significativa
	□-cariofileno	0.2844	NO Significativa
	germacreno-D	0.7414	NO Significativa
C	Carvona	0.4678	NO Significativa
	acetato de □□terpineol	0.0006	Significativa
	□-cariofileno	0	Significativa
	germacreno-D	0.0001	Significativa
D	1,8-cineol	0.0266	Significativa
	Dihidrocarvona cis + trans	0.024	Significativa
	□-cariofileno	0.037	Significativa
	germacreno-D	0.007	Significativa
E	Isomentona	0.0003	Significativa
	mentol	0.109	NO Significativa
	pulegona	0.0002	Significativa
	□-cariofileno	0.0078	Significativa
	germacreno-D	0.0357	Significativa

5.CONCLUSIÓN

5. CONCLUSIÓN

La aplicación de la cromatografía en capa fina puede ser un método valioso para el “screening” de poblaciones silvestres con objeto de analizar su quimiodiversidad, permitiendo la selección y propagación de individuos de un quimiotipo determinado. Así, la posibilidad de obtener cultivares químicamente homogéneos permite una investigación rigurosa de influencia de la influencia de factores ambientales y estacionales, al tener controlado el factor genético.

La importancia de la afirmación anterior se manifiesta claramente en los resultados obtenidos al estudiar la variación estacional de los diferentes quimiotipos, ya que mientras A, C, D y E muestran diferentes significativas en algunos de sus componentes mayoritarios, en el B se observa una composición estable a lo largo del ciclo vegetativo.

Dicha estabilidad puede ser un factor decisivo a la hora de cultivar la planta, ya que el momento de su recolección no sería decisivo a la hora de mantener una composición estándar en el aceite esencial. En los otros casos, sería necesario considerar qué compuestos determinan en mayor medida la calidad del aceite esencial en función de sus aplicaciones concretas, para realizar las siegas en el momento más oportuno.

6. BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, R. P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Illinois. 4th edition. Allured Publishing Corporation, Carol Stream. 803 pp.

AFLATUNI, A. (2005). The yield and Essential Oil content of Mint (*Mentha* spp) in Northern Ostrobothnia. Trabajo presentado en: Faculty of Science, University of Oulu, Finland. 50 pp.

Ahmad, I., M. Hussain, M.S.A. Ahmad, M.Y. Ashraf, R. Ahmad and A. Ali. 2008. Spatio-temporal variations in physiochemical attributes of *Adiantum capillus-veneris* from Soone Valley of salt range (Pakistan). *Pak. J. Bot.*, 40: 138798.

Ahmad, I., M.S.A. Ahmad, M. Hussain, M. Hameed, M.Y. Ashraf and S. Koukab. 2009. Spatio-temporal effects on species classification of medicinal plants in Soone Valley of Pakistan. *Int. J. Agric. Biol.*, 11: 64-68.

ASEKUN, O. T.; GRIERSON, D.S.; AFOLAYAN, A. J. (2007). Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. *Capensis*. *Food Chemistry*, 101:995-998

Baser KHC, Kürkçüoğlu M, Tarımcılar G, Kaynak G. 1999. Essential oils of *Mentha* species from Northern Turkey. *Journal of Essential Oil Research* 11(5), 579-588.

BONET, A. (2013). Caracterización de quimiotipos de *Mentha longifolia* L. en poblaciones del valle del Jiloca (Teruel). Trabajo presentado en: Universidad Politécnica de Valencia, 145 pp.

BONET, A. (2015). Aplicación de la cromatografía en capa fina (CCF) a la selección de quimiotipos de *Mentha longifolia* L. y evaluación de su potencial antioxidante.

Foster, S. and J.A. Duke. 1990. *A Field Guide to Medicinal Plants and Herbs. Eastern and Central N. America.* Houghton Mifflin Co., Boston MA.

GARCIA VALLEJO, M. I.; GARCIA VALLEJO, M. C.; VELASCO, A. (1987). VII Congreso Nacional de Química (Química Agrícola y Alimentaria 2). Sevilla.

GULLUCE, M.; SAHIN, F.; SOKMEN, M.; OZER, H.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; POLISSIOU, M.; ADIGUZEL, A.; OZKAN, H. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *Longifolia*. *Food Chemistry*, 103: 1449-1456.

Ghoulami S, Idrissi A, Il Fkih-Tetouani S (2000). Phytochemical study of *Mentha longifolia* of Morocco. *Fitoterapia* 72: 596-598.

HAJLAOUI, H.; SNOUSSI, M.; FALLAH, H.; KSOURI, R.; BAKHROUF, A. (2008). Comparison of chemical composition and antimicrobial activities of *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia* essential oil from two Tunisian localities (Gabes and Sidi Bouzid). *Annals of Microbiology*, 58: 513-520.

HARLEY, R.; BRIGHTON, C. A. (1977). Chromosome numbers in the genus *Mentha* L. *Bot. J. Linnean Soc.* 74: 1-96.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; NIGAM, P. S.; ASHRAF, M.; GILANI, A. H. (2010). Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *J. Sci Food Agric*, 90: 1827-1836.

Komarov, V. L. et al., eds. *Flora SSSR. 1934-1964 (F USSR) Eremostachys lanata and Mentha mozaffarianii, two new Labiatae from Iran - Jamzad – 1987*

Karousou R, Balta M, Hanlidou E (2007). "Mints", smells and traditional uses in Thessaloniki (Greece) and other Mediterranean countries. *J. Ethnopharmacol.* 109: 248-257.

LAWRENCE, B. M. (2006). *Mint. The genus Mentha*, en: *Mentha: An Overview of Its Classification and Relationships*. Ed. CRC Press. New York. 558 pp.

Llorens-Molina JA, Vacas S, López S, Rivero CF, García-Rellán D, Boira H. 2012. Diurnal and environmental variations in essential oil composition of *Mentha suaveolens* L. and *Mentha longifolia* L. populations from the Eastern Iberian Peninsula. *Proceedings of International Symposium on Essential Oils*, 5 to 8 September 2012, Lisbon (Portugal), 108.

Llorens-Molina JA, Vacas S, García D, Verdeguer M. 2014. Individual Monitoring to Study Organ and Diurnal Variations in *Mentha longifolia* L. *Natural Volatiles & Essential Oils* 1(1), 73-79.

Lubbe A, Verpoorte, R. 2011. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Ind. Crops Prod.* 34, 785-801.

SHAROPOV, F. S.; SULAIMONOVA, V. A.; SETZER, W. N. (2012). Essential oil composition of *Mentha longifolia* from wild populations growing in Tajikistan. *Journal of Medicinally Active Plants*, 1 (2):76-84.

Shinwari, Z.K. and M.N. Chaudheri. 1992. A taxonomic revision of genus *Mentha* from Pakistan. *Acta Phytotax. Geobot.*, 43(2): 97-110.

Shinwari, Z.K., S. Sultan and T. Mehmood. 2011. Molecular and morphological characterization of selected *Mentha* species. *Pak. J. Bot.*, 43(3): 1433-1436.

Shinwari, Z.K. and S.S. Gilani. 2003. Sustainable harvest of medicinal plants at Bulashbar Nullah, Astore (Northern Pakistan). *J. Ethnopharmacol.*, 84(2-3): 289-298.

Qaiser, M. and S. Nazimuddin. 1981. Rhamnaceae. No. 140. In: *Flora of Pakistan*, (Eds.): E. Nasir and S.I. Ali. National Herbarium, Islamabad and University of Karachi, Karachi, Pakistan.