

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR EN INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL
MEDIO NATURAL

**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD
ANTIFÚNGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES
DE *Artemisia herba-alba* Asso, *Artemisia
absinthium* L. Y *Mentha longifolia* L.**

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

Curso 2016/2017

Autora: D^a Meritxell Torres Juan

Tutor académico: Profesor Dr. Juan Antonio Llorens Molina

Cotutora: M^a Pilar Santamarina Siurana

Directora Experimental: Josefa Roselló Caselles

RESUMEN

Composición química y actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Artemisia herba-alba* Asso, *Artemisia absinthium* L. y *Mentha longifolia* L.

En este trabajo se evalúa la capacidad antifúngica de los aceites esenciales de *A. absinthium*, *A. herba-alba* y *M. longifolia* sobre los hongos fitopatógenos y de post-cosecha *Alternaria alternata*, *Botryotinia fuckeliana*, *Curvularia hawaiiensis*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium oxysporum* lycopersici, *Fusarium nygamai*, *Rhizoctonia solani* y *Verticillium dahliae*, con el fin de obtener un biofungicida botánico respetuoso con el medioambiente, y de bajo riesgo.

Los aceites esenciales fueron obtenidos por hidrodestilación de planta cultivada en parcelas experimentales de la UPV (*Artemisia absinthium* L y *Mentha longifolia* L, de composición conocida) y de una población silvestre de *A. herba-alba*. En esta última se estudió la variabilidad química de la población a partir de muestras individuales procesadas mediante extracción-destilación simultáneas (equipo Likens-Nickerson). El análisis de su composición se realizó mediante cromatografía de gases, mostrando una clara homogeneidad cualitativa en su composición química.

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 300 µg/mL.

El aceite esencial de la menta (*M. longifolia*) reveló resultados muy satisfactorios, mostrando valores de inhibición del crecimiento miceliar (MGI) entre el 40 y 75% en casi todos los hongos ensayados. *A. absinthium* mostró efectividad frente a *B. fuckeliana*, *C. hawaiiensis* y *R. solani* con valores MGI del 50%, siendo este un valor alto. El aceite esencial de *A. herba alba* presentó resultados de inhibición del crecimiento miceliar del 30% frente a *C. hawaiiensis*, siendo más bajos en los restantes hongos ensayados.

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

Palabras clave: *Artemisia herba-alba* Asso, *Artemisia absinthium* L., *Mentha longifolia* L., capacidad antifúngica, aceite esencial.

ABSTRACT

Chemical composition and antifungal activity of essential oils of *Artemisia herba-alba* Asso, *Artemisia absinthium* L. and *Mentha longifolia* L.

In this research study, the antifungal potential power of the essential oils of *Artemisia absinthium*, *Artemisia herba-alba* and *Mentha longifolia* is analysed on the phytopathogenic and post-harvest fungus *Alternaria alternata*, *Botryotinia fuckeliana*, *Curvularia hawaiiensis*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium oxysporum lycopersici*, *Fusarium nygamai*, *Rhizoctonia solani* and *Verticillium dahliae*, in order to obtain an environmentally-friendly and low-risk botanical bio-fungicide.

The essential oils were obtained by hydrodistillation of cultivated plants coming from the experimental fields in UPV (*Artemisia absinthium* L. and *Mentha longifolia* L., whose composition were known) and a wild population of *A. herba-alba*. For this last one, the chemical variability of population was studied from individual samples which were processed by simultaneous distillation-extraction (Likens-Nickerson equipment). The chemical analysis was performed by gas chromatography, showing clearly qualitative homogeneity regarding its composition.

The "in vitro" antifungal activity of essential oils was assessed following a modified methodology based on the one designed by Singh *et al.*, (2008). The bioassays were performed with a dose of 300 µg / mL.

Satisfactory results were obtained from the oil of mint (*M. longifolia*) showed satisfactory results. In fact, it shows values of inhibition of mycelial growth (MGI) between 40 and 75% in almost all the tested fungus. Likewise, *A. absinthium* was effective against *B. fuckeliana*, *C. hawaiiensis* and *R. solani* with MGI values of 50%, being it a high value. The essential oil of *A. herba-alba* presented 30% inhibition of mycelial growth against *C. hawaiiensis*, being lower in the remaining fungus tested.

This study reveals the great potential of the essential oil of *Mentha longifolia* for the fungus control, showing it as a solid alternative to agrochemicals.

Keywords: *Artemisia herba-alba* Asso, *Artemisia absinthium* L., *Mentha longifolia* L., antifungal activity, essential oil.

RESUM

Composició química i activitat antifúngica dels olis essencials d'*Artemisia herba-alba* Asso, *Artemisia absinthium* L. i *Mentha longifolia* L.

En aquest treball s'avalua la capacitat antifúngica dels olis essencials d'*Artemisia herba-alba* Asso, *Artemisia absinthium* i *Mentha longifolia* sobre els fongs fitopatògens i de post-collita *Alternaria alternata*, *Botryotinia fuckeliana*, *Curvularia hawaiiensis*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium oxysporum lycopersici*, *Fusarium nygamai*, *Rhizoctonia solani* i *Verticillium dahliae*, a fi d'obtenir un biofungicida botànic respectuós amb el mediambient, i de baix risc.

Els olis essencials van ser obtinguts per hidrodestilació de planta cultivada en parcel·les experimentals de l'UPV (*Artemisia absinthium* L. i *Mentha longifolia* L., de composició coneguda) i d'una població silvestre d'*A. herba-alba*. En aquesta última s'estudià la variabilitat química de la població a partir de mostres individuals processades mitjançant extracció-destilació simultànies (equip Likens-Nickerson). L'anàlisi de la seua composició es va realitzar per mitjà de cromatografia de gasos, mostrant una clara homogeneïtat qualitativa en la seua composició química.

L'activitat antifúngica "in vitro" dels olis essencials s'evaluà seguint la metodologia de Singh *et al.*, (2008) modificada. Els bioassajos es realitzaren a la dosi de 300 µg/ml.

L'oli essencial de la menta (*M. longifolia*) revelà resultats molt satisfactoris, mostrant valors d'inhibició del creixement miceliar (MGI) entre el 40 i 75% en quasi tots els fongs assajats. *A. absinthium* mostrà efectivitat front a *B. fuckeliana*, *C. hawaiiensis* i *R. solani* en valors MGI del 50%, sent aquest un valor alt. L'oli essencial d'*A. herba-alba* presentà resultats d'inhibició del creixement miceliar del 30% front a *C. hawaiiensis*, sent més baixos als restants fongs assajats.

En aquest estudi es posa de manifest el gran potencial de l'oli essencial de *Mentha longifolia* per al control dels fongs i es mostra com una alternativa sòlida als agroquímics.

Paraules clau: *Artemisia herba-alba* Asso, *Artemisia absinthium* L., *Mentha longifolia* L., capacitat antifúngica, oli essencial.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento al director de este trabajo, D. Juan Antonio Llorens Molina, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo y haber podido descubrir así el mundo de los aceites esenciales de una forma más profunda. Por su seguimiento, continua orientación y paciencia, por confiar en mí y hacer este trabajo posible.

A M^a Pilar Santamarina Siurana y a Josefa Roselló Caselles, por su tiempo dedicado a este trabajo, por su gran ayuda, dedicación y apoyo; por haberme enseñado, entre otras muchas cosas, el gran mundo de la botánica, campo que desde pequeña he querido descubrir.

A mis padres, José Manuel Torres Daza y María del Carmen Juan Ferrer, por haberme apoyado tanto económica como emocionalmente durante estos cinco años de carrera. Por estar siempre a mi lado, sobre todo en las épocas de exámenes cuando mi carácter se volvía más irascible. Por confiar en mí desde el primer día de universidad en que todo tendría un buen final.

A José Marced Adriá, por estar conmigo todos los días, por apoyarme en todo momento, y por su poder de convertir los días malos en buenos.

Muchísimas gracias a todos.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCION.....	1
1.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LAS ESPECIES.....	3
1.1.1 <i>Artemisia herba-alba</i> Asso.....	3
1.1.2 <i>Artemisia absinthium</i> L.	4
1.1.3 <i>Mentha longifolia</i> L.	5
1.2 LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA Y CLIMA.....	6
1.3 USOS TRADICIONALES Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	6
1.4 COMPOSICIÓN Y TOXICIDAD.....	8
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	11
2.1 OBJETIVOS.....	11
2.2 PLAN DE TRABAJO.....	12
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	13
3.2. EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL.....	14
3.2.1 MATERIALES (Equipo Likens-Nikerson y Equipo Clevenger).....	14
3.2.2 FUNDAMENTO.....	15
3.2.2.1 Equipo Likens-Nikerson.....	15
3.2.2.2 Equipo Clevenger.....	16
3.2.3 METODOLOGÍA.....	16
3.2.3.1 Equipo Likens-Nikerson.....	16
3.2.3.2 Equipo Clevenger.....	17
3.3. COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	18
3.3.1 MATERIALES Y EQUIPOS.....	18
3.3.2 FUNDAMENTO.....	18
3.3.3 METODOLOGÍA: PARÁMETROS DE FUNCIONAMIENTO EN EL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	19

3.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES	21
3.4.1 MATERIALES.....	21
3.4.2 HONGOS.....	22
3.4.3 CÁLCULO DE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAR (MGI)..	22
4. RESULTADOS.....	23
4.1. CROMATOGRAMA DE GASES.....	23
4.2 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Artemisia herba-alba</i>.....	24
4.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES. CÁLCULO DE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAR.....	26
4.3.1 MGI (%) MICELIAL GROWTH INHIBITION.....	26
4.3.2 <i>Artemisia herba-alba</i>	29
4.3.3 <i>Artemisia absinthium</i>	30
4.3.4 <i>Mentha longifolia</i>	32
5. CONCLUSIONES.....	36
6. BIBLIOGRAFÍA.....	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla bibliográfica de los componentes mayoritarios (>5%) de las partes aéreas de <i>Artemisia herba-alba</i> de diferente procedencia.....	8
Tabla 2. Tabla bibliográfica de los componentes mayoritarios (>5%) de las partes aéreas de las partes aéreas de <i>Artemisia absinthium</i> de diferente procedencia.....	9
Tabla 3. Tabla bibliográfica de los componentes mayoritarios de <i>Mentha longifolia</i> de diferente procedencia.....	10
Tabla 4. Composición química de las partes aéreas de <i>Artemisia herba-alba</i>	24
Tabla 5. Composición química del aceite esencial de <i>Artemisia herba-alba</i> empleada en el ensayo de la actividad antifúngica.....	25
Tabla 6. Inhibición del crecimiento miceliar.....	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Ilustración 1. <i>Artemisia herba-alba</i>	3
Ilustración 2. <i>Artemisia absinthium</i>	4
Ilustración 3. <i>Mentha longifolia</i>	5
Ilustración 4. Localización geográfica de las muestras de <i>Artemisia herba-alba</i> recolectadas en los alrededores de Calamocha (Teruel).....	13
Ilustración 5. Equipo Likens-Nikerson.....	15
Ilustración 6. Equipo Clevenger.....	17
Ilustración 7. Esquema del método analítico.....	20
Ilustración 8. Cromatograma GC/MS de aceite esencial de <i>A. herba-alba</i>	23
Ilustración 9. Representación gráfica del MGI (%) de <i>Artemisia herba-alba</i>	26
Ilustración 10. Representación gráfica del MGI (%) de <i>Artemisia absinthium</i>	27
Ilustración 11. Representación gráfica comparativa del MGI (%) de <i>Artemisia herba-alba</i> frente a <i>Artemisia absinthium</i>	27
Ilustración 12. Representación gráfica del MGI (%) de <i>Mentha longifolia</i>	28
Ilustración 13. Crecimiento de CH en PDA control (izquierda) y en PDA con el aceite esencial de <i>A. herba-alba</i> (derecha), a los 7 días de incubación	29
Ilustración 14. Crecimiento de BF en PDA control (izquierda) y en PDA con el aceite esencial de <i>A. herba-alba</i> (derecha), a los 7 días de incubación	29
Ilustración 15. Crecimiento de BF en PDA control (izquierda) y en PDA con el aceite esencial de <i>A. absinthium</i> (derecha), a los 7 días de incubación	30
Ilustración 16. Crecimiento de CH en PDA control (izquierda) y en PDA con el aceite esencial de <i>A. absinthium</i> (derecha), a los 7 días de incubación	30
Ilustración 17. Crecimiento de RS en PDA control (izquierda) y en PDA con el aceite esencial de <i>A. absinthium</i> (derecha), a los 7 días de incubación	31
Ilustración 18. Crecimiento de BF en PDA control (izquierda) y en PDA con el aceite esencial de <i>M. longifolia</i> (derecha), a los 7 días de incubación	32

Ilustración 19. Crecimiento de CH en PDA control (izquierda) y en PDA con el aceite esencial de <i>M. longifolia</i> (derecha), a los 7 días de incubación	32
Ilustración 20. Crecimiento de Fn en PDA control (izquierda) y en PDA con el aceite esencial de <i>M. longifolia</i> (derecha), a los 7 días de incubación	33
Ilustración 21. Crecimiento de FOL en PDA control (izquierda) y en PDA con el aceite esencial de <i>M. longifolia</i> (derecha), a los 7 días de incubación	33
Ilustración 22. Crecimiento de RS en PDA control (izquierda) y en PDA con el aceite esencial de <i>M. longifolia</i> (derecha), a los 7 días de incubación.....	34
Ilustración 23. Crecimiento de VD en PDA control (izquierda) y en PDA con el aceite esencial de <i>M. longifolia</i> (derecha), a los 7 días de incubación	34

1. INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos procedentes del metabolismo secundario de muchas especies vegetales, principalmente de las denominadas plantas aromáticas y medicinales. Cumplen funciones muy diversas, habitualmente asociadas a su capacidad de adaptación al medio (Bakkali *et al.*, 2008). Son líquidos, relativamente volátiles y se caracterizan por un olor intenso y frecuentemente agradable. Además, son solubles en lípidos y en disolventes orgánicos. Los aceites esenciales son extraídos de un numeroso conjunto de plantas aromáticas, características de los ecosistemas mediterráneos, aunque ampliamente distribuidas en zonas geográficas muy diversas y de condiciones ambientales notablemente distintas (Bakkali *et al.*, 2008). Los aceites esenciales son conocidos por sus propiedades antisépticas (bactericidas y fungicidas), por lo que son utilizados en la conservación de alimentos. También destacan por sus aplicaciones medicinales como consecuencia de su acción analgésica, sedante, antiinflamatoria, espasmolítica y anestésica, entre otras. Por otra parte, tal como se indicaba anteriormente, los aceites esenciales juegan en la naturaleza un papel ecológico importante en la protección de las plantas con actividad bactericida, antiviral y fungicida, así como frente a la acción de animales herbívoros. Actualmente se conocen alrededor de 3000 aceites esenciales, 300 de los cuales son comercialmente importantes en farmacia, alimentación, agronomía, sanidad y para la industria cosmética y del perfume (FAO, 1998).

En cuanto a los métodos de extracción, se denomina “aceite esencial” al producto obtenido de la destilación por arrastre de vapor de agua del material vegetal o mediante la expresión en frío (relativa a los aceites esenciales obtenidos de las cortezas de los cítricos). No obstante, en muchas ocasiones, sobre todo cuando uno de los objetivos fundamentales es conocer la composición química de la fracción volátil de los metabolitos secundarios de una planta, se utilizan métodos de extracción como la destilación-extracción simultánea (SDE), microextracción en fase sólida, extracción con disolventes volátiles, empleo de fluidos supercríticos, enflorado, etc. Estos dan lugar a extractos que suelen reflejar más fielmente dicha composición, por lo que se utilizan ampliamente en estudios de carácter quimiotaxonómico y en la investigación sobre la influencia de factores ecológicos, agronómicos, etc., en el metabolismo secundario de las plantas (López Castaño, 2012). De hecho, en este trabajo, se ha utilizado la extracción-destilación simultánea (SDE) para la caracterización del aceite esencial de *Artemisia herba-alba* Asso, utilizado posteriormente en los ensayos de actividad antifúngica, junto a los aceites esenciales de *Artemisia absinthium* y *Mentha longifolia*.

Por otra parte, los hongos son un grupo amplio y diverso que causan la mayoría de enfermedades conocidas de plantas, así como son la base de procesos industriales de la fermentación (elaboración de pan, vinos, cervezas), y también son el fundamento de la fabricación de diversos antibióticos (Mader y Windelspecht, 2013). Los hongos se han considerado beneficiosos y destructivos 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 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 moléculas relativamente pequeñas que pueden contaminar alimentos, piensos o materias primas utilizadas para su elaboración, originando un grupo de enfermedades y trastornos, denominados micotoxicosis, perjudiciales para el hombre o los animales. Solo 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)

En este trabajo se estudia la composición del aceite esencial de *Artemisia herba-alba* y se evalúa la capacidad antifúngica de los aceites esenciales de *Artemisia herba-alba*, *Artemisia absinthium* y *Mentha longifolia* frente a hongos fitopatógenos y que causan alteraciones en post-cosecha.

1.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LAS ESPECIES

Se ha recurrido al sistema APG IV (Grupo para la filogenia de angiospermas) para la ubicación taxonómica de las especies estudiadas (APG IV, 2016).

1.1.1 *Artemisia herba-alba*

La *Artemisia herba-alba* Asso se clasifica en el Reino Plantae, División Magnoliophyta, Clase Magnoliopsida, Orden Asterales, Familia Asteraceae, Subfamilia Asteroideae, Tribu Anthemideae, Género *Artemisia* L., y Especie *Artemisia herba-alba* Asso.

La *Artemisia herba-alba* Asso (Ilustración 1) es un arbusto enano, con una altura generalmente comprendida entre veinte y cuarenta centímetros, siendo una planta leñosa, que produce desde su base ramas erectas. Es perenne, de color verde-grisáceo tanto en tallo como en hojas, y posee un aroma intenso y característico. Las hojas adultas, son de un tamaño pequeño, sin superar las mismas en la mayoría de los casos los 8 milímetros de longitud. Las hojas de los brotes estériles son grises, pecioladas, ovales a orbiculares en contorno, mientras que las hojas de los tallos florecientes, más abundantes en invierno, son más pequeñas. Los capítulos de las flores son pequeños, esféricos, ovoides o cilíndricos, y están compuestos de flores sésiles, oblongas y que se estrechan en su base. El receptáculo está desnudo y el número de flores hermafroditas en el mismo oscila entre 3 y 6 por cabeza. No son muy llamativas y demuestran un color amarillo-rojizo. La floración es considerada tardía, ya que florece después de verano, desde septiembre a diciembre (Vallès *et al.*, 2011, Stübing y Bautista, 1998).

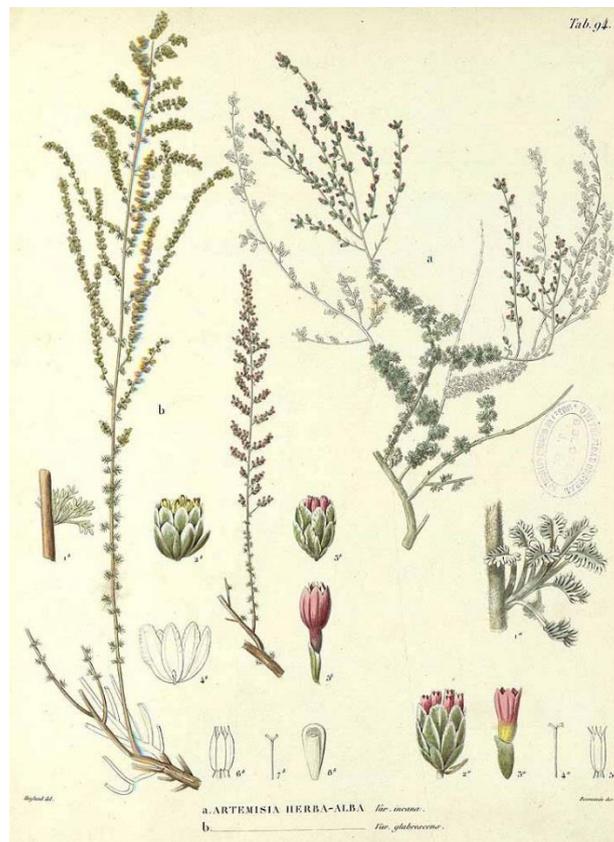


Ilustración 1 *Artemisia herba-alba* (Plant Illustrations)

1.1.2 *Artemisia absinthium*

La *Artemisia absinthium* L. se clasifica en el Reino Plantae, División Magnoliophyta, Clase Magnoliopsida, Orden Asterales, Familia Asteraceae, Subfamilia Asteroideae, Tribu Anthemideae, Género *Artemisia*, y Especie *Artemisia absinthium* L.

La *Artemisia absinthium* L. (Ilustración 2), conocida popularmente como ajeno, es una planta leñosa, que cada año produce desde su base ramas erectas, que se secan en otoño tras la fructificación. Las partes basales de estas ramas permanecen durante el invierno y, en la estación siguiente, producen nuevas ramas a partir de sus yemas. Toda la planta es de un color verde-grisáceo, tanto en el tallo como en hojas (alternas), que generalmente son de pequeño tamaño (Ariño, 1999). Presenta como rasgos más característicos las flores o capítulos, los cuales son pequeños, esféricos, ovoides o cilíndricos y están compuestos únicamente de flores sésiles insertadas sobre un receptáculo común rodeado por un involucre de brácteas. El número de flores por cabeza oscila a partir de 4-7 a más de 40, y las corolas son de color blanquecino, amarillo o púrpura, y no muy llamativo (Vallès *et al.*, 2011., Stübing y Bautista, 1998).



Ilustración 2 *Artemisia absinthium* (Plant Illustrations)

1.1.3 *Mentha longifolia*

La *Mentha longifolia* L. se clasifica en el Reino Plantae, División Magnoliophyta, Clase Magnoliopsida, Orden Lamiales, Familia Lamiaceae, Género *Mentha*, y Especie *Mentha longifolia* L.

La *Mentha longifolia* L. (Ilustración 3) es llamada comúnmente menta de caballo, hortolana o menta silvestre. La palabra *longifolia* significa hojas largas, del latín *longi-* (*longus*) largo, y *-folium* que significa hoja. Se describe botánicamente como una planta perenne y herbácea. Sus tallos son erguidos y comprenden una longitud entre 24 y 120 cm, siendo de sección cuadrangular, con una pilosidad blanquecina o grisácea. Las hojas de 15-115 x 6-42 mm, son sésiles, de forma lanceolada, lisa o rugosa en la base, con el margen provisto de dientes irregulares y patentes, el haz gris tomentoso y con el envés de color ceniciento, por la presencia de la pilosidad afelpada grisácea. La *Mentha longifolia* L. florece de mayo a octubre. Las inflorescencias, son hermafroditas y pediceladas, reunidas 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 fruto es una núcula de 0,54-0,79 mm, de elipsoide a subtriangular, de color pardo a claro (López Castaño, 2012).



Ilustración 3 *Mentha longifolia* (Plant Illustrations)

1.2 LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA Y CLIMA

La *Artemisia herba-alba* crece en zonas áridas del Mediterráneo, extendiéndose hacia el noroeste del Himalaya. Esta especie es abundante en la Península Ibérica y alcanza su población más alta en el centro de España, extendiéndose así hacia el este, sureste, y sur. Forma parte de matorrales fruticosos subhalonitrófilos desarrollados sobre suelos margosos o yesíferos en zonas con ombroclima seco.

La *Artemisia absinthium* es una planta con óptimo eurosiberiano que en la Comunidad Valenciana se desarrolla en las zonas media y continental, colonizando medios alterados y subnitrófilos. Alcanza su óptimo en medios montanos secos con tendencia a subhúmedos y húmedos.

La *Mentha longifolia* crece en zonas húmedas ya sean bordes de arroyos, juncuales, prados húmedos y en ocasiones bordes de carreteras o caminos donde hay más aporte de nitrógeno, desde unos 400 a 2300 m de altitud (López Castaño, 2012).

1.3 USOS TRADICIONALES Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA

A pesar de que algunos grupos taxonómicos del género *Artemisia* son considerados malas hierbas invasoras que pueden afectar negativamente a las cosechas, existe un gran número de especies de *Artemisia* que tiene un alto valor económico en alimentación, medicinas, forraje, plantas ornamentales y otros usos (Vallès y McArthur, 2001). El género *Artemisia* es conocido principalmente por contener componentes bioactivos. La *Artemisia herba-alba* se ha utilizado en la medicina popular de muchos países durante mucho tiempo, siendo característica en la medicina popular marroquí como tratamiento contra la hipertensión arterial y/o diabetes. Desde el punto de vista fitoquímico, al igual que otras especies del género *Artemisia*, una de las principales características es la presencia de lactonas sesquiterpénicas que son las responsables de diversas aplicaciones de este género en medicina y farmacia. Sin embargo, no son volátiles, por lo que no forman parte del aceite esencial, siendo obtenidas habitualmente como extractos alcohólicos. En cuanto a la actividad antioxidante, cabe citar un estudio con diversas plantas medicinales de origen argelino, en el cual se incluía *Artemisia herba-alba*, donde se mostró su gran actividad antioxidante y una proporción de compuestos fenólicos superior a las plantas medicinales comunes (Djeridane *et al.*, 2006).

En relación a la actividad antibacteriana cabe destacar un estudio realizado en Sde-Boker (desierto del Negev, Israel), donde se recolectó *Artemisia herba-alba* y fue investigada su actividad anti-bacteriana. Los únicos resultados destacables fueron la gran actividad del aceite esencial de *Artemisia herba-alba* frente a algunas bacterias Gram-positivas, tales como *Streptococcus hemolyticus* y *Staphylococcus aureus*, y algunas bacterias Gram negativas, tales como *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* y *Salmonella enterica*. Sin embargo, en general, la inhibición de los aceites fue baja frente a las enterobacterias (Charchari *et al.*, 1996). En cuanto a la actividad antifúngica de *Artemisia herba-alba* se ha demostrado que está asociada con los compuestos aislados de las hojas frescas de la planta. La actividad antifúngica “*in vitro*” de esta planta ha sido evaluada frente a diversos hongos. El aceite esencial se demostró activo frente a *Zygorrhynchus sp.* y *Apergillus niger* (Charchari *et al.*, 1996).

Artemisia absinthium ha sido utilizada desde la antigüedad frente a los parásitos intestinales, en el tratamiento de la malaria y como antídoto para el opio y otros venenos depresores del sistema nervioso central (Ariño, 1999). El aceite esencial de *Artemisia absinthium* mostró actividad antibacteriana frente a patógenos humanos comunes, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*, y también mostró propiedades acaricidas (Abad *et al.*, 2012). Además de por sus virtudes medicinales, el ajeno ha sido también muy utilizado como aromatizante alimentario desde la antigüedad, y se ha utilizado igualmente como sustituto del lúpulo en la fabricación de cerveza y de la menta en ciertas infusiones (Ariño, 1999). Por otra parte, un estudio realizado sobre la actividad antifúngica de *Artemisia absinthium*, demostró su eficacia frente a los hongos *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum fsp. lycopersici* y *Fusarium solani* (Bailén y Cabrera, 2013).

En cuanto a *Mentha longifolia* destaca por sus usos medicinales, ya que esta especie posee propiedades antisépticas, antiasmáticas, carminativas y estimulantes para el aparato digestivo. Sus infusiones se emplean también para tratar fiebres, dolores de cabeza y problemas digestivos. Cabe destacar sus usos culinarios, ya que las hojas se emplean crudas o cocinadas, como aditivo a las comidas y como infusión. Asimismo, el aceite esencial de sus hojas se emplea como aditivo saborizante en repostería (López Castaño, 2012). Un estudio realizado sobre la actividad antifúngica de *Mentha longifolia* reveló que el extracto de dicha planta inhibía el crecimiento de hongos de interés clínico, además de ser activo frente a las enterobacterias *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens* (Saeide *et al.*, 2014). Otros estudios realizados por otros investigadores han demostrado el gran poder del aceite esencial de diferentes especies de *Mentha* como insecticida (Kumar *et al.*, 2011).

1.4 COMPOSICIÓN Y TOXICIDAD

En la actualidad, se han realizado múltiples estudios sobre la composición del aceite esencial de *Artemisia herba-alba*, de plantas procedentes de distintas zonas geográficas, donde se demuestra una gran variabilidad en la composición tal y como se presenta en la tabla 1.

Tabla 1 Tabla bibliográfica de los componentes mayoritarios (>5%) de las partes aéreas de *Artemisia herba-alba* de diferente procedencia

AUTOR Y AÑO	LOCALIZACIÓN	COMPONENTES (>5%)
TAHAR DOB y TAREK BENABDELKADER, 2006	M'Sila (Algeria)	γ -terpineno (2,8%), α -tuyona (1,5%), β -tuyona (15%), alcanfor (19,4%), terpinen-4-ol (2,7%), mirtenal (0,9%)
HOUDA SBAYOU y BOUCHRA ABABOU, 2014	Sudeste de Marruecos	α -pineno (0,68%), artemisia trieno (3,75%), sabineno (3,05%), α -tuyona (59,07%), 2,4-hexadieno, 2,3-dimetil (11,73%), α - camfolenal(12,71%)
MOHAMMAD M. HUDAIB y TALAL A. ARBUJAI, 2006	Jordania	Santolina alcohol (13%), artemisia cetona (12,4%), α -tuyona (16,2%), β -tuyona (8,5%), (<i>E</i>)-acetato de sabinilo (5,4%), germacreno D (4,6%)
SANA BELLIL ´, 2016	Centro de Túnez	α -tuyona (45,5%), β -tuyona (11,4%), alcanfor (6,8%), borneol (3,4%), 4-terpineol (0,9%), (<i>E</i>)-acetato de sabinilo (10,1%), 1-8-cineol (7,4%)
ILAN FEUERSTEIN ET AL., 1988	Aranjuez (España)	α -terpineol (6,3%), <i>p</i> -cimeno (3,9%), α -terpineno (1,8%), terpinen-4-ol (4,8%), cuminaldehído (0,6%), 1,8-Cineol (13,3%), alcanfor (15%), borneol (4,8%), α -pineno (1,7%), crisantenona (4,5%)

Uno de los componentes más característicos de la *Artemisia herba-alba* es la tuyona (isómeros α y β), la cual es un estimulante del sistema nervioso central, que a dosis elevadas provoca una inhibición del metabolismo oxidativo a nivel cerebral. Por este motivo, las plantas que contienen tuyona en su composición tienen limitada su utilización en alimentos y bebidas (Ariño, 1999). En un estudio realizado sobre la *A. herba-alba* en España, se observó una elevada proporción de *p*-cimeno en una de las muestras investigadas. Otros compuestos mayoritarios como 1,8-cineol o eucaliptol y davanona fueron hallados por primera vez en *Artemisia herba-alba* recolectada en España, habiendo sido previamente encontrados en poblaciones procedentes de otras zonas geográficas del Mediterráneo (Salido *et al.*, 2004). Respecto a otro estudio realizado en España sobre *Artemisia herba-alba* autóctona, Gomis *et al.* (1979) investigaron la composición, sin información cuantitativa, de una planta recolectada en la Comunidad Valenciana, en la cual el alcanfor y el 1,8-cineol resultaron ser los constituyentes principales. Feuerstein *et al.* (1988) analizaron el aceite esencial de *Artemisia herba-alba* cultivada en Madrid, identificando como compuestos mayoritarios el 1,8-cineol, un sesquiterpeno no identificado y el α -terpineol. Cabe citar también la composición de una muestra de *Artemisia herba-alba* spp. *valentina* recolectada en Jaén durante el periodo de floración, cuyos componentes principales fueron *p*-cimeno, 1,8-cineol, crisantenona, acetato de (*Z*)-crisantenilo, γ -terpineno, mirceno y alcanfor. Además, un número considerable de lactonas

sesquiterpénicas han sido aisladas en diferentes extractos de *Artemisia herba-alba* recolectada en España (Gomis *et al.*, 1979; Sanz *et al.*, 1990^a, 1990b).

En lo que respecta a *Artemisia absinthium*, en la siguiente tabla se presenta un análisis bibliográfico de su composición. :

Tabla 2 Tabla bibliográfica de los componentes mayoritarios (>5%) de las partes aéreas de las partes aéreas de *A. absinthium* de diferente procedencia.

AUTOR Y AÑO	LOCALIZACIÓN	COMPONENTES (>5%)
BAYKAN EREL ET AL., 2012	Anatolia (Turquía)	Sabineno (17,56%), mirceno (10,96%), α -felandreno (5,37%), miróxido (5,76%), acetato de crisantemilo (10,97%), acetato de (<i>E</i>)-sabinilo (7,71%)
BLAGOJEVIC ET AL., 2006	Mokra, Bela Palanka (Serbia)	Sabineno (8,1%), β -tuyona (19,8%), (<i>Z</i>)- β -epoxiocimeno (10,7%), acetato de (<i>E</i>)-sabinilo (8,8%), linalil 3-metilbutanoato (7,5%)
JUDZENTIENE ET AL., 2012	1) Klaipeda (oeste de Lituania) 2) Druskininkai Laterezis (sur de Lituania)	1) Sabineno (5,5%), (<i>Z</i>)-tuyona (6,5%), (<i>E</i>)-tuyona (11,1%), acetato de (<i>E</i>)-sabinilo (37,5%) 2) (<i>Z</i>)- β -epoxiocimeno (8,5%), acetato de (<i>E</i>)-sabinilo (33%)
LLORENS-MOLINA Y VACAS, 2015 -VEGETACIÓN (26/06/2012) -PLENA FLORACIÓN- INICIO DE LA MADURACIÓN DEL FRUTO (15/09/2012)	Calamocha (Teruel)	-Vegetación: (<i>Z</i>)- β -epoxiocimeno (71,5%), (<i>Z</i>)-acetato de crisantemilo (10,4%) -Plena floración-inicio de la maduración del fruto: (<i>Z</i>)- β -epoxiocimeno (49,3%), (<i>Z</i>)-acetato de crisantemilo (17,1%)
LLORENS-MOLINA ET AL., 2016 -HOJA	Calamocha (Teruel)	1) (<i>Z</i>)- β -epoxiocimeno (78,5%), (<i>E</i>)- β -acetato epoxiocimeno (6,4%) 2) (<i>Z</i>)- β -epoxiocimeno (63,7%), (<i>Z</i>)-acetato de crisantemilo (25,8%) 3) (<i>Z</i>)- β -epoxiocimeno (80%), alcanfor (7,1%)
LOPES-LUTZ ET AL., 2008	Alberta (Canadá)	Mirceno (10,8%), (<i>E</i>)-tuyona (10,1%), acetato de (<i>E</i>)-sabinilo (26,4%)
REZAEINODEHI Y KHANGOLI, 2008	Irán	β -Pino (23,8%), β -tuyona (18,6%)
SHAROPOV ET AL, 2012 -PRE.FLORACIÓN (1, 2) -PLENA FLORACIÓN (3)	1) Khonaobod, Muminobod (Tajikistan) 2, 3) Chormaghzak, Yovon	1) Mirceno (8,6%), linalool (5,6%), β -tuyona (7,3%), Acetato de linalool (7%), (<i>Z</i>)-acetato de crisantemilo (15,5%), germacreno D (8%), dihidrocamazuleno 1(e) (5,5%)

	(Tajikistan)	2) Mirceno (22,7%), α -felandreno (5,3%), linalool (5,3%), (Z)-acetato de crisantemilo (7,7%), dihidrocamazuleno 1(e) (10,5%), dihidrocamazuleno 4(f) (6,2%) 3) Mirceno (9,2%), linalool (7%), (Z)-acetato de crisantemilo (17,9%), dihidrocamazuleno 1(e) (11,6%), dihidrocamazuleno 3(g) (5,7%)
ZANOUSI ET AL., 2012	Kojur, Nowshahr, Mazandaran (Irán)	-Tallo: sabineno (10,05%), β -pineno (6,29%), 1,8-cineol (14,09%), β -tuyona (40,91%), (Z)-crisantemol (8,92%) -Hoja: sabineno (9,78%), β -pineno (6,28%), 1,8-cineol (13,58%), β -tuyona (36,44%), (Z)-crisantemol (8,87%) -Fruto: sabineno (8,35%), β -pineno (8,46%), 1,8-cineol (8,10%), β -tuyona (24,27%), (Z)-crisantemol (18,92%)

En el caso de caso de *Artemisia absinthium*, las diferencias encontradas entre los principales compuestos del aceite esencial de *Artemisia absinthium* se han relacionado en algunos casos con la zona geográfica y la altitud de la población (Ariño, 1999), así como la variación estacional (Llorens Molina y Vacas, 2015). La tuyona está presente en un gran número de plantas de ajeno, pero se conoce que existen ajenos sin tuyona o con muy bajas concentraciones, cuyas aplicaciones en el campo de la alimentación están aún por explotar a beneficio del ser humano (Corell, 2016).

Por último, en la tabla 3 se presenta un análisis bibliográfico de la composición de la *Mentha longifolia*:

Tabla 3 Tabla bibliográfica de los componentes mayoritarios de *Mentha longifolia* de diferente procedencia.

AUTOR Y AÑO	LOCALIZACIÓN	COMPONENTES (>5%)
YOUNIS Y BESHIR, 2004	Sudán	Carvona (67%), limoneno (14%)
ASEKUN ET AL., 2007	Sud África	Mentona (31-48%), pulegona (18-35%), 1,8-cineol (13-17%)
KOKKINI ET AL, 1995	Creta (Grecia)	Carvona (56-66%), 1,8-cineol (2-13%), limoneno (3-11%), (E)-dihidrocarvona (1-33%)
KOLIOPOULOS ET AL., 2010	Grecia	Quimiotipo I: Carvona (55%) y limoneno (20%) Quimiotipo II: (Z)-Óxido de piperitona (33%), 1,8-cineol (25%), limoneno (7%)
SINGH ET AL., 2008	India	Óxido de piperitona (54%), (E)-Óxido de piperitenona (20%)
MAFFEI, 1988	Italia	Óxido de piperitona (77%)
VENSKUTONIS, 1996	Lituania	Óxido de piperitona (44-57%), 1,8-cineol (8-15%), mirceno (6-10%)

HUSSAIN, 2009	Pakistan	Óxido de piperitona (40-65%), piperitona (2-16%), borneol (2-13%)
SHAROPOV ET AL., 1983	Kazakhstan	Óxido de piperitona (52%)
MONFARED ET AL., 2002	Iran	Carvona (62%), limoneno (19%)

En cuanto a los componentes mayoritarios de la *Mentha longifolia*, se observa que los más comunes son los óxidos de piperitona y de piperitenona, la carvona y la mentona.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1 OBJETIVOS

Los aceites de *Artemisia absinthium* y *Mentha longifolia* han sido estudiados en el Instituto Agroforestal Mediterráneo (IAM) a lo largo de los últimos años, realizándose estos estudios sobre poblaciones determinadas, caracterizando sus quimiotipos y la variabilidad intrapoblacional, estando todos estos resultados publicados en diferentes revistas (Llorens-Molina *et al.*, 2008, 2014, 2015a, 2015b, 2016). En el caso de la *Artemisia herba-alba*, por tratarse de una especie cuyo aceite esencial se estudia por primera vez en el IAM, se tiene como objetivo su caracterización química, es decir, determinar la variabilidad intrapoblacional, y composición química del material vegetal procedente de una población representativa situada en la provincia de Teruel. Para cada uno de los tres aceites esenciales estudiados, se pretende evaluar su potencial antifúngico frente a hongos fitopatógenos y hongos que causan alteraciones en post-cosecha.

Para ello se han planteado los siguientes objetivos:

- 1) Extraer el aceite esencial de las diferentes muestras aéreas de *Artemisia herba-alba*, recolectada en Teruel, para así poder caracterizar y determinar su composición química, teniendo en cuenta la variabilidad intrapoblacional con objeto de detectar la posible presencia de quimiotipos diferentes.
- 2) Evaluar la actividad antifúngica de los aceites de *Artemisia herba-alba*, *Artemisia absinthium* y *Mentha longifolia* con una composición química específica dentro de la amplia quimiodiversidad que muestran estos aceites esenciales, frente a los hongos *Fusarium oxysporum lycopersici* (FOL), *Fusarium nygamai* (FN), *Botryotinia fuckeliana* (BF), *Alternaria alternata* (AA), *Rhizoctonia solani* (RS), *Curvularia hawaiiensis* (CH), *Epicoccum nigrum* (EpN) y *Verticillium dahliae* (VD).

2.2 PLAN DE TRABAJO

Durante este proyecto se ha establecido un plan de trabajo que ha ayudado a conseguir los objetivos mencionados anteriormente:

- Recolección de 15 individuos de *Artemisia herba-alba*.
- Secado al aire de la parte aérea, en las condiciones de humedad y temperatura del laboratorio, hasta peso constante, siendo posteriormente congeladas a -40°C hasta el momento de su extracción.
- Extracción de los aceites esenciales de cada muestra de *Artemisia herba-alba* a través del método de extracción-destilación simultánea (SDE), mediante el equipo Likens-Nickerson.
- Aplicación de cromatografía de gases (GC) como método de separación, con detección mediante espectrometría de masas (EM) para la identificación, y con detector de ionización de llama (habitualmente citado por sus siglas en inglés: FID) para la cuantificación, determinando así la composición química de cada muestra de aceite esencial. De este modo es también posible comparar la composición de los aceites esenciales de la población de *Artemisia herba-alba* estudiada con los procedentes de otras localizaciones geográficas.
- Realización de diferentes ensayos con los aceites esenciales de *Artemisia herba-alba*, *Artemisia absinthium* y *Mentha longifolia*, para determinar la inhibición del crecimiento micelial (MGI) de los hongos objetos de este estudio

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

1) Los aceites esenciales de *A. absinthium* y *M. longifolia* empleados en los ensayos de actividad antifúngica proceden del IAM, tal como ya se indicó en 2.1. y sus composiciones mayoritarias son las siguientes:

A. absinthium: (Z)-epoxiocimeno + (E)-epoxiocimeno (46,4 %) y acetato de (Z)-crisantenilo (35,4 %)

M. longifolia: Acetato de α -terpineol (32,6 %); acetato de carvona (10,3 %), pulegona (14,2 %), isomentona (9,2 %) y 1,8-cineol (4,8 %), α -terpineol (3,1 %), (E)-isopulegona (3,1 %) y carvona (2,9 %)

2) El aceite esencial de *Artemisia herba-alba*, proviene, por una parte, (estudio de la variabilidad intrapoblacional) de 15 individuos seleccionados al azar de en una población localizada en Teruel (España), cuyas coordenadas son 40º 54' 49 " N; 1º 17' 51" O, y 895 m de altitud. Por otra parte, el aceite esencial empleado para el ensayo de la actividad antifúngica fue obtenido homogeneizando el material procedente de 20 plantas seleccionadas al azar, en la misma población.

Posteriormente, todo el material recolectado fue secado a temperatura ambiente y en ausencia de luz 5 días aproximadamente, hasta peso constante. De esos individuos ya secados se seleccionaron diez, de los cuales se separó la parte aérea de la raíz, conservando la parte aérea a una temperatura de -40°C, hasta el momento de su extracción.



Ilustración 4 Localización geográfica de las muestras de *Artemisia herba-alba* recolectadas en los alrededores de Calamocha (Teruel)

3.2. EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

3.2.1 Materiales (Equipo Likens-Nikerson y Equipo Clevenger)

- Equipo Lickens-Nickerson (Vidrafoc)
 - Equipo Clevenger (Vidrafoc)
 - Mantas calefactoras (Ibs-Instruments)
 - Rotavapor y accesorios (Laborota 4001 HEIDOLPH) con equipo de refrigeración y vacío (SELECTA)
 - Balanza analítica (Instrumentos científicos S.A.)
 - Matraces balón (vidraFOC)
 - Viales cromatográficos de 2 mL (LABBOX)
 - Viales de inserto de 6 mm de sección y 350 microlitros de capacidad (LABBOX)
 - Tapones roscados con septum (LABBOX)
 - Parafilm (PARAFILM)
 - Vasos de precipitados (PYREX)
 - Filtro de jeringa (OlimPeak, teknokroma)
 - Guantes (Semperguard)
- Reactivos:
- Sulfato de sodio anhidro, Purísimo (PANREAC).
 - Diclorometano (Scharlau) para GC estabilizado con 50 ppm de amileno
 - Acetato de octilo, pureza igual o mayor del 99% (ALDRICN), estándar interno

3.2.2 Fundamento

3.2.2.1 Equipo Likens-Nikerson

La obtención de la fracción volátil y semivolátil de cada una de las muestras se llevó a cabo mediante la extracción-destilación simultáneas con un equipo Likens-Nickerson (Chaintreau, 2001) para el análisis de la variabilidad intrapoblacional, y mediante hidrodestilación con equipo Clevenger para obtener el aceite esencial de *A. herba-alba* que se utilizó en los ensayos de actividad antifúngica.

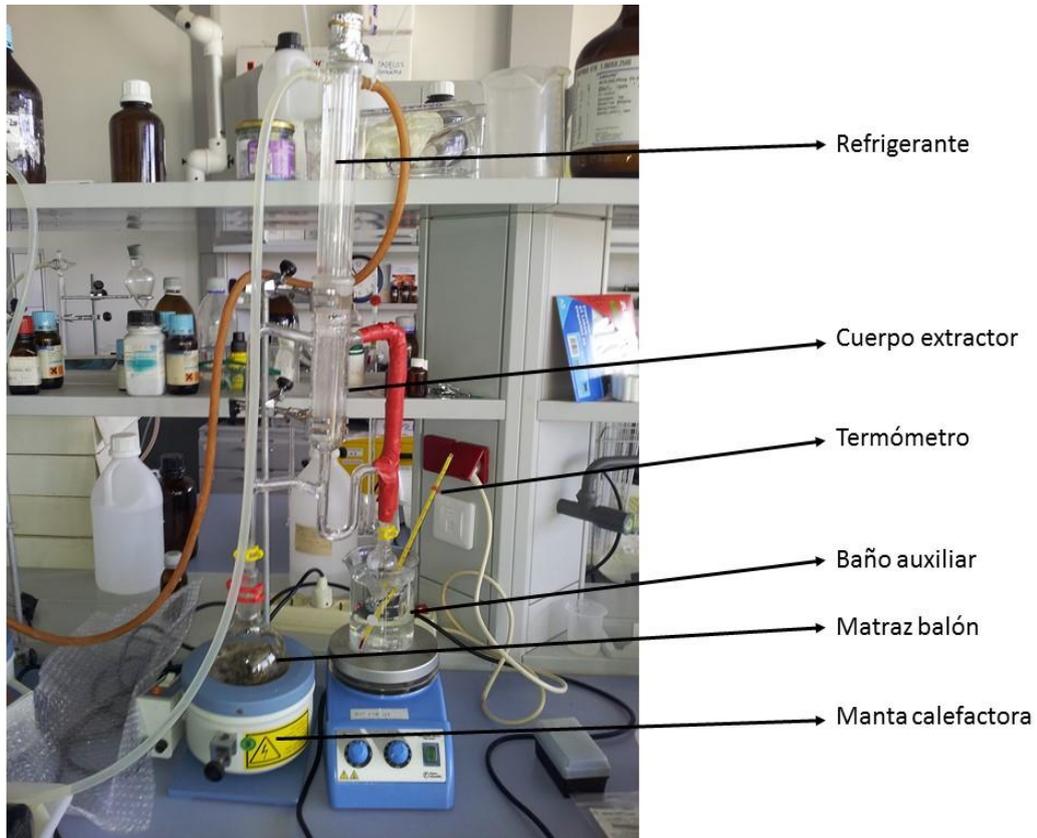


Ilustración 5 Equipo Likens-Nikerson

El equipo (Ilustración 5) se compone del cuerpo del extractor, que se halla conectado a dos matraces que según si el disolvente sea de mayor o menor densidad que el agua, se incorporan otra un lado o a otro. En este trabajo se ha utilizado como disolvente diclorometano, el cual es más denso que el agua. En el cuerpo del extractor, la rama en la que asciende el vapor del disolvente está aislada térmicamente para evitar la condensación prematura del vapor a lo largo del tubo, y favorecer así que el vapor llegue al refrigerante, donde se va a producir el proceso de extracción-destilación. Al mismo tiempo, en el matraz balón situado a la izquierda del equipo, es donde la muestra correspondiente de *Artemisia herba-alba* es sometida a destilación y de esa manera el vapor de agua con los componentes volátiles asciende. Hay también un baño auxiliar de agua a 60-65°C que se utiliza para evaporar el diclorometano y mantener así la continuidad del proceso.

3.2.2.2 Equipo Clevenger:

La hidrodestilación es una técnica de destilación por arrastre con vapor de agua. La separación de los componentes más volátiles del material vegetal (que constituyen el aceite esencial) se basa en la aditividad de las presiones de vapor de líquidos inmiscibles, como lo son el agua y los compuestos que forman el aceite esencial. Dado que la ebullición tiene lugar cuando la presión de vapor es igual a la externa (en este caso la atmosférica), al calentar conjuntamente el agua y el material vegetal, los componentes volátiles de este pueden pasar a estado de vapor a una temperatura notablemente inferior (en torno a la temperatura de ebullición del agua) a la de su temperatura de ebullición como sustancias puras. De este modo, el vapor generado contiene pequeñas cantidades de aceite esencial que al condensar, por su inmiscibilidad, quedan separadas de la fase acuosa (normalmente en la parte superior ya que suelen ser menos densos que el agua). Este proceso desarrollado durante el tiempo adecuado, permite separar la práctica totalidad del aceite esencial (Barrow, 1972).

3.2.3 Metodología

3.2.3.1 Equipo Likens-Nikerson

En primer lugar, se ha pesado cada muestra del material vegetal en una balanza. Posteriormente, cada muestra se introduce en el matraz balón donde se va a producir la destilación. Se introduce agua hasta llenar la mitad del matraz, aproximadamente.

En segundo lugar, se introduce diclorometano como disolvente en el tubo en "U" de la parte inferior del equipo extractor, así como en el matraz auxiliar (un volumen aproximado de 5 mL). Una vez introducido el disolvente y acoplado el matraz balón, se podrá introducir el refrigerante y conectar la circulación de agua fría. Es importante incidir en que la temperatura del agua de refrigeración ha de ser baja, inferior a 20°C.

Por último, es justo cuando empieza a ascender el vapor de agua con los componentes volátiles de la muestra de *Artemisia herba-alba*, cuando se incorpora el baño caliente (el cual estará a una temperatura aproximada entre 60 y 70°C), que producirá la ebullición rápida del diclorometano, el cual ascenderá por la parte derecha vertical del extractor para confluir con los vapores del agua y componentes volátiles y producir el proceso de extracción destilación. Se ha de vigilar constantemente en el experimento, que el baño caliente siempre esté en ese rango de temperaturas, midiendo cada 10 minutos la temperatura del agua con un termómetro. En las paredes del refrigerante se produce la extracción-destilación. Del refrigerante descienden las gotas que están constituidas por vapor de agua condensado junto a componentes volátiles y el disolvente condensado que ha extraído ya buena parte de sus componentes volátiles. Al ser el disolvente y el agua inmiscibles, se produce una separación de modo que en la fase acuosa retorna al matraz donde tiene lugar la destilación mientras que en la fase orgánica desciende también al matraz auxiliar donde el diclorometano va a evaporarse otra vez dado que la temperatura del baño es más que la temperatura de ebullición del diclorometano: se produce constantemente una separación continua en la cual la fase acuosa va retornando al matraz balón, el vapor de diclorometano condensado con los componentes volátiles ya extraídos donde a este matraz, desde el matraz se repite el proceso y se enriquece el contenido en volátiles del matraz auxiliar a medida que se produce la hidrodestilación en A y tiene lugar la extracción-destilación simultánea. Finalmente, se recoge el contenido de la destilación en un vial de 60 mL y se le añade como reactivo sulfato de sodio para deshidratar, hasta que no se puedan apreciar

burbujas en la superficie del contenido del vial, se rotula y se almacena en nevera, a una temperatura de -18°C .

3.2.3.2 Equipo Clevenger

En cuanto a la obtención del aceite esencial para los ensayos de actividad antifúngica, se realizó mediante hidrodestilación con un equipo Clevenger, el cual se muestra en la ilustración 6.

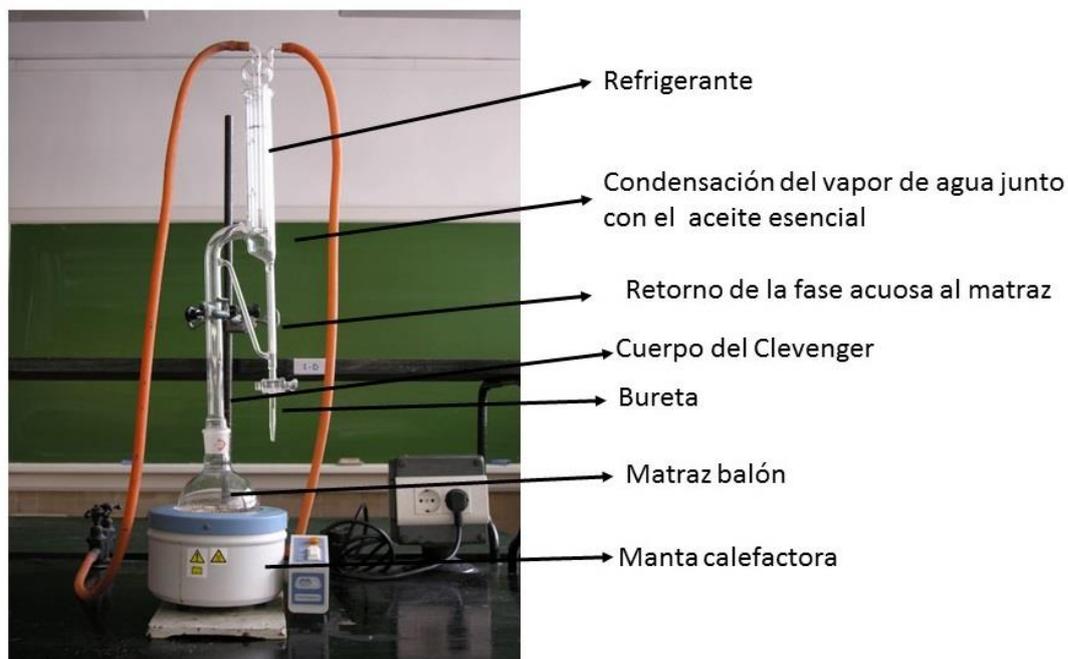


Ilustración 6 Equipo Clevenger

El equipo de hidrodestilación Clevenger consta de un matraz donde se introduce la muestra vegetal y agua destilada, de una manta calefactora, un tubo colector y un refrigerante a través del cual circula agua fría. Cuando la manta calefactora calienta el agua del matraz y esta entra en ebullición, el vapor de agua “arrastra” el aceite esencial de la muestra, de naturaleza volátil, y ambos condensan en el refrigerante, depositándose en el cuerpo del destilador Clevenger. En él se produce la separación entre la fase acuosa (hidrolato) y la orgánica (aceite esencial) que puede obtenerse dejando fluir, mediante una llave, del mismo modo que en las buretas ordinarias, la fase inferior que habitualmente es la acuosa. La fase acuosa se va reciclando al matraz de destilación, con lo que se reduce la posibilidad de que pequeñas cantidades de componentes del aceite puedan quedar retenidas en el agua.

3.3. COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

3.3.1. Materiales y equipos

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

En el primer caso, 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 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.

Material auxiliar:

- Guantes (Semperguard®)
- Viales de 1,5 mL (Technokroma)
- Diclorometano (Scharlau, nº CAS: 75-09-2), como reactivo

3.3.2 Fundamento

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

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

Cuando la finalidad es cuantitativa, el detector empleado es el de ionización de llama, cuya señal es proporcional a la cantidad de átomos de carbono presentes en cada uno de los compuestos que a través de la columna llegan al detector. El cromatograma resultante permite a través del porcentaje del área de cada pico obtener una estimación aceptable del porcentaje de cada compuesto de la muestra.

3.3.3 Metodología: Parámetros de funcionamiento en el análisis cromatográfico

En la espectroscopia de masas, 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 (EI mode, 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.

Cuando se utiliza el detector de ionización de llama (FID), 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.

Tanto para los resultados del análisis cualitativo como el cuantitativo, la identificación ha sido realizada combinando el cálculo de los índices de retención de Kovats y el análisis mediante CG-EM. Mediante una sencilla hoja de cálculo, se puede aplicar la fórmula del índice de Kovats que se muestra a continuación:

$$IK = 100 \times n + 100 \frac{\log_{10} t_{Rx} - \log_{10} t_{Rn}}{\log_{10} t_{RN} - \log_{10} t_{Rn}}$$

Donde:

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

tRx es el tiempo de retención del pico analizado.

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

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

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



Ilustración 7 Esquema del método analítico

3.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

3.4.1 Materiales

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

3.4.2. Hongos

Los hongos utilizados en el presente trabajo fueron *Fusarium nygamai* (FN) CECT 20938, *Alternaria alternata* (AA) CECT 20923, *Curvularia hawaiiensis* (CH) CECT 20934, *Epicoccum nigrum* (EpN) CECT 20945. Se aislaron en el Laboratorio de Botánica del Departamento de Ecosistemas Agroforestales a partir de cariósides de arroz de la variedad Bomba, excepto FN que se aisló de trigo. Los hongos se identificaron mediante métodos morfológicos y moleculares, y posteriormente se depositaron en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Se utilizaron también los hongos *Botryotinia fuckeliana* (BF) CECT 2100, *Rhizoctonia solani* (RS) CECT 2819 y *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici* (FOL) CECT 2715 y *Verticillium dahliae* (VD) CECT 2694 que fueron suministrados por la CECT.

3.4.3 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 µg/ml, y se repartió en capsulas 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 micelial se evaluó midiendo a los 7 días los diámetros perpendiculares de la colonia. Las cápsulas Petri control contenían únicamente PDA/Tween 20 (0.1%) y el hongo analizado.

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

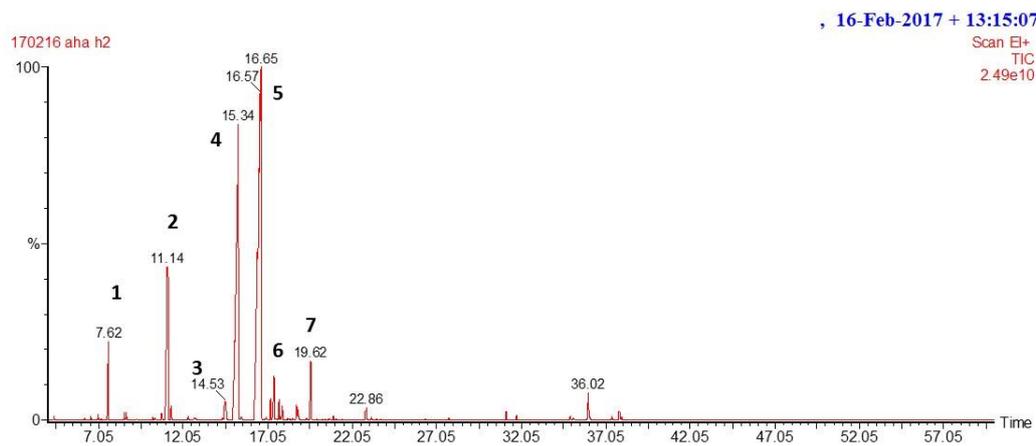
$$MGI = \frac{\text{Diámetro de la colonia control} - \text{Diámetro de la colonia aceite}}{\text{Diámetro de la colonia control}} \times 100$$

Donde el diámetro de la colonia control es la media del diámetro de las colonias en placas no tratadas con aceite y el diámetro de la colonia aceite es la media del diámetro de las colonias en placas tratadas con aceite esencial, al día 7.

4. RESULTADOS

4.1. CROMATOGRAMA DE GASES

En el siguiente cromatograma se muestra la identificación de los compuestos que están presentes en mayor cantidad en el aceite esencial de la *Artemisia herba-alba*:



1. Camfeno, 2. 1,8-cineol, 3. a-tuyona, 4. b-tuyona, 5. Alcanfor, 6. Borneol, 7. Acetato de octilo (estándar interno)

Ilustración 8 Cromatograma GC/MS de aceite esencial de *A. herba-alba*

4.2 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Artemisia herba-alba*

A continuación se muestran, en la tabla 4, los compuestos mayoritarios para cada una de las muestras analizadas de *Artemisia herba-alba*. Los compuestos analizados abarcan entre un 83,5 y un 91,5 % de la composición. (Los valores se expresan con dos decimales de acuerdo con los criterios aceptados por la revista *Journal of Essential Oils Research*)

Tabla 4 Composición química de las partes aéreas de *Artemisia herba-alba*

	KI	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	Promedio +/- error típico
Camfeno	954	5,05	4,08	6,93	2,47	8,92	5,77	5,72	7,27	5,50	4,1	5.58 ± 1.83
1,8-Cineol	1034	4,15	4,91	6,37	6,08	13,0	17,5	11,9	6,91	10,2	7,0	8.80 ± 1.34
α + β -tuyona	1107-1122	54	44,5	23,1	50,7	1,42	1,93	1,55	18,9	30,9	32	25.87 ± 6.35
Alcanfor	1153	23,1	33,9	45,4	29,5	63,1	60,3	67,7	50,3	34,2	34,5	44.19 ± 4.91
Borneol	1171	3,75	1,70	4,75	2,42	1,62	1,47	1,51	3,04	3,59	6,23	3.01 ± 0.51
	Promedio	90	89,2	86,6	91,2	88	86,9	88,4	86,5	84,3	83,5	

Donde se observa, que el compuesto mayoritario es el alcanfor con un valor medio de 44.19 y alcanzando valores muy altos en las muestras 4, 5 y 6 (67.7, 60.3 y 63.1 %, respectivamente). El segundo compuesto mayoritario se trata de la α y β -tuyona, ya que su valor medio es de 25.87 y alcanza valores muy altos en las muestras 9 y 10 (44.5 y 54 %, respectivamente). Sin embargo, los compuestos minoritarios dentro de los citados en la tabla son el camfeno y el borneol, debido a que su valor medio es de 5.58 y 3.01 %, respectivamente, alcanzando este último su valor más bajo en las muestra 5 y 6 (1.51 y 1.47 %, respectivamente). Cabe señalar, a la vista de estos datos, que pese a la variabilidad cuantitativa observada en las proporciones de los compuestos mayoritarios, desde un punto cualitativo se aprecia una clara homogeneidad entre las muestras estudiadas. Cabe pues aceptar en principio que la *A. herba-alba* de esta población pertenece a un único quimiotipo cuyo perfil coincide básicamente con el descrito en la bibliografía.

Además, se analizó la composición del aceite de *Artemisia herba-alba* utilizado en la actividad antifúngica, donde los compuestos mayoritarios son los que aparecen en la tabla 5.

Tabla 5 Composición química del aceite esencial de *Artemisia herba-alba* empleada en el ensayo de la actividad antifúngica

	Porcentaje (%)
Camfeno	3,92
1,8-Cineol	14,52
α,β -Tuyona	33,05
Alcanfor	29,77
Borneol	3,42
Total	84,68

Se observa que, en este caso, el componente mayoritario es la α y β -tuyona, en un porcentaje en la composición del aceite de 33.05 %, seguidamente del alcanfor, presente en un porcentaje de 29.77. Al igual que en las plantas estudiadas para las variedades intrapoblacionales, el camfeno y el borneol presentan proporciones menores (3.92 % y 3.42 %, respectivamente). Cabe destacar que en la muestra obtenida mezclando material del conjunto de la población no se identificaron compuestos importantes que no hubieran sido identificados en los 10 individuos analizados, confirmando así la presencia de un único quimiotipo en la población.

En general, tanto en el estudio del aceite de *Artemisia herba-alba* de la composición de la variedad intrapoblacional y la utilizada en la actividad antifúngica, los dos compuestos mayoritarios son la tuyona (isómeros α y β), y el alcanfor, mientras que los compuestos minoritarios dentro de la tabla han sido en ambos casos el camfeno y el borneol. Si realizamos una comparación con la tabla bibliográfica de los componentes mayoritarios de *Artemisia herba-alba* de diferente procedencia, los resultados son similares ya que en Túnez predomina la α y β tuyona (45.5 y 11.4%, respectivamente) y el Alcanfor (6.4%), siendo el borneol el compuesto minoritario (3.4%), en Algeria predomina la β -tuyona (15 %) y el Alcanfor (19.4%), en Jordania el componente principal es la α y β tuyona (16.2 y 8.5% respectivamente), en el Sudeste de Marruecos predomina la α -tuyona (59,07%) y en Aranjuez, España predomina el alcanfor (15%) y el borneol vuelve a ser el compuesto minoritario (4.8%). Los compuestos mayoritarios y minoritarios coinciden, las diferencias en cuanto a su porcentaje depende de la zona geográfica, la altitud de la población y la variedad estacional.

4.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES. CÁLCULO DE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAR

4.3.1 MGI (%) Micelial Growth Inhibition

Se ha calculado (Tabla 6) y representado (Ilustraciones 9, 10, 11 y 12) el efecto de los aceites de *Artemisia herba-alba*, *Artemisia absinthium* y *Mentha longifolia* en la inhibición del crecimiento micelial de los hongos *Fusarium oxysporum lycopersici*, *Fusarium nygamai*, *Botryotina fuckeliana*, *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, *Curvularia hawaiiensis*, *Epicoccum nigrum* y *Verticillum dahliae*.

Tabla 6 Inhibición del crecimiento micelial

MGI	AA	BF	CH	EpN	FN	FOL	RS	VD
<i>Artemisia herba-alba</i>	8,27	23,33	33,51	10,11	4,21	7,11	11,06	15,32
<i>Artemisia absinthium</i>	5,92	55,41	47,73	-217	2,30	7,27	47,9	18,86
<i>Mentha longifolia</i>	26,51	37,36	55,57	40,43	57,96	44,33	42,28	76,58

El aceite esencial de *Artemisia herba-alba* (Tabla 6 e Ilustración 9) no ha sido muy eficaz en cuanto a actividad antifúngica, ya que sus valores de MGI para los diferentes hongos estudiados han sido muy bajos, siendo el caso de *Curvularia hawaiiensis* y *Botryotina fuckeliana*, los hongos sobre los que dicha actividad ha resultado mayor para este aceite, mientras que *Fusarium nygamai* ha sido el que menor índice de MGI ha resultado. El aceite esencial de *A. herba-alba* presentó resultados de inhibición del crecimiento micelial del 30% sobre *C. hawaiiensis*, siendo más bajos en los restantes hongos ensayados.

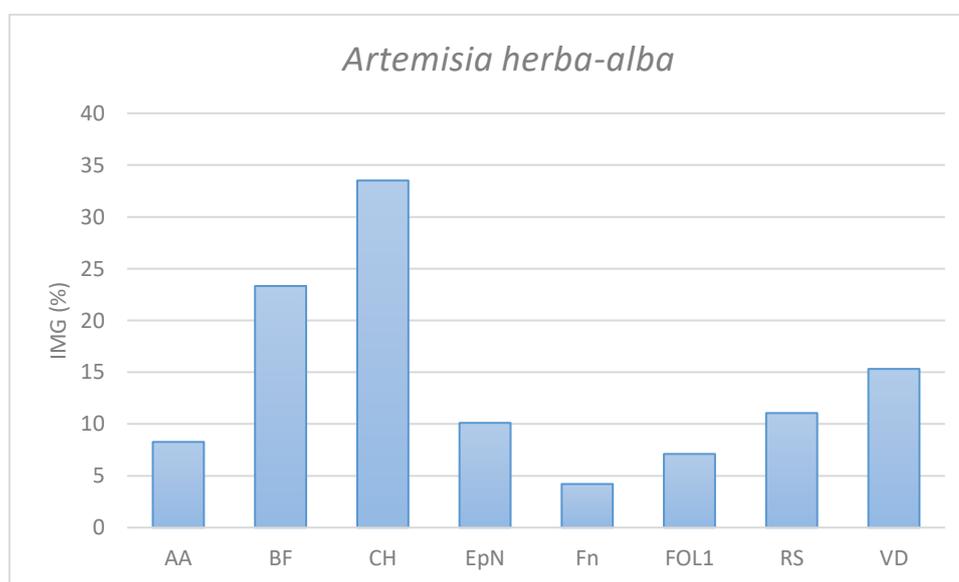


Ilustración 9 Representación gráfica del MGI (%) de *Artemisia herba-alba*

El aceite esencial de *A. absinthium* (Tabla 6 e Ilustración 10) mostró efectividad frente a *B. fuckeliana*, *C. hawaiiensis* y *R. solani* con valores MGI alrededor del 50%, siendo este un valor alto. Sin embargo, este aceite potencia el crecimiento micelial y la esporulación de la especie fúngica *Epicoccum nigrum* como se puede apreciar en la tabla 6. El aceite esencial de *A. absinthium* estudiado por nosotros mostró una efectividad muy baja frente a FOL si lo comparamos con los resultados obtenidos por Bailen y Cabrera, 2013.

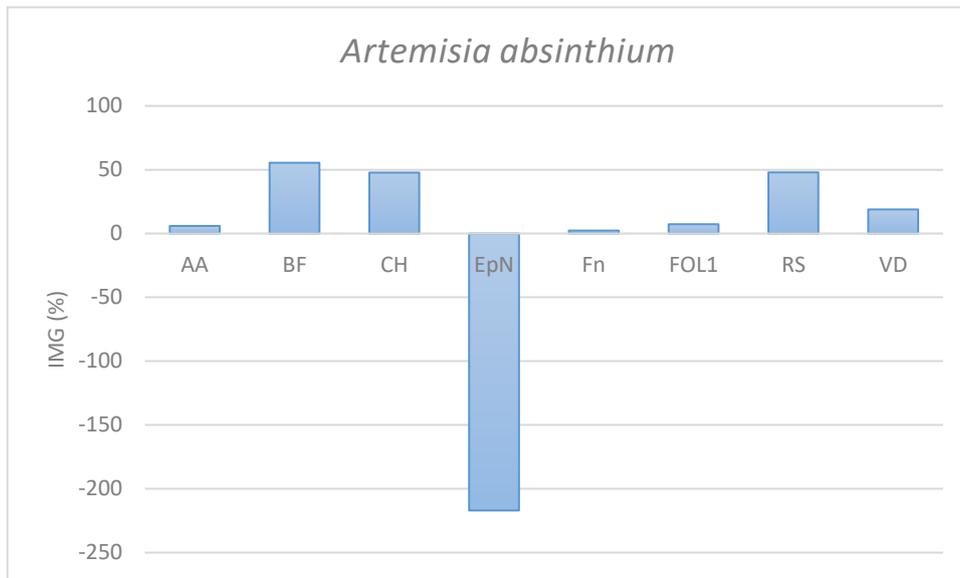


Ilustración 10 Representación gráfica del MGI (%) de Artemisia absinthium

A continuación, se representa (Ilustración 11) una comparativa *Artemisia herba-alba* y *Artemisia absinthium* en aquellos hongos que dieron MGI más alto. Se observa que *A. absinthium* tiene mayor potencial antifúngico, principalmente frente a los tres hongos.

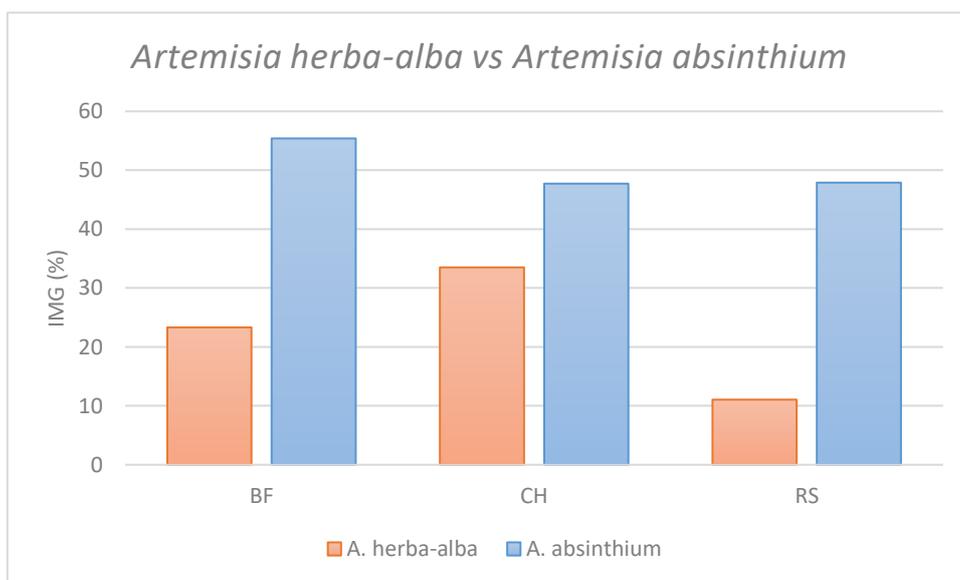


Ilustración 11 Representación gráfica comparativa del MGI (%) de Artemisia herba-alba frente a Artemisia absinthium

El aceite esencial de la menta (*M. longifolia*) reveló resultados muy satisfactorios (Tabla 6 e Ilustración 12), si los comparamos con los obtenidos con los aceites de *Artemisia*. Este aceite ha mostrado valores de inhibición del crecimiento miceliar (MGI) entre el 40 y 75% en todos los hongos ensayados, a excepción de *Alternaria alternata* (26,51). La mayor capacidad antifúngica se muestra frente a *Verticillium dahliae*, alcanzando un MGI del 77%. Estudios llevados a cabo en el Departamento de Ecosistema Agroforestales con aceites esenciales de otras especies de Lamiaceas (orégano y tomillo), demostraron ser muy efectivos frente a los hongos *A. alternata*, *C. hawaiiensis*, *F. oxysporum lycopersici* y *R. solani* ensayados en este trabajo (Santamarina et al., 2015, 2017)

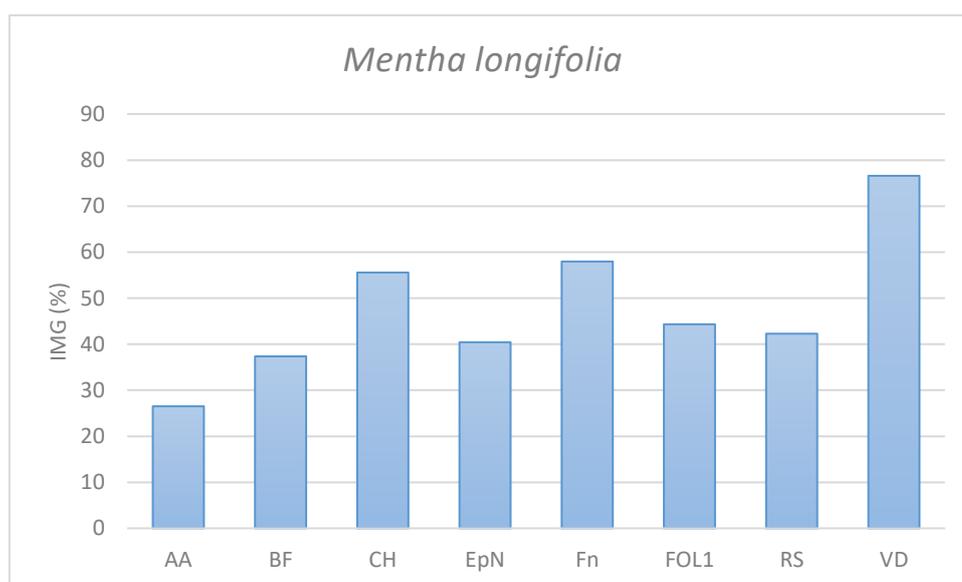


Ilustración 12 Representación gráfica del MGI (%) de *Mentha longifolia*

4.3.2 *Artemisia herba-alba*

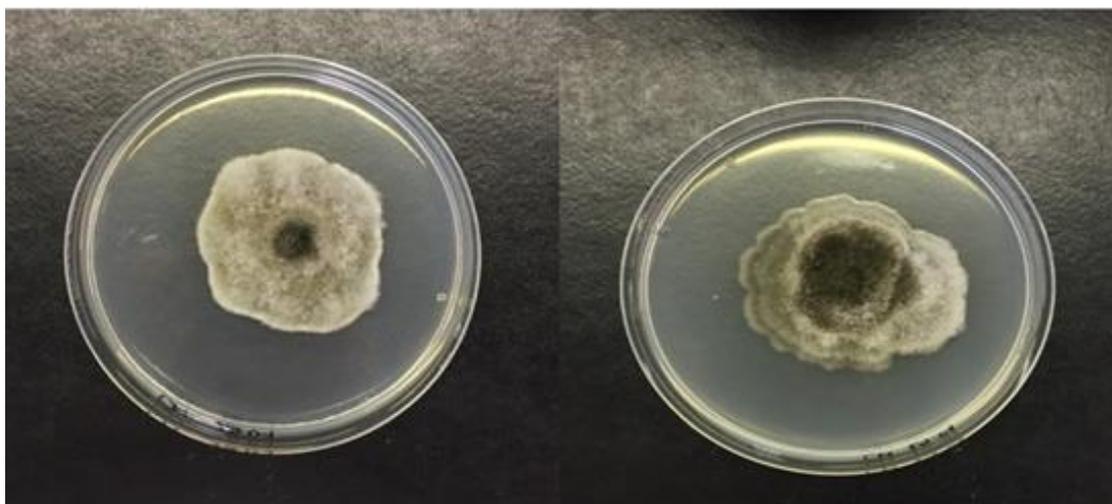


Ilustración 13 Crecimiento de CH en PDA control (izquierda) y en PDA con el aceite esencial de *A. herba-alba* (derecha), a los 7 días de incubación

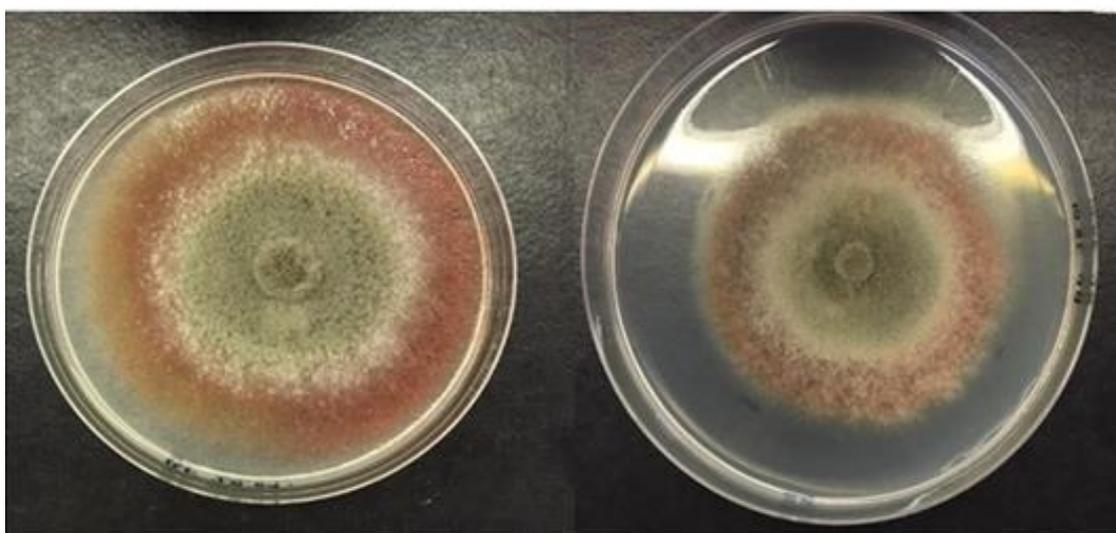


Ilustración 14 Crecimiento de BF en PDA control (izquierda) y en PDA con el aceite esencial de *A. herba-alba* (derecha), a los 7 días de incubación

En las imágenes anteriores (ilustraciones 13 y 14) se muestra, como ejemplo, el crecimiento de los hongos *B. fuckeliana* y *C. hawaiiensis* en los medios Control y PDA-aceite esencial de *Artemisia herba-alba* con un MGI del 23.33% y 33.51%, respectivamente.

4.3.3 *Artemisia absinthium*

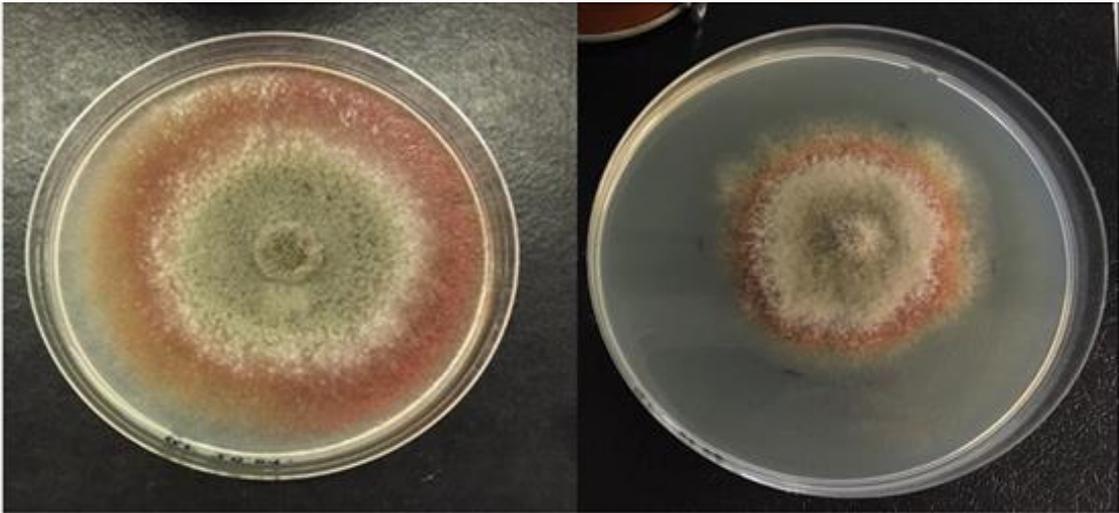


Ilustración 15 Crecimiento de BF en PDA control (izquierda) y en PDA con el aceite esencial de *A. absinthium* (derecha), a los 7 días de incubación

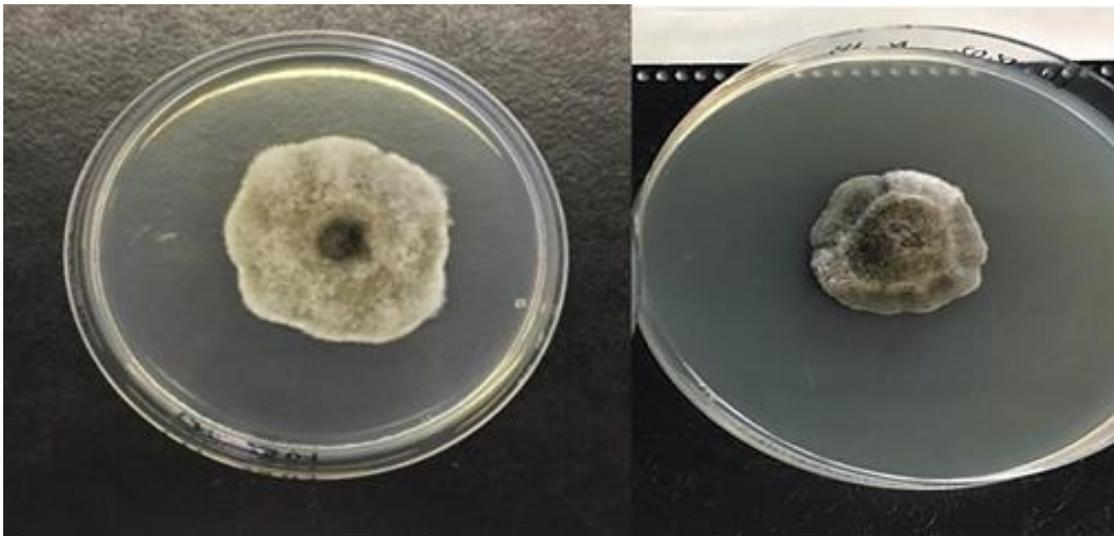


Ilustración 16 Crecimiento de CH en PDA control (izquierda) y en PDA con el aceite esencial de *A. absinthium* (derecha), a los 7 días de incubación

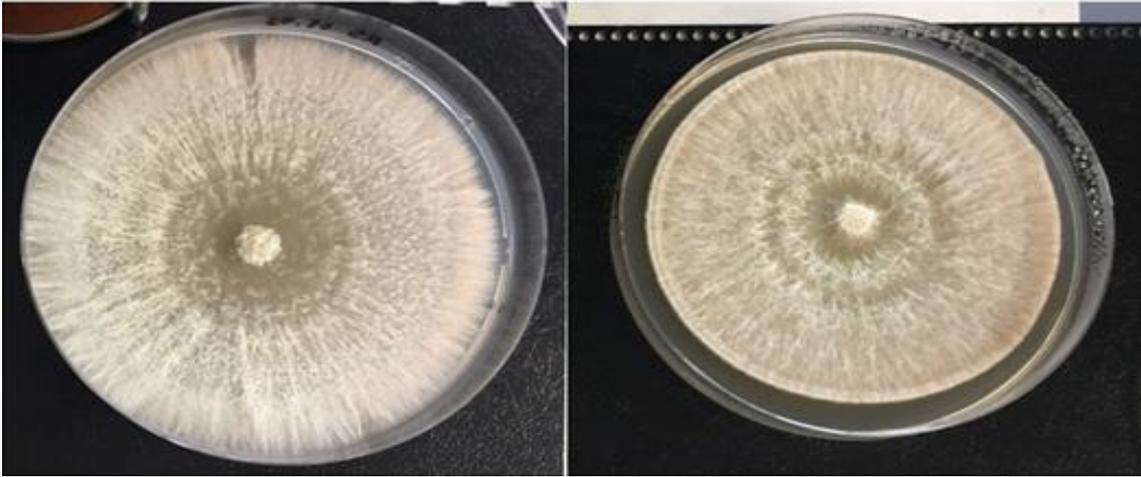


Ilustración 17 Crecimiento de RS en PDA control (izquierda) y en PDA con el aceite esencial de *A. absinthium* (derecha), a los 7 días de incubación

En las imágenes anteriores (ilustraciones 15, 16 y 17) se muestra, como ejemplo, el crecimiento de los hongos *B. fuckeliana*, *C. hawaiiensis* y *R. solani* en los medios Control y PDA-aceite esencial de *Artemisia absinthium* con un MGI del 55.41%, 47.73% y 47.90%, respectivamente.

4.3.4 *Mentha longifolia*

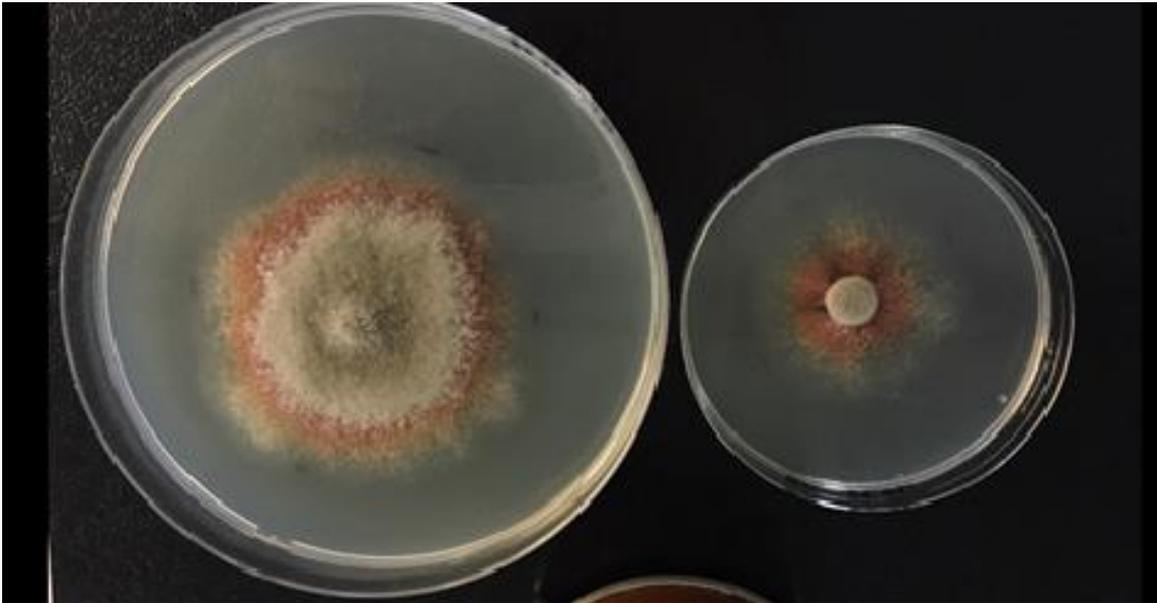


Ilustración 18 Crecimiento de BF en PDA control (izquierda) y en PDA con el aceite esencial de *M.longifolia* (derecha), a los 7 días de incubación



Ilustración 19 Crecimiento de CH en PDA control (izquierda) y en PDA con el aceite esencial de *M.longifolia* (derecha), a los 7 días de incubación

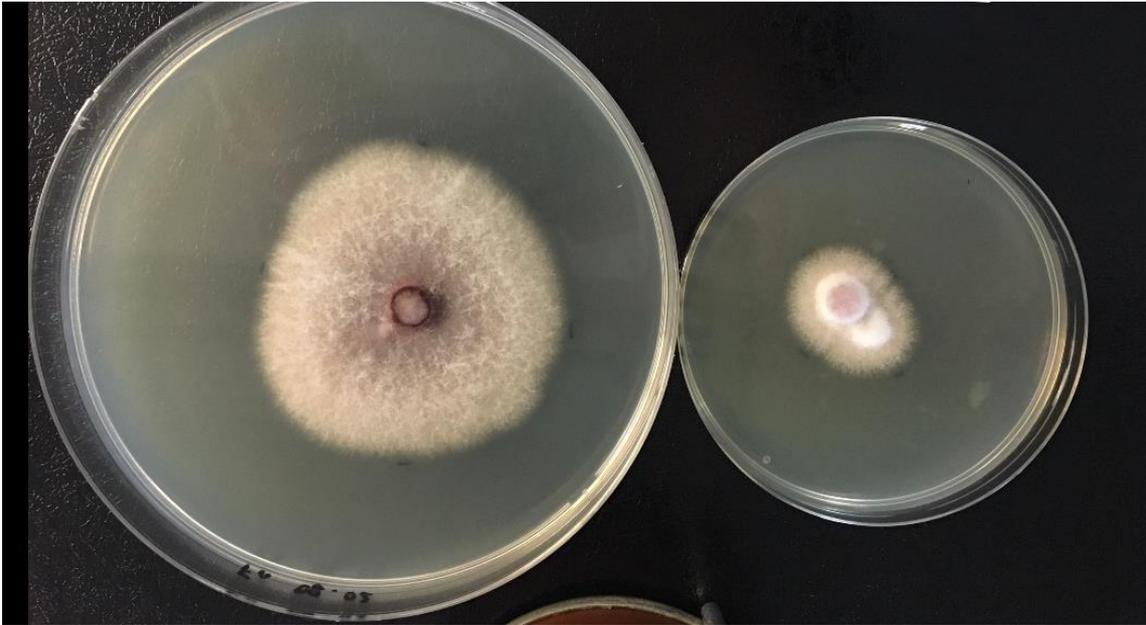


Ilustración 20 Crecimiento de Fn en PDA control (izquierda) y en PDA con el aceite esencial de M.longifolia (derecha), a los 7 días de incubación

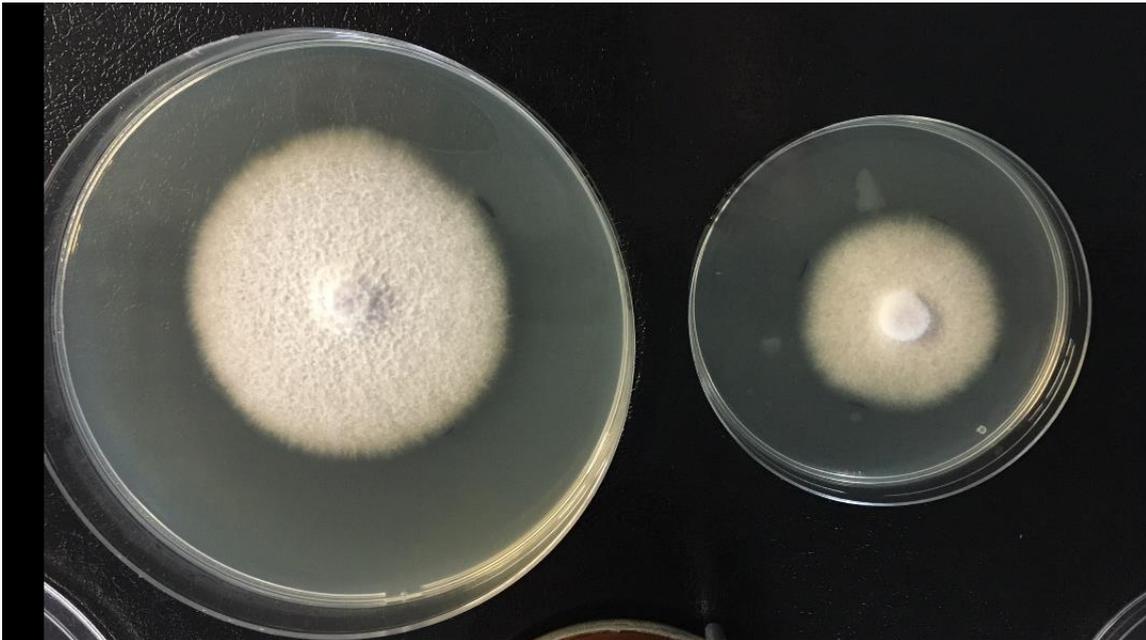


Ilustración 21 Crecimiento de FOL en PDA control (izquierda) y en PDA con el aceite esencial de M.longifolia (derecha), a los 7 días de incubación

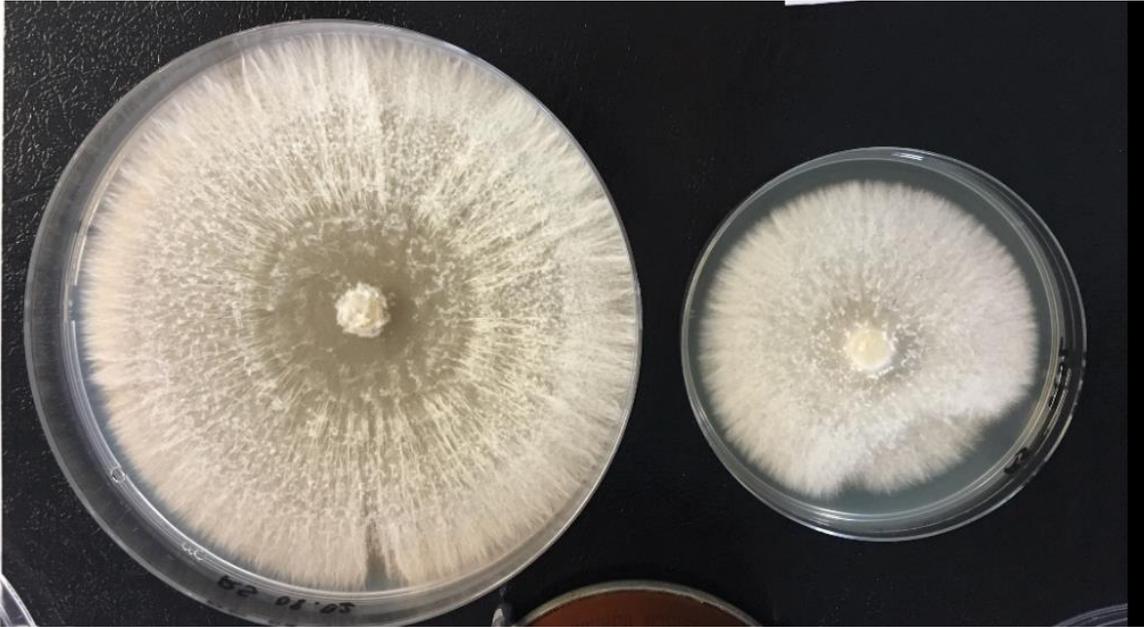


Ilustración 22 Crecimiento de RS en PDA control (izquierda) y en PDA con el aceite esencial de M.longifolia (derecha), a los 7 días de incubación



Ilustración 23 Crecimiento de VD en PDA control (izquierda) y en PDA con el aceite esencial de M.longifolia (derecha), a los 7 días de incubación

En el caso de *Mentha longifolia*, sí hay una reducción significativa del tamaño del hongo crecido en PDA con aceite esencial respecto al mismo hongo crecido en PDA control. Para este caso, los resultados fueron mucho más positivos que para el aceite esencial de *Artemisia herba-alba* y *Artemisia absinthium* ya que no solo presenta mayor índice de MGI sobre los hongos ensayados para las mismas, sino que también presenta un mayor índice de MGI sobre mayor diversidad de hongos. El aceite esencial de *Mentha longifolia*, resultó altamente efectivo frente a *Verticillium dahliae*, ya que es el hongo cuyo valor MGI es el más alto respecto al resto (76.58%). Por el contrario, *Alternaria alternata* presentó el valor de MGI más bajo (26.51%). Los valores de MGI para el resto de hongos fueron 37.36% para *Botryotinia fuckeliana*, 55.57% para *Curvularia hawaiiensis*, 40.43% para *Epicoccum nigrum*, 57.96% para *Fusarium nygamai*, 44.33% para *Fusarium oxysporum lycopersici* y 42.28% para *Rhizoctonia solani*.

5. CONCLUSIONES

- 1) En cuanto a la composición química del aceite esencial de *Artemisia herba-alba*, pese a la elevada variabilidad observada entre individuos, todos ellos responden a un perfil común, por lo que en principio cabe descartar la coexistencia de distintos quimiotipos en la población estudiada. Los compuestos mayoritarios son alcanfor, α y β tujona, 1,8-cineol y proporciones relativamente importantes de camfeno y borneol. Este quimiotipo es análogo al identificado en otros países del área mediterránea, por lo que puede considerarse plenamente representativo de esta especie.
- 2) En cuanto a la actividad antifúngica, el aceite esencial de *M. longifolia* reveló resultados muy satisfactorios, mostrando valores de inhibición del crecimiento micelial (MGI) entre el 40 y 75% en todos los hongos ensayados a excepción de *Alternaria alternata*.
- 3) La mayor actividad antifúngica de *M. longifolia*, se debe a su elevado contenido en cetonas monoaterpénicas, concretamente, la carvona y sus derivados, pulegona, mentona e isomentona.
- 4) El aceite de *A. absinthium* mostró efectividad frente a *B. fuckeliana*, *C. hawaiiensis* y *R. solani* con valores MGI alrededor del 50%, siendo este un valor alto. El aceite esencial de *A. herba-alba* presentó resultados de inhibición del crecimiento micelial del 30% sobre *C. hawaiiensis*, siendo más bajos en los restantes hongos ensayados.
- 5) De las especies del género *Artemisia*, *A. absinthium* ha resultado tener algo más de actividad antifúngica que *A. herba-alba*. Esto puede atribuirse a la presencia de algunos componentes químicos en *A. absinthium*, tales como (Z)- β -epoxiocimeno y (Z)-acetato de crisantemilo. Estos compuestos se encuentran en grandes cantidades en *A. absinthium* del quimiotipo típico de la Península Ibérica, que es el empleado en los ensayos antifúngicos realizados. Sin embargo, dichos compuestos no están presentes en la composición de *A. herba-alba*.

6. BIBLIOGRAFÍA

- AGRIOS, G.N. (2004). *Plant pathology*. Elsevier Academic Press.
- APG IV. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* 181: 1–20
- ARIÑO OCHOA, A., (1999). Variabilidad química en los aceites esenciales de *Artemisia absinthium* de la Península Ibérica. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco, 215 pp.
- 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(3), 995-998.
- BAILEN, M., JULIO, L. F., Diaz, C. E., Sanz, J., Martínez-Díaz, R. A., Cabrera, R. & GONZALEZ-COLOMA, A. (2013). Chemical composition and biological effects of essential oils from *Artemisia absinthium* L. cultivated under different environmental conditions. *Industrial Crops and Products*, 49, 102-107.
- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., & IDAOMAR, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- BARROW, G. (1972). Química Física, vols. 1 e 2. Ed. Reverté S.A., Barcelona, 491 pp.
- BAYKAN EREL, Ş., REZNICEK, G., ŞENOL, S.G., KARABAY YAVAŞOĞULU, N.Ü., KONYALIOĞLU, S. y ZEYBEK, A.U. (2012). Antimicrobial and antioxidant properties of *Artemisia* L. species from western Anatolia. *Turkish Journal of Biology*, 36: 75-84.
- BELLILI, S., DHIFI, W., AL-GARNI, A. B. K., FLAMINI, G., & MNIF, W. (2016). Essential oil composition and variability of *Artemisia herba-alba* Asso. growing in Tunisia: comparison and chemometric investigation of different plant organs. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol, 6(07), 038-042.
- BLAGOJEVIĆ, P., RADULOVIĆ, N., PALIĆ, R. y STOJANOVIĆ, G. (2006). Chemical composition of the essential oils of serbian wild-growing *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 4780-4789.
- CORELL VIDAL, M.J. (2016). Determinación de la actividad antioxidante de diferentes quimiotipos de aceite esencial de *Artemisia absinthium* L. trabajo fin de grado. Univ. Politècnica de València, 42 pp.
- DABRIO, M.V., ALBAIGUÉS, J., CLEMENTE, A.E., GASCÓ, L., GARCÍA, J.A., GELPÍ, E. y MARTÍNEZ R. (1973). *Cromatografía de gases* (vol. II) Ed. ALHAMBRA. 223 pp.
- DJERIDANE, A., YOUSFI, M., NADJEMI, B., BOUTASSOUNA, D., STOCKER, P., & VIDAL, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry*, 97(4), 654-660.
- GARCÍA-SEGURA, J.M., GAVILANES, J.G., MARTÍNEZ DEL POZO, A., MONTERO, F., OÑADERRA, M. Y VIVANCO F. (1996). *Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica*. Ed. SÍNTESIS, SA. Madrid. 398 pp.
- GOMIS, J. D., MARCO, J. A., LLINARES, J. R. P., PARAREDA, J. S., SENDRA, J. M., & SEOANE, E. (1979). Sesquiterpene lactones, waxes and volatile compounds from *Artemisia herba-alba* subspecies valentina. *Phytochemistry*, 18(9), 1523-1525.
- HUDAIB, M. M., & ABURJAI, T. A. (2006). Composition of the essential oil from *Artemisia herba-alba* grown in Jordan. *Journal of Essential Oil Research*, 18(3), 301-304.

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. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(11), 1827-1836.

KOKKINI, S., KAROUSOU, R., & LANARAS, T. (1995). Essential oils of spearmint (carvone-rich) plants from the island of Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology*, 23(4), 425-430.

KOLIOPOULOS, G., PITAROKILI, D., KIOULOS, E., MICHAELAKIS, A., & TZAKOU, O. (2010). Chemical composition and larvicidal evaluation of *Mentha*, *Salvia*, and *Melissa* essential oils against the West Nile virus mosquito *Culex pipiens*. *Parasitology research*, 107(2), 327-335.

KUMAR, P., MISHRA, S., MALIK, A., & SATYA, S. (2011). Insecticidal properties of *Mentha* species: a review. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 802-817.

LLORENS-MOLINA, J. A. L., RELLÁN, D. G., GONZÁLEZ, S. V., & SANFELIU, A. B. (2015). Individual sampling approach to study the chemodiversity of volatile and semivolatile compounds of *Mentha longifolia* L. growing wild in Jiloca basin (Spain). In *International Journal of Biosciences* (Vol. 7, No. 4, pp. 166-176). INNTPUB.

LLORENS-MOLINA, J. A. L., ZEISING, V. C., & RAMÍREZ, R. P. (2008). Composición del aceite esencial de *Artemisia absinthium* L. procedente del término municipal de Calamocha (Teruel). Caracterización de su quimiotipo y estudio de las variaciones estacionales. *Xiloca: revista del Centro de Estudios del Jiloca*, (36), 61-84.

LLORENS-MOLINA, J. A., & VACAS, S. (2015). Seasonal variations in essential oil of aerial parts and roots of an *Artemisia absinthium* L. population from a Spanish area with supramediterranean climate (Teruel, Spain). *Journal of Essential Oil Research*, 27(5), 395-405.

LLORENS-MOLINA, J. A., GONZALEZ, S. V., SANCHO, M. V., & RELLÁN, D. G. (2014). Individual Monitoring to Study Organ and Diurnal Variations in *Mentha longifolia* L. *Natural Volatiles & Essential Oils*, 1(1), 73-79.

LLORENS-MOLINA, J. A., GONZALEZ, S. V., SANCHO, M. V., & RELLÁN, D. G. (2014). Individual Monitoring to Study Organ and Diurnal Variations in *Mentha longifolia* L. *Natural Volatiles & Essential Oils*, 1(1), 73-79.

FEUERSTEIN, I., DANIN, A., & SEGAL, R. (1988). Constitution of the essential oil from an *Artemisia herba-alba* population of Spain. *Phytochemistry*, 27(2), 433-434.

LLORENS-MOLINA, J. A., GONZALEZ, S. V., SANCHO, M. V., & RELLÁN, D. G. (2014). Individual Monitoring to Study Organ and Diurnal Variations in *Mentha longifolia* L. *Natural Volatiles & Essential Oils*, 1(1), 73-79.

CHARCHARI, S., DAHOUN, A., BACHI, F., & BENSLIMANI, A. (1996). Antimicrobial activity in vitro of essential oils of *Artemisia herba-alba* Asso and *Artemisia judaica* L. from Algeria. *Riv Ital EPPOS*, 18(3).

LLORENS-MOLINA, J. A., GONZALEZ, S. V., SANCHO, M. V., & RELLÁN, D. G. (2014). Individual Monitoring to Study Organ and Diurnal Variations in *Mentha longifolia* L. *Natural Volatiles & Essential Oils*, 1(1), 73-79.

SAEIDI, S., HASSANPOUR, K., GHAMGOSHA, M., HEIAT, M., TAHERI, R. A., MIRHOSSEINI, A., & FARNOOSH, G. (2014). Antibacterial activity of ethyl acetate and aqueous

extracts of *Mentha longifolia* L. and hydroalcoholic extract of *Zataria multiflora* Boiss. plants against important human pathogens. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 7, S186-S189.

LLORENS-MOLINA, J. A., GONZALEZ, S. V., SANCHO, M. V., & RELLÁN, D. G. (2014). Individual Monitoring to Study Organ and Diurnal Variations in *Mentha longifolia* L. *Natural Volatiles & Essential Oils*, 1(1), 73-79.

DOB, T., & BENABDELKADER, T. (2006). Chemical composition of the essential oil of *Artemisia herba-alba* Asso grown in Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 18(6), 685-690.

LLORENS-MOLINA, J. A., GONZALEZ, S. V., SANCHO, M. V., & RELLÁN, D. G. (2014). Individual Monitoring to Study Organ and Diurnal Variations in *Mentha longifolia* L. *Natural Volatiles & Essential Oils*, 1(1), 73-79.

JUDZENTIENE, A., BUDIENE, J., GIRCYTE, R., MASOTTI, V. y LAFFONT-SCHWOB, I. (2012). Toxic activity and chemical composition of Lithuanian wormwood (*Artemisia absinthium* L.) essential oils. *Records of Natural Products*, 6 (2): 180-183.

LLORENS-MOLINA, J. A., GONZALEZ, S. V., SANCHO, M. V., & RELLÁN, D. G. (2014). Individual Monitoring to Study Organ and Diurnal Variations in *Mentha longifolia* L. *Natural Volatiles & Essential Oils*, 1(1), 73-79. 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.

LLORENS-MOLINA, J. A., VACAS, S., CASTELL, V., & NÉMETH-ZÁMBORINÉ, É. (2016). Variability of essential oil composition of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) affected by plant organ. *Journal of Essential Oil Research*, 29(1), 11-21.

LLORENS-MOLINA, J. A., VACAS, S., CASTELL, V., & NÉMETH-ZÁMBORINÉ, É. (2016). Variability of essential oil composition of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) affected by plant organ. *Journal of Essential Oil Research*, 29(1), 11-21.

LÓPEZ CASTAÑO, S., 2012. Estudio de la Variabilidad Química de dos Poblaciones de *Mentha longifolia* L. Procedentes de Calamocha (Teruel). Trabajo Fin de Carrera. Univ. Politècnica de València, 157 pp.

LÓPEZ-LUTZ, D., ALVIANO, D.S. y KOLODZIEJCZYK, P.P. (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*, 69: 1732-1738.

MAFFEI, M. (1988). A chemotype of *Mentha longifolia* (L.) Hudson particularly rich in piperitenone oxide. *Flavour and fragrance journal*, 3(1), 23-26.

MONFARED, A., NABID, M. R., & RUSTAIYAN, A. (2002). Composition of a carvone chemotype of *Mentha longifolia* (L.) Huds. from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, 14(1), 51-52.

PAL SINGH, H., BATISH, D. R., MITTAL, S., DOGRA, K. S., YADAV, S., & KOHLI, R. K. (2008). Constituents of leaf essential oil of *Mentha longifolia* from India. *Chemistry of natural compounds*, 44(4), 528-529. *Phylogeny: Cytogenetic and Molecular Insights*. USDA Forest Service Proceedings, 67-74.

PINAZO, B. S. (2015). Los aceites esenciales de Laurel (*Laurus nobilis*) y Clavo (*Syzygium aromaticum*) una alternativa frente a *Fusarium sambucinum* aislado del arroz (Doctoral dissertation).

REZAEINODEHI, A. y KHANGOLI, S. (2008). Chemical composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* growing wild in Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11 (6): 946-949.

SANTAMARINA, M.P.; GARCÍA, F.J.; ROSELLÓ, J. (1997). *Biología y Botánica* (tomo II). Servicio de publicaciones UPV. Valencia.

SANTAMARINA M.P., ROSELLÓ J., SEMPERE F., GIMÉNEZ S. Y BLÁZQUEZ MA (2015): Commercial *Origanum compactum* Benth. and *Cinnamomum zeylanicum* Blume essential oils against natural mycoflora in Valencia rice, *Natural Product Research*, DOI: 10.1080/14786419.2014.1002406.

SANTAMARINA M.P., IBÁÑEZ M.D., MARQUÉS M., ROSELLÓ J., GIMÉNEZ S. Y BLÁZQUEZ M.A. (2017): Bioactivity of essential oils in phytopathogenic and post-harvest fungi control, *Natural Product Research*, DOI: 10.1080/14786419.2017.1286479.

SANZ, J. F., CASTELLANO, G., & MARCO, J. A. (1990). Sesquiterpene lactones from *Artemisia herba-alba*. *Phytochemistry*, 29(2), 541-545.

SBAYOU, H., ABABOU, B., BOUKACHABINE, K., MANRESA, A., ZEROUALI, K., Y AMGHAR, S. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Artemisia herba-alba* and *Mentha pulegium* essential oils. *Journal of Life Sciences*, 8(1).

SHAROPOV, F.S., SULAIMONOVA, V.A. y SETZER, W.N. (2012) Composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* from Tajikistan. *Records of natural products*, 6 (2): 127-134.

STÜBING, G., & GISBERT, J. B. P. (1998). *Plantas medicinales de la Comunidad Valenciana*.

VALLÈS, J., & MCARTHUR, E. D. (2001). *Artemisia* systematics and phylogeny: cytogenetic and molecular insights.

VALLÈS, J., GARCÍA, S., HIDALGO, O., MARTÍN, J., PELLICER, J., SANZ, M. y GARNATGE, T. (2011). Biology, Genome Evolution, Biotechnological Issues and Research Including Applied Perspectives in *Artemisia* (Asteraceae), en: *Advances in Botanical Research*, (vol. 60). Ed. *Academic Press*, 349-419.

VENSKUTONIS, P. R. (1996). A chemotype of *Mentha longifolia* L. from Lithuania rich in piperitenone oxide. *Journal of Essential Oil Research*, 8(1), 91-95.

YOUNIS, Y. M., & BESHIR, S. M. (2004). Carvone-rich essential oils from *Mentha longifolia* (L.) Huds. ssp. *schimperii* Briq. and *Mentha spicata* L. grown in Sudan. *Journal of Essential oil research*, 16(6), 539-541.

ZANOUSI, M.B.P., AZAR, P.A. y RAEESI, M. (2012). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of different organs of three *Artemisia* species from Iran. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6 (42): 589-5494.