



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Composición química y actividad antifúngica del aceite
esencial obtenido a partir de *Mentha suaveolens* Ehrh.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: Roger Marín, Beatriz

Tutor/a: Llorens Molina, Juan Antonio

Cotutor/a: Santamarina Siurana, M^a Pilar

Director/a Experimental: ROSELLO CASELLES, JOSEFA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

Composición química y actividad antifúngica del aceite esencial obtenido a partir de *Mentha suaveolens* Ehrh.

RESUMEN:

Dentro de las investigaciones actuales en el ámbito agroalimentario destacan las relacionadas con la sustitución de productos procedentes de la síntesis química por los naturales, menos dañinos para la salud humana y el medio ambiente. El entorno mediterráneo permite el crecimiento de plantas silvestres como la *Mentha suaveolens*, también llamada el mastranzo; una planta aromática herbácea de la cual se obtiene un aceite esencial con propiedades medicinales además de destacar por su actividad biológica; la capacidad antimicrobiana que presenta es de gran interés ecológico.

En el trabajo se estudia la composición química del aceite esencial de *Mentha suaveolens* obtenido de Tavernes de la Valligna, un municipio de la Comunidad Valenciana ubicado en el sureste de la provincia de Valencia, en la comarca de la Safor. También se analiza la actividad antifúngica que presenta frente a los hongos fitopatógenos y de post-cosecha dañosos: *Botryotinia fuckeliana*, *Curvularia hawaiiensis*, *Fusarium oxysporum lycopersici* y *Verticillium dahliae*.

La composición química se obtiene, en primer lugar, mediante la extracción del aceite por hidrodestilación utilizando el equipo Clevenger y posteriormente, por cromatografía de gases con detección se identifican los componentes mediante espectroscopía de masas y se cuantifican con detector de ionización de llama (FID). Los resultados obtenidos muestran que los componentes mayoritarios son los óxidos de piperitona y piperitenona, cetonas monoterpénicas de interés biológico ya que aportan al aceite esencial gran parte de la actividad antifúngica.

Esta actividad antifúngica, “*in vitro*”, se evalúa siguiendo la metodología de Singh et al., (2008) modificada. Los resultados obtenidos muestran que la dosis más alta de aceite esencial, la de 400 µg/mL, inhibe el 100 % del crecimiento micelial en los hongos *Botryotinia fuckeliana*, *Curvularia hawaiiensis* y *Verticillium dahliae* y el 85,01 % en *Fusarium oxysporum lycopersici*.

El aceite esencial de *Mentha suaveolens* es considerado una alternativa natural y respetuosa con el medio ambiente para aumentar la vida útil de los productos agroalimentarios.

PALABRAS CLAVE: Aceite esencial, *Mentha suaveolens*, actividad antifúngica, composición química.

ALUMNA: Dña. Beatriz Roger Marín

TUTOR: D. Juan Antonio Llorens Molina

COTUTORA: Dña. M. Pilar Santamarina Siurana

DIRECTORA EXPERIMENTAL: Dña. Josefa Roselló Caselles

Valencia, julio de 2023

Chemical composition and antifungal activity of the essential oil obtained from *Mentha suaveolens* Ehrh.

ABSTRACT:

Within current research in the agri-food sector, studies related to the substitution of chemically synthesized products with natural ones stand out. These natural products are less harmful to human health and the environment. The Mediterranean environment allows for the growth of wild plants such as *Mentha suaveolens*, also known as mastranzo. This herbaceous aromatic plant yields an essential oil with medicinal properties, as well as remarkable biological activity. Its antimicrobial capacity is of great ecological interest.

The research focuses on the chemical composition of the essential oil obtained from *Mentha suaveolens* in Tavernes de la Valldigna, a municipality in the Valencian Community located in the southeast of the province of Valencia, in the region of La Safor. The antifungal activity of the oil against phytopathogenic and post-harvest harmful fungi, such as *Botryotinia fuckeliana*, *Curvularia hawaiiensis*, *Fusarium oxysporum lycopersici*, and *Verticillium dahliae*, is also analyzed.

The chemical composition is first obtained by extracting the oil through hydrodistillation using a Clevenger apparatus. Subsequently, gas chromatography with mass spectrometry detection is employed to identify the components, which are quantified using a flame ionization detector (FID). The results show that the major components are piperitone and piperitenone oxides, monoterpene ketones of biological interest, as they contribute significantly to the antifungal activity of the essential oil.

The antifungal activity is evaluated "*in vitro*" following a modified methodology based on Singh et al. (2008). The results demonstrate that the highest concentration of essential oil, 400 µg/mL, inhibits 100% of the mycelial growth in *Botryotinia fuckeliana*, *Curvularia hawaiiensis*, and *Verticillium dahliae*, and 85.01% in *Fusarium oxysporum lycopersici*.

The essential oil of *Mentha suaveolens* is considered a natural and environmentally friendly alternative to increase the shelf life of agri-food products.

KEYWORDS: Essential oil, *Mentha suaveolens*, antifungal activity, chemical composition.

Composició química i activitat antifúngica de l'oli essencial obtingut a partir de *Mentha suaveolens* Ehrh.

RESUM:

Dins de les investigacions actuals en l'àmbit agroalimentari destaquen les relacionades amb la substitució de productes procedents de la síntesi química pels naturals, menys perjudicials per a la salut humana i el medi ambient. L'entorn mediterrani permet el creixement de plantes silvestres com la *Mentha suaveolens*, també coneguda com a mastràs; una planta aromàtica herbàcia de la qual s'obté un oli essencial amb propietats medicinals, a més de destacar per la seua activitat biològica; la capacitat antimicrobiana que presenta és de gran interès ecològic.

En el treball s'estudia la composició química de l'oli essencial de *Mentha suaveolens* obtingut de Tavernes de la Valldigna, un municipi de la Comunitat Valenciana situat al sud-est de la província de València, a la comarca de la Safor. També s'analitza l'activitat antifúngica que presenta enfront dels fongs fitopatògens i de postcosecha perjudicials: *Botryotinia fuckeliana*, *Curvularia hawaiiensis*, *Fusarium oxysporum lycopersici* i *Verticillium dahliae*.

La composició química s'obté, en primer lloc, mitjançant l'extracció de l'oli per hidrodestil·lació utilitzant l'equip Clevenger i posteriorment, per cromatografia de gasos amb detecció s'identifiquen els components mitjançant espectroscòpia de masses i es quantifiquen amb detector d'ionització de flama (FID). Els resultats obtinguts mostren que els components majoritaris són els òxids de piperitona i piperitenona, cetones monoterpèniques d'interès biològic ja que aporten a l'oli essencial gran part de l'activitat antifúngica.

Aquesta activitat antifúngica, "*in vitro*", s'avalua seguint la metodologia de Singh et al., (2008) modificada. Els resultats obtinguts mostren que la dosi més alta d'oli essencial, la de 400 µg/mL, inhibeix el 100% del creixement miceliar en els fongs *Botryotinia fuckeliana*, *Curvularia hawaiiensis* i *Verticillium dahliae* i el 85,01% en *Fusarium oxysporum lycopersici*.

L'oli essencial de *Mentha suaveolens* és considerat una alternativa natural i respectuosa amb el medi ambient per augmentar la vida útil dels productes agroalimentaris.

PARAULES CLAU: Oli essencial, *Mentha suaveolens*, activitat antifúngica, composició química.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a Juan Antonio, a Pilar y a Pepa, por su ayuda y paciencia a lo largo de la realización del trabajo así como también por el entusiasmo y las ganas de enseñar que desprenden. Muchas gracias por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo con vosotros.

En segundo lugar, a mis amigos, que han sido mis mejores consejeros y han estado motivándome en todo momento, en especial a Marina, mi compañera de laboratorio y biblioteca.

A mi hermano, mi maestro informático y a mis padres, cuya ilusión siempre ha sido tener una hija científica. Ellos me han animado y han confiado siempre en mí.

No puedo estar más agradecida de tenerlos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Taxonomía y características morfológicas de la especie <i>Mentha suaveolens</i> Ehrh.....	1
1.2. Hábitat y área de distribución.....	3
1.3. Usos etnobotánicos.....	3
1.4. Composición química	4
1.4.1. Componentes mayoritarios y su actividad biológica.....	5
1.4.2. Factores que afectan a la composición química	7
1.5. Los hongos.....	8
1.5.1. Características generales.....	8
1.5.2. Género <i>Botryotinia</i>	9
1.5.3. Género <i>Curvularia</i>	11
1.5.4. Género <i>Fusarium</i>	12
1.5.5. Género <i>Verticillium</i>	14
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
3.1. Caracterización química del aceite esencial	18
3.1.1. Aceite esencial.....	18
3.1.2. Identificación de los compuestos del aceite esencial por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	18
3.1.3. Análisis cualitativo	20
3.1.4. Análisis cuantitativo.....	20

3.2. Determinación de la actividad antifúngica del aceite esencial.....	21
3.2.1. Hongos	21
3.2.2. Ensayos “ <i>in vitro</i> ” de la actividad antifúngica del aceite esencial	21
3.2.3. Evaluación y cálculo de la Inhibición del Crecimiento Miceliar (MGI)	22
3.3. Análisis estadístico	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1. Caracterización química del aceite esencial.....	23
4.1.1. Identificación de los compuestos químicos	23
4.1.2. Cuantificación de los compuestos químicos	24
4.2. Capacidad antifúngica del aceite esencial.....	25
4.2.1. Determinación de la actividad antifúngica sobre el crecimiento miceliar	25
4.2.2. Cálculo de la Inhibición del Crecimiento Miceliar (MGI).....	27
4.3. Análisis estadístico	29
5. CONCLUSIONES	30
6. BIBLIOGRAFÍA.....	31
7. ANEXO I: COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL EXTRAÍDO DE LA MENTHA SUAVEOLENS PROVENIENTE DE TAVERNES DE LA VALLDIGNA.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Detalle de las hojas de <i>Mentha suaveolens</i>	2
Figura 2. Detalle de las inflorescencias de <i>Mentha suaveolens</i>	2
Figura 3. Localizaciones de las poblaciones de <i>Mentha suaveolens</i> , de Tavernes de la Valldigna	3
Figura 4. Estructura química del compuesto Óxido de piperitona	6
Figura 5. Estructura química del compuesto Óxido de piperitenona	6
Figura 6. Estructura química del compuesto Piperitenona.....	6
Figura 7. Estructura química del compuesto Pulegona	7
Figura 8. Conidióforos y conidios de <i>Botryotinia fuckeliana</i>	10
Figura 9. <i>Botryotinia fuckeliana</i> en uva	10
Figura 10. Estructuras morfológicas de <i>Botryotinia</i>	10
Figura 11. Conidióforos y conidios de <i>Curvularia hawaiiensis</i>	11
Figura 12. <i>Curvularia hawaiiensis</i> en arroz	11
Figura 13. Conidióforos y conidios en <i>Curvularia</i>	12
Figura 14. Macroconidios de <i>Fusarium oxysporum f. lycopersici</i>	13
Figura 15. <i>Fusarium oxysporum f. lycopersici</i> en raíces.....	13
Figura 16. Estructuras morfológicas de <i>Fusarium</i>	14
Figura 17. Conidios de <i>Verticillium dahliae</i>	15
Figura 18. <i>Verticillium dahliae</i> en hoja	15
Figura 19. Estructuras morfológicas de <i>Verticillium</i>	16
Figura 20. Representación esquemática del cromatógrafo de gases	19

Figura 21. Cromatograma de gases del aceite esencial extraído de la <i>Mentha suaveolens</i> proveniente de Tavernes de la Valldigna.....	23
Figura 22. Crecimiento miceliar de <i>B. fuckeliana</i> , <i>C. hawaiiensis</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>V. dahliae</i> en los medios de PDA (control) y con las dosis de 200 y 400 µg/mL del aceite esencial de <i>Mentha suaveolens</i>	26
Figura 23. Gráfico del porcentaje de Inhibición del Crecimiento Miceliar (MGI) del aceite esencial de <i>Mentha suaveolens</i> a las concentraciones de 200 y 400 µg/mL para los hongos <i>Botryotinia fuckeliana</i> , <i>Curvularia hawaiiensis</i> , <i>Fusarium oxysporum lycopersici</i> y <i>Verticillium dahliae</i>	28
Figura 24. Gráfica de interacción, crecimiento medio, especies y concentración; control (C), de 200 y 400 µg/mL de aceite esencial de <i>Mentha suaveolens</i> contra las especies de hongos <i>Botryotinia fuckeliana</i> (BF), <i>Curvularia hawaiiensis</i> (CH), <i>Fusarium oxysporum lycopersici</i> (FOL) y <i>Verticillium dahliae</i> (VD).....	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química mayoritaria de <i>Mentha suaveolens</i> de distintos trabajos de investigación.....	4
Tabla 2. Cálculo de los valores de crecimiento medio (mm) y la desviación estándar para los hongos crecidos en medios con el aceite esencial <i>Mentha suaveolens</i> a concentraciones DE PDA (control), 200 µg/mL y de 400 µg/mL a los 7 días de incubación	25
Tabla 3. Inhibición del Crecimiento Miceliar en % (MGI), de los hongos crecidos en los distintos medios de cultivo a las concentraciones estudiadas tras 7 días de incubación	27

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La creciente resistencia de los patógenos a los medicamentos es una seria amenaza para el éxito en el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos. A lo largo de los siglos, se ha despertado un gran interés en los aceites esenciales como fuentes de productos naturales. Al cabo de numerosos estudios, se ha comprobado la potente actividad biológica que presentan los aceites esenciales como remedios alternativos en el tratamiento de algunas enfermedades infecciosas (Tepe et al., 2004).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha señalado que gran parte de la población mundial depende de la medicina tradicional para la atención primaria de la salud. (Prabuseenivasan et al., 2006). Las plantas medicinales y aromáticas representan una valiosa fuente de compuestos naturales con propiedades terapéuticas.

Se ha comprobado que los componentes de los aceites esenciales hacen que los aceites esenciales adquieran actividades biológicas de gran interés como la capacidad antibacteriana y antifúngica. Por ello, estos aceites están siendo cada vez más populares como agentes microbianos naturales, usados en ámbitos como la botánica farmacéutica, fitopatología, farmacología, microbiología clínica y médica y en la conservación de alimentos.

De esta manera, se propone una alternativa natural para reemplazar a los pesticidas orgánicos sintéticos, los cuales son responsables directos de las alteraciones en los ecosistemas y de la aparición de patógenos resistentes a los fungicidas, evitando perjudicar el medio ambiente.

En el presente trabajo se investiga la efectividad antifúngica del aceite esencial extraído de *Mentha suaveolens* contra hongos fitopatógenos que causan daños en productos agrícolas después de la cosecha, llevando a cabo un análisis detallado de la composición química para establecer relaciones entre los componentes químicos del aceite esencial y su actividad antifúngica.

1.1. Taxonomía y características morfológicas de la especie *Mentha suaveolens* Ehrh.

La *Mentha suaveolens* Ehrh., o más comúnmente llamada Mastranzo (Flora ibérica, 2010) o menta de manzana (Encyclopedia of Life, 2021) en el presente trabajo se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera: Reino Plantae; División Magnoliophyta; Clase Magnoliopsida; Orden Lamiales; Familia Lamiaceae, Subfamilia Nepetoideae; Tribu Mentheae; Género *Mentha*; Especie *Mentha suaveolens*.

La *Mentha suaveolens* es una hierba aromática de hoja perenne y leñosa en la parte inferior que presenta un tallo erecto de 38 a 87 centímetros de alto y menor a 4 milímetros de diámetro (Flora ibérica, 2010).

Sus hojas pasan de ser elípticas a ovadas, u orbiculares agudas o no, sentadas, a veces auriculares, dentadas o aserradas con dientes pegados, o festoneadas, con nervios marcados de superficie gruesa y haz de color verde intenso cubierto de pelos algodonosos, enmarañados, simples y ramificados. Miden de 9 a 37 centímetros de ancho y de 18 a 52 de alto. Se extiende por rizomas subterráneos (Flora ibérica, 2010) (Figura 1).

Las flores (Figura 2) están dispuestas en una inflorescencia de 2,7 a 10 centímetros de alto y de 0,6 a 1,2 de ancho formadas por espigas densas terminales con verticilastros inferiores separados, a veces ramificadas y compuestas y con otros verticilastros inferiores y separados, dejando ver el tallo florífero. Brácteas similares a las hojas. Bracteolas de estrechamente ovadas a lanceoladas de 3 a 5 milímetros, incurvadas. Cáliz actinomorfo de 1 a 2,5 milímetros, verde aunque a veces coloreado en la parte superior, y formado por un tubo con pelos dispersos y glándulas esferoidales que se abre al exterior por 5 dientes subiguales de hasta 1 milímetros y ciliados. Corola de 3 a 4 milímetros, blanquecina o en ocasiones un poco rosada, formada por un tubo que en el extremo se abre en 2 pequeños labios poco marcados, con el superior no lobulado y el inferior con 3 pequeños lóbulos iguales de hasta 1,5 milímetros. El androceo está constituido por 4 estambres exertos, con anteras elipsoidales de color púrpura. El gineceo consta de un ovario súpero dividido en 4, del que surge un estilo con un estigma bifido (Flora ibérica, 2010) (Figura 2).

La temporada de floración transcurre de junio hasta septiembre (El-Kashoury et al., 2014) formando espigas densas a veces ramificadas con la corola de color crema o blanquecina y en ocasiones de color púrpura claro (Flora ibérica, 2010).



Figura 1. Detalle de las hojas de *Mentha suaveolens* (Flora ibérica, 2014)



Figura 2. Detalle de las inflorescencias de *Mentha suaveolens* (Flora ibérica, 2014)

1.2. Hábitat y área de distribución

Esta especie herbácea habita en zarzales o juncales, lugares húmedos en cualquier tipo de substrato y a veces nitrificados. Abunda en la región mediterránea ya que se encuentran en casi toda la Península ibérica y es más rara en Centroeuropa (Flora ibérica, 2010).

La *Mentha suaveolens* con la que se ha trabajado proviene de Tavernes de la Valldigna, municipio de la Comunidad Valenciana, ubicado en el sureste de la provincia de Valencia, en la comarca de la Safor (Figura 3).

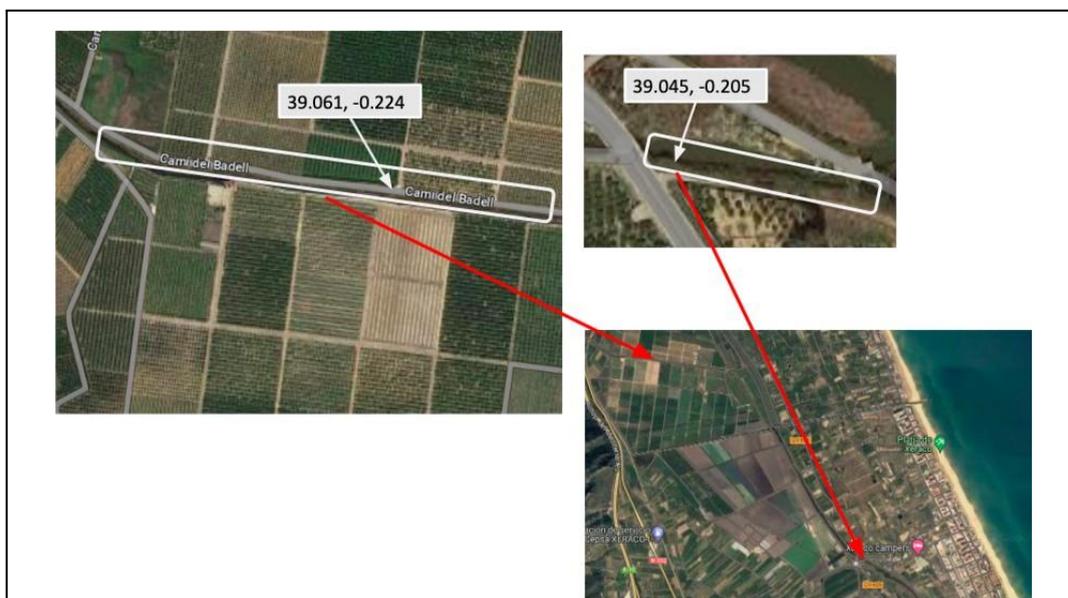


Figura 3. Localizaciones de las poblaciones de Mentha suaveolens, de Tavernes de la Valldigna

1.3. Usos etnobotánicos

Las plantas pertenecientes al género *Mentha* son reconocidas por ser productoras de algunos de los aceites esenciales más usados.

La *Mentha suaveolens* ha sido utilizada en la medicina tradicional de las regiones mediterráneas ya que posee una amplia gama de efectos beneficios para la salud. Destaca por las propiedades hipotensoras, estimulantes, estomacales, carminativas, coleréticas, antiespasmódicas, sedantes, tónicas, anticonvulsivas e insecticidas. Además, se ha demostrado su utilidad en casos de tos, náuseas, anorexia y bronquitis (El-Kashoury et al., 2013), así como también problemas digestivos, gripe, enfermedades respiratorias, reumatismo, afecciones de la piel e irritaciones (Karousou et al., 2007). Además, estudios han revelado actividades analgésicas, antiinflamatorias, citotóxicas, hepatoprotectoras y antifúngicas de la *Mentha suaveolens*. También presenta actividad antioxidante (Ferreira, 2006) y virucida (Civitelli et al., 2014).

1.4. Composición química

En la Tabla 1 se observa la diferencia de la composición química de la especie *Mentha suaveolens* estudiada en varios trabajos de investigación.

Tabla 1. Composición química mayoritaria de *Mentha suaveolens* de distintos trabajos de investigación

Referencias	Especie	Composición mayoritaria (%)	Silvestre/ Cultivada	Actividad biológica estudiada
Božović et al., 2015	<i>Mentha suaveolens</i>	<u>Población de Azrou:</u> Óxido de piperitona (74,69 %) , γ -Muuroloeno (5,53 %), Pulegona (2,34 %), Limoneno (1,85 %), 4a- α ,7- β ,7a- α -Nepetalactona (1,81 %), β -Cariofileno (1,68 %) y Piperitenona (1,17 %).	Silvestre	Capacidad insecticida
		<u>Población de M'ritt:</u> Óxido de piperitenona (81,67 %) y Piperitenona (10,14 %).		

Bouyahya et al., 2019	<i>Mentha suaveolens</i>	Óxido de piperitenona (56,28 %) , Piperitenona (11,64 %), Pulegona (6,16 %), Mirceno (3,26 %), Mentona (2,35 %), β -Pino (2,03 %), Limoneno (1,98 %), cis-Piperitona (1,82), óxido de cariofileno (1,64 %), α -Pino (1,47 %), α -Cariofileno (1,39 %), Sabioneno (1,05 %), D-Germacreno (1,03 %) y Safatulenol (1,02 %).	Silvestre	Capacidad antibacteriana y antioxidante
Benayad et al., 2012	<i>Mentha suaveolens</i> L.	Piperitenona (33,03 %) , Pulegona (17,61 %), Piperitona (9,18 %) y Mentona (3,34 %).	Silvestre	Capacidad insecticida
Petretto et al., 2014	<i>Mentha suaveolens</i> spp. <i>insularis</i>	Pulegona (46,2 %) , Piperitona (18,19 %), cis-cis-p-Mentenolida (12,23 %), Limoneno (3,10 %), Isopulegona (2,89 %), 1,8-Cineol (1,91 %), Germacreno (1,87 %), Z- β -Ocimeno (1,80 %) y Linalool (1,37 %).	Silvestre	Capacidad antimicrobiana

1.4.1. Componentes mayoritarios y su actividad biológica

Se puede observar que el óxido de piperitenona, la piperitenona y la pulegona son los compuestos químicos mayoritarios en los trabajos realizados sobre la especie *Mentha suaveolens*.

- **Óxido de piperitona:** Cetona monoterpénica oxidada (6-metil-3-propan-2-il-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-ona) y su fórmula molecular es $C_{10}H_{16}O_2$.

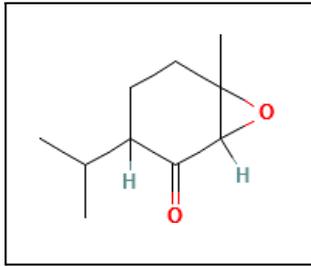


Figura 4. Estructura química del compuesto Óxido de Piperitona

- **Óxido de piperitenona:** Cetona monoterpénica oxidada ((1*S*,6*S*)-6-metil-3-propan-2-ilideno-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-ona) y su fórmula molecular es $C_{10}H_{14}O_2$.

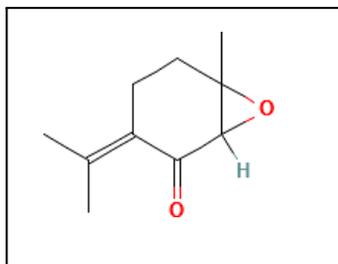


Figura 5. Estructura química del compuesto Óxido de piperitona

- **Piperitenona:** Cetona monoterpénica (3-metil-6-propan-2-ilidenociclohex-2-en-1-ona) y su fórmula molecular es $C_{10}H_{14}O$.

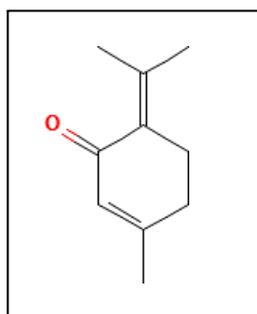


Figura 6. Estructura química del compuesto Piperitona

- **Pulegona:** Cetona monoterpénica ((5*R*)-5-metil-2-propan-2-ilideneciclohexan-1-ona) y su fórmula molecular es $C_{10}H_{16}O$.

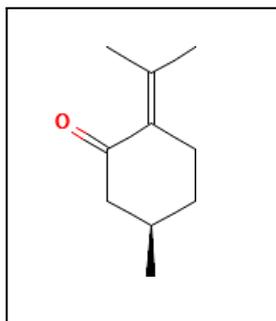


Figura 7. Estructura química del compuesto Pulegona

Los óxidos de piperitona y piperitenona son compuestos que presentan actividad antibacteriana, antifúngica, virucida y capacidad para inhibir el crecimiento en levaduras, aunque se ha comprobado que la actividad del óxido de piperitona es dos veces menor que la del óxido de piperitenona frente a levaduras (Božović et al., 2015). Por otra parte, la pulegona presenta actividad antibacteriana y antifúngica (Božović et al., 2015) sedante y reguladora de la temperatura corporal en presencia de fiebre (Formisano et al., 2007; Ortiz de Urbina, 1989), aunque se ha comprobado que la β -Pulegona, compuesto que se suele encontrar en el poleo europeo (*Mentha pulegium* L.) puede llegar a ser abortivo por sus efectos hepatotóxicos y neurotóxicos, por ello se recomienda evitarlos durante el embarazo y la lactancia (Božović et al., 2015).

La pulegona y los óxidos de piperitona y piperitenona tienen gran capacidad antimicrobiana, aunque la pulegona presenta una actividad biocida más potente. Entre los dos óxidos, el de piperitenona (Figura 5) presenta mayor actividad que el de piperitona (Figura 4) por la presencia del doble enlace; este influye en la capacidad antimicrobiana de los monoterpenos ya que favorece la configuración activa de la molécula. Por otra parte, entre el óxido de piperitenona y la pulegona (Figura 7), la presencia del epóxido entre el carbono 1 y el 2 del óxido (Figura 5) disminuye su actividad antimicrobiana (Oumzil et al., 2002).

1.4.2. Factores que afectan a la composición química

En los aceites esenciales existe una variabilidad fitoquímica debida a las características genéticas, estado fenológico y a los factores medioambientales como son las horas de luz, radiación, temperatura, altitud, tipo de suelo, zona geográfica, intensidad de lluvia o a la fertilización. Además, las condiciones de transformación y de manipulación posterior como el transporte, almacenamiento y la manipulación también condicionan la composición del aceite esencial (Barra, 2009; Figueiredo et al., 2008).

Debido a esta serie de factores y condiciones, cada especie presenta quimiotipos diferentes, dando lugar a aceites con composiciones distintas.

1.5. Los hongos

1.5.1. Características generales

Los hongos son seres vivos de tamaño pequeño, generalmente microscópicos, pertenecientes al grupo de los eucariotas. Suelen presentarse en forma de filamentos ramificados y producen esporas como parte de su reproducción. A diferencia de las plantas, los hongos no poseen clorofila, por lo tanto no realizan la fotosíntesis (Agrios, 2004).

La estructura celular de los hongos incluye paredes compuestas de quitina y glucanos, que actúan como elementos esqueléticos. Estos componentes están incrustados en una matriz formada por polisacáridos y glicoproteínas. Anteriormente, se consideraba que los Oomicetos, un grupo similar a los hongos, también pertenecían a esta categoría. Sin embargo, posteriormente se descubrió que sus paredes celulares estaban compuestas por glucanos y pequeñas cantidades de celulosa, pero carecían de quitina. En la actualidad, los Oomicetos se clasifican como miembros del reino Chromista, aunque aún se los considera como hongos debido a las numerosas similitudes que presentan, especialmente en la forma en que causan enfermedades en las plantas (Agrios, 2004).

La gran mayoría de las más de 100.000 especies de hongos identificadas son estrictamente saprófitas, ya que se alimentan de materia orgánica en descomposición. Su función vital en el ecosistema consiste en descomponer la materia muerta. Aproximadamente 50 especies de hongos son patógenas para los seres humanos, mientras que una cantidad similar causa enfermedades en animales. En su mayoría, estas enfermedades se limitan a afecciones cutáneas o a los apéndices de la piel (Agrios, 2004).

Sin embargo, las plantas son más susceptibles a las infecciones fúngicas, ya que más de 10.000 especies de hongos pueden causar enfermedades en ellas (Agrios, 2004). Estas enfermedades pueden manifestarse de diversas formas, desde manchas en las hojas hasta la pudrición de las raíces. Los hongos fitopatógenos pueden dañar los cultivos agrícolas, los árboles forestales y las plantas ornamentales, lo que afecta negativamente a la agricultura y la biodiversidad vegetal.

Existen diferentes tipos de hongos que atacan a las plantas. Algunos hongos, llamados parásitos obligados, sólo pueden crecer y multiplicarse si permanecen en asociación con las plantas hospedadoras durante toda su vida. Otros hongos, conocidos como parásitos no obligados, pueden completar su ciclo de vida tanto en plantas vivas como en materia orgánica muerta. Estas diferencias en los tipos de hongos y su relación con las plantas contribuyen a la complejidad de las interacciones entre ambos en los ecosistemas naturales (Agrios, 2004).

1.5.2. Género *Botryotinia*

El género *Botryotinia* se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera: Reino Fungi; Filo Ascomycota; Clase Leotiomycetes; Orden Helotiales; Familia Sclerotiniaceae; Género *Botryotinia* (Index Fungorum, 2020).

El pleomorfismo es común en patógenos vegetales ascomicetos importantes. Estos organismos presentan diferentes formas morfológicas y pasan por distintas etapas sexuales. En 1905 se propuso un sistema dual de nomenclatura para los hongos, que recomienda asignar nombres asexuales y sexuales. En este contexto, *Botrytis cinerea* es el nombre de la etapa asexual (anamorfo) y *Botryotinia fuckeliana* es el nombre de la etapa sexual (teleomorfo) (Faretra et al., 1988).

Las enfermedades ocasionadas por *Botryotinia* son extremadamente comunes y se encuentran ampliamente distribuidas en todo el mundo, afectando tanto a hortalizas como a plantas ornamentales, frutas e incluso cultivos de campo. Específicamente, son las enfermedades más frecuentes en los cultivos de invernadero. Los síntomas de las enfermedades de *Botryotinia* se manifiestan principalmente como marchitez en las flores y pudrición en las frutas (Figura 9), aunque también pueden provocar la destrucción de plántulas, la formación de chancros o pudriciones en los tallos, la aparición de manchas en las hojas y la pudrición de tubérculos, cormos, bulbos y raíces (Agrios, 2004).

Cuando las condiciones son frescas, alrededor de 18 - 23°C, y hay humedad, el hongo produce una característica capa fructífera de moho gris sobre los tejidos afectados. Incluso en temperaturas más bajas, de 0 - 10°C, puede desarrollarse esta capa fructífera. El patógeno de este género genera abundante micelio gris y conidióforos largos y ramificados que presentan células apicales redondeadas. Estas células portan racimos de conidios ovalados, de color blanco o gris, que se asemejan a un racimo de uvas. Los conidios se liberan fácilmente en condiciones de alta humedad y son transportados por corrientes de aire (Figuras 8 y 10). Además, el hongo produce esclerocios negros, duros, planos e irregulares (Agrios, 2004).

Entre las enfermedades más graves causadas por *Botryotinia*, se incluyen el moho gris (Figura 9) en fresas y varias hortalizas, la explosión y pudrición del cuello en las cebollas, la pudrición del cáliz en las manzanas, la marchitez o el moho gris en numerosas plantas ornamentales, la pudrición del bulbo en amaryllis, la pudrición del cormo en gladiolos, entre otras. Además, *Botryotinia* también provoca pudriciones blandas secundarias en frutas y hortalizas durante su almacenamiento, transporte y comercialización (Agrios, 2004).

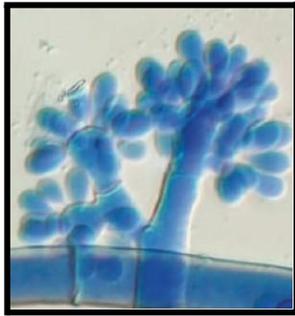


Figura 8. Conidióforos y conidios de Botryotinia fuckeliana (García et al., 2015)



Figura 9. Botryotinia fuckeliana en uva (SHUTTERSTOCK, 2023)

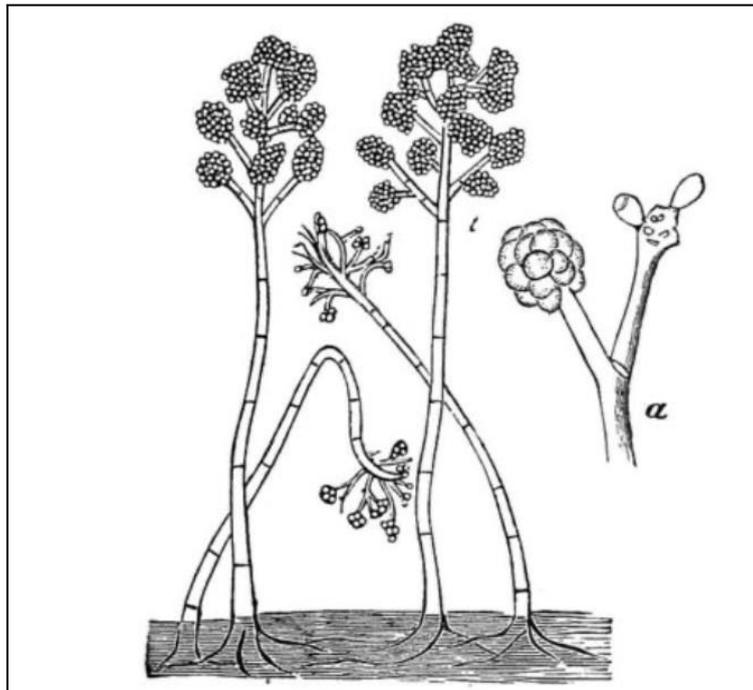


Figura 10. Estructuras morfológicas de Botryotinia (Chacón, 2020)

1.5.3. Género *Curvularia*

El género *Curvularia* se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera: Reino Fungi; Filo Ascomycota; Clase Dothideomycetes; Orden Pleosporales; Familia Pleosporaceae; Género *Curvularia* (Index Fungorum, 2020).

El género *Curvularia* comprende una variedad de especies fitopatógenas que se encuentran distribuidas por todo el mundo y que afectan a una amplia gama de hospedantes, especialmente cereales como el maíz (Anderson et al., 2019), girasol (Valle et al., 2017), lirios (Zeng et al., 2020), hojas de pino y pastos (Cui et al., 2020). Se estima que *Curvularia* engloba alrededor de 133 especies diferentes, incluyendo saprobios, endófitos y patógenos (Manamgoda et al., 2015). Algunas de estas especies de *Curvularia* han sido identificadas como patógenos en diversas plantas tropicales, como es el caso de *C. hawaiiensis*, que afecta al arroz (Figura 12) (Aslam et al., 2019). Este patógeno causa daños en las hojas, generando manchas redondas de color marrón a marrón púrpúreo, con centros grisáceos y halos cloróticos.

Además de las especies fitopatógenas, este género también incluye especies que se han identificado como patógenos tanto de humanos como de otros animales (Carter & Boudreaux, 2004), así como de humanos y plantas (Manamgoda et al., 2015). Sin embargo, algunas especies de *Curvularia* tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios con importantes actividades biológicas, como propiedades antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, citotóxicas y fitotóxicas, lo que ha despertado interés en su potencial uso en el ámbito farmacéutico y agrícola (Khiralla et al., 2019).

Una característica distintiva clave de *Curvularia* son los conidios, los cuales son curvos y multiseptados. En el caso de *C. hawaiiensis*, las colonias presentan una textura polvorienta a peluda y un color negro. Los conidióforos son erectos, no ramificados, flexuosos en el ápice, septados y presentan cicatrices conidiales planas en los bordes. Los conidios son cilíndricos, de color marrón, de paredes gruesas y lisas (Figuras 11 y 13).



Figura 11. Conidióforos y conidios de *Curvularia hawaiiensis* (SHUTTERSTOCK, 2023)



Figura 12. *Curvularia hawaiiensis* en arroz (SHUTTERSTOCK, 2023)

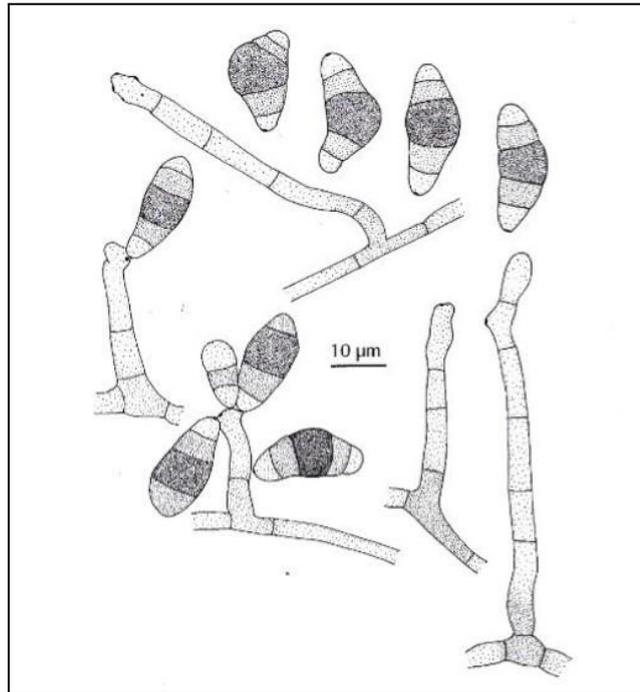


Figura 13. Conidióforos y conidios en *Curvularia* (Samson et al., 2000)

1.5.4. Género *Fusarium*

El género *Fusarium* se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera: Reino Fungi; Filo Ascomycota; Clase Sordariomycetes; Orden Hypocreales; Familia Nectriaceae; Género *Fusarium* (Index Fungorum, 2020).

La marchitez causada por *Fusarium* afectan y ocasiona pérdidas graves en la mayoría de las verduras y flores, varios cultivos de campo como el algodón y el tabaco, cultivos de plantación como el plátano, la banana, el tomate, el café y la caña de azúcar, y algunos árboles de sombra. Este tipo de marchitez es más grave en condiciones de suelo cálido y en invernaderos. La mayoría tiene ciclos de enfermedad. Las plantas infectadas se vuelven raquíticas y pronto se marchitan y finalmente mueren. Sin embargo, por lo general, la enfermedad no causa pérdidas graves a menos que las temperaturas del suelo y del aire sean bastante altas durante gran parte de la temporada (Agrios, 2004).

La enfermedad causa enrojecimiento de las venas y caída de hojas en plantas jóvenes, y enanismo, amarillamiento y marchitamiento en plantas más viejas. Puede llevar a la muerte de la planta, afectando también las raíces. Los síntomas incluyen pudrición de raíces y formación de un anillo marrón en el tallo (Figura 15). El follaje se seca y el fruto puede pudrirse y caer (Agrios, 2004).

Fusarium es un género característico por producir tres grupos de toxinas. Estas son producidas por diferentes especies de hongos generalmente en cereales y frutos secos: zearalenonas,

tricotecenos y fumonisinas. Estas toxinas son perjudiciales para algunos animales como cerdos, vacas, pollos y cerdos, ya que les causan problemas reproductivos, enfermedades neurológicas y otros efectos adversos. Además, las toxinas fumonisinas están asociadas con el cáncer en humanos (Agrios, 2004).

El patógeno *Fusarium oxysporum f. lycopersici* es un hongo que presenta un micelio inicialmente incoloro, pero que con la edad adquiere tonalidades de color crema, amarillo claro, rosado claro o ligeramente púrpuro. Produce tres tipos de esporas asexuales: microconidios, macroconidios y clamidosporas. Los microconidios son los más comunes y se encuentran abundantemente en todas las condiciones, incluso dentro de los vasos de las plantas infectadas. Los macroconidios, típicos de *Fusarium*, son más grandes, tienen forma curvada y se agrupan en estructuras similares a esporodocios en las plantas muertas (Figuras 14 y 16). Las clamidosporas son redondas, tienen paredes gruesas y se producen en el micelio antiguo o en las macroconidias. Estas esporas se generan en cultivos y posiblemente también en el suelo, aunque solo las clamidosporas pueden sobrevivir en el suelo por mucho tiempo (Agrios, 2004).



Figura 14. Macroconidios de *Fusarium oxysporum f. lycopersici* (SHUTTERSTOCK, 2023)



Figura 15. *Fusarium oxysporum f. lycopersici* en raíces (SHUTTERSTOCK, 2023)

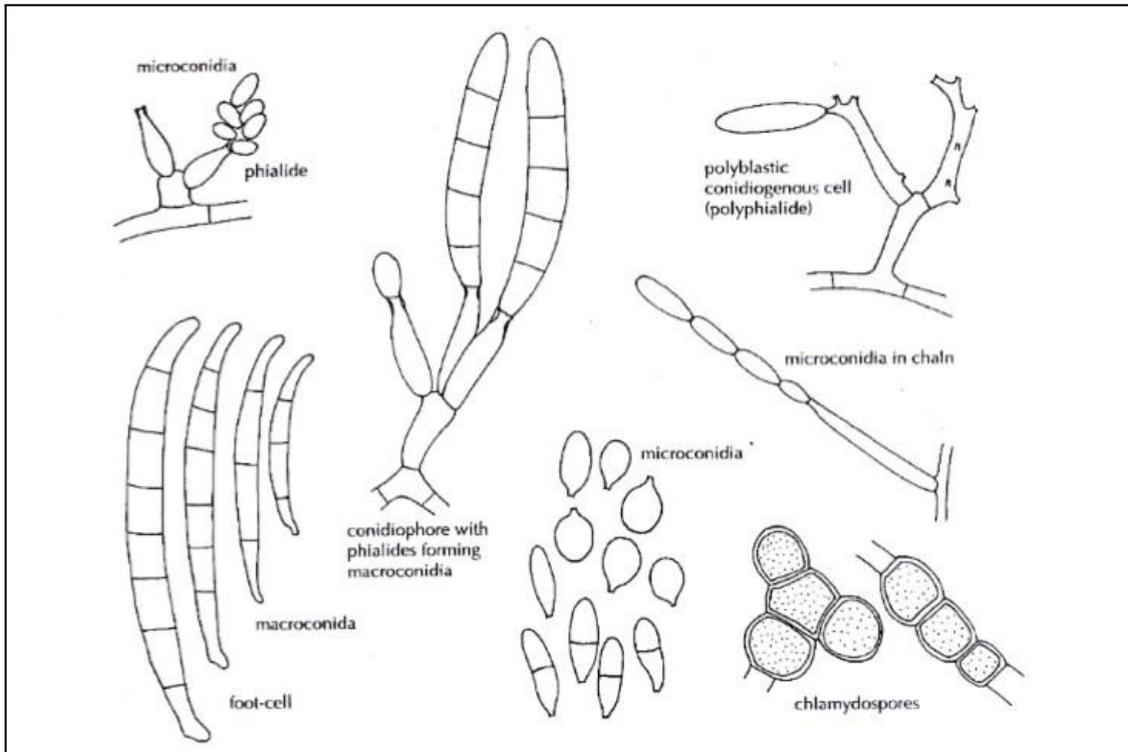


Figura 16. Estructuras morfológicas de *Fusarium* (Samson et al., 2000)

1.5.5. Género *Verticillium*

El género *Verticillium* se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera: Reino Fungi; Filo Ascomycota; Clase Sordariomycetes; Orden Glomerellales; Familia Plectosphaerellaceae; Género *Verticillium* (Index Fungorum, 2020).

El marchitamiento por *Verticillium* es una enfermedad ampliamente extendida a nivel mundial, pero su impacto es mayor en regiones de clima templado. Este patógeno afecta a más de 200 especies de plantas, incluyendo diversas hortalizas, flores, árboles frutales, fresas, cultivos de campo, árboles de sombra y bosques. Los síntomas del marchitamiento causado por *Verticillium* son muy similares a los provocados por *Fusarium*. Sin embargo, en muchos hospederos y en la mayoría de las áreas, *Verticillium* induce el marchitamiento a temperaturas más bajas que *Fusarium*. Además, los síntomas se desarrollan de forma más lenta y a menudo sólo aparecen en la parte inferior o externa de la planta, o bien afectan únicamente algunas de sus ramas (Agrios, 2004).

En algunos hospederos, el marchitamiento por *Verticillium* se presenta principalmente en plántulas, las cuales suelen morir poco después de la infección. Más comunes son las infecciones tardías, que ocasionan la caída de las hojas superiores y la aparición de manchas cloróticas irregulares

que posteriormente se vuelven necróticas (Figura 18). Las plantas más maduras infectadas con *Verticillium* suelen ser débiles y sus tejidos vasculares exhiben una decoloración característica. La infección por *Verticillium* puede ocasionar defoliación, un marchitamiento gradual y la muerte sucesiva de ramas, o bien un colapso repentino y la muerte de toda la planta. Cuando el marchitamiento por *Verticillium* aparece por primera vez en un campo, suele ser leve y localizado. Sin embargo, en años sucesivos, a medida que el inóculo se acumula y surgen nuevas cepas más virulentas del hongo, los ataques se vuelven cada vez más graves y generalizados, hasta que se hace necesario interrumpir el cultivo o reemplazarlo por variedades resistentes (Agrios, 2004).

Este género es el principal responsable de la enfermedad conocida como muerte temprana en cultivos pertenecientes a la familia de las solanáceas, como la patata, la berenjena y el tomate. La especie más común, *Verticillium dahliae*, produce conidios de vida corta y microesclerocios, y tiene un óptimo de crecimiento a temperaturas entre 25 y 28°C (Figuras 17 y 19). Algunas cepas de *Verticillium* muestran especialización en ciertos hospedantes, pero la mayoría de ellas atacan una amplia gama de plantas. *Verticillium dahliae* sobrevive el invierno en el suelo en forma de microesclerocios o micelio, y penetra las raíces jóvenes de las plantas huésped, ya sea de manera directa o a través de heridas. El hongo se propaga mediante semillas contaminadas, esquejes vegetativos, tubérculos, el viento, el agua superficial y el suelo (Agrios, 2004).

Aunque *Verticillium* se encuentra con frecuencia en áreas no cultivadas, lo que indica que el hongo es nativo de los suelos y puede atacar a los cultivos susceptibles tan pronto como se plantan (Agrios, 2004).

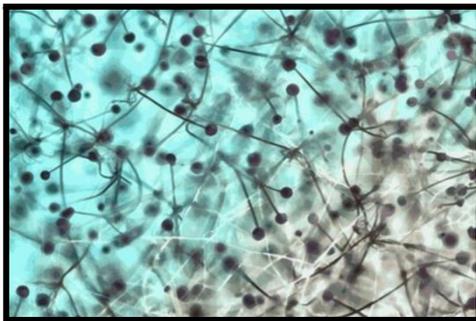


Figura 17. Conidios de *Verticillium dahliae* (SHUTTERSTOCK, 2023)



Figura 18. *Verticillium dahliae* en hoja (SHUTTERSTOCK, 2023)

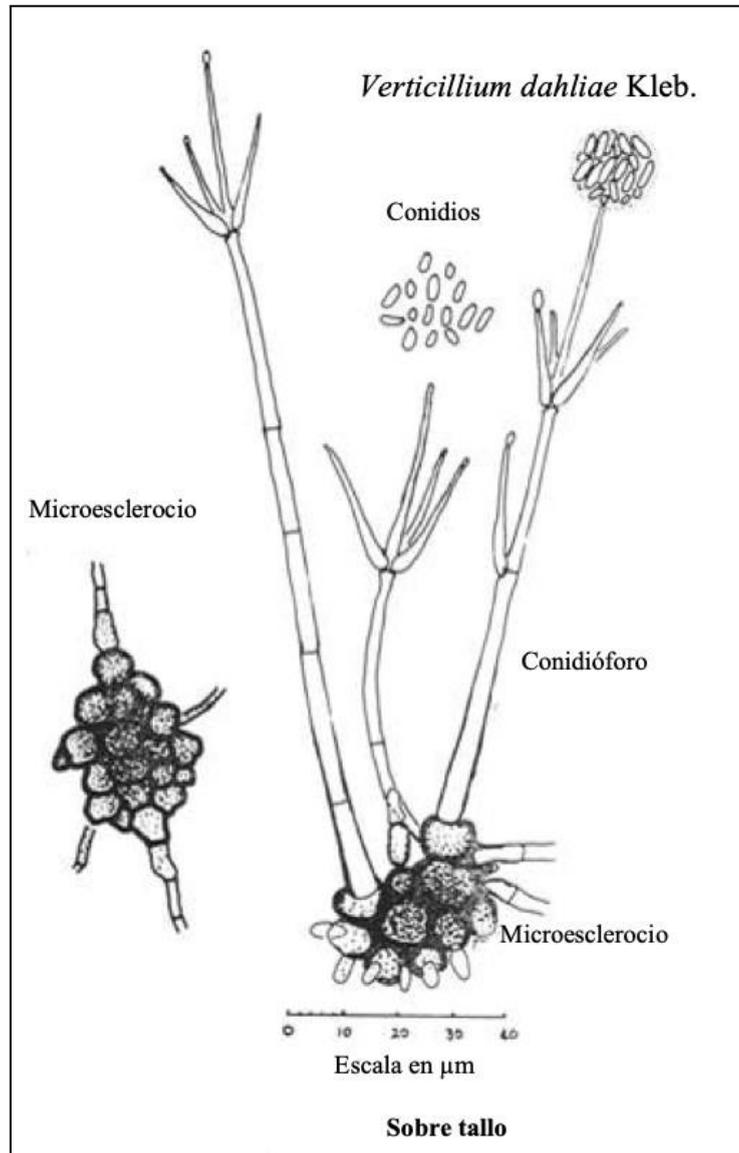


Figura 19. Estructuras morfológicas de *Verticillium* (Senasica, 2018)

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los objetivos principales del presente trabajo son los siguientes:

- Extraer y analizar la composición química del aceite esencial de *Mentha suaveolens* procedente de una población situada en Tavernes de la Valldigna, municipio de la Comunidad Valenciana.

- Estudiar la actividad antifúngica “*in vitro*” del aceite esencial de la especie
 - Aplicar las dosis de 200 µg/mL y 400 µg/mL sobre los hongos fitopatógenos y de post-cosecha; *Botryotinia fuckeliana*, *Curvularia hawaiiensis*, *Fusarium oxysporum lycopersici* y *Verticillium dahliae*.

 - Calcular el porcentaje de Inhibición del Crecimiento Miceliar de los hongos estudiados en los medios de cultivo con el aceite extraído.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Caracterización química del aceite esencial

3.1.1. Aceite esencial

La *Mentha suaveolens* fue recogida de la población silvestre en Tavernes de la Valligna, municipio de la Comunidad Valenciana. El aceite se extrajo de manera natural por hidrodestilación, técnica con la cual se separan los componentes más volátiles de un material vegetal para obtener el aceite esencial. Se basa en la diferencia de presiones de vapor entre el agua y los compuestos que constituyen el aceite esencial, los cuales son inmiscibles en agua. Cuando se calienta el agua y con el material vegetal, los componentes del material se convierten en vapor a una temperatura inferior a la de ebullición como sustancias puras, debido a la presión del vapor de agua. La ebullición tiene lugar cuando se iguala la presión de vapor a la atmosférica. El vapor generado en este proceso presenta pequeñas cantidades de aceite esencial, que cuando se condensa se separan de la fase acuosa debido a su inmiscibilidad. El aceite esencial se encuentra en la parte superior del condensado porque suele ser menos denso que el agua. El proceso se desarrolla en el tiempo adecuado para conseguir extraer todo el aceite esencial (Barrow, 1972).

3.1.2. Identificación de los compuestos del aceite esencial por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía de gases es una técnica muy poderosa usada para separar distintos componentes de una mezcla de compuestos, permitiendo su identificación cualitativa y medición cuantitativa que resulta adecuada para analizar del 10 al 20% de los compuestos conocidos.

Se aplica a los compuestos que presentan un nivel suficiente de volatilidad y estabilidad térmica, es decir, si una parte o la totalidad de las moléculas de un compuesto son capaces de existir en la fase gaseosa a temperaturas de alrededor de 400 a 500°C o inferiores sin descomponerse, como son los compuestos orgánicos volátiles.

Los componentes se separan en función de su afinidad por una fase estacionaria y una fase móvil. La estacionaria puede ser una columna capilar o empacada, mientras que la fase móvil suele ser un gas inerte, como helio, argón o nitrógeno. A medida que la muestra es inyectada en el sistema, los componentes se separan y se desplazan a diferentes velocidades a través de la columna. Algunos se absorben más fuertemente y se mueven más lentamente a lo largo de la columna, mientras que otros se desadsorben más rápidamente y se mueven más rápidamente con el gas portador. De esta manera, los componentes se separan en bandas a medida que viajan a través de la columna (Littlewood, 1970).

La Figura 20 muestra la representación esquemática del cromatógrafo de gases.

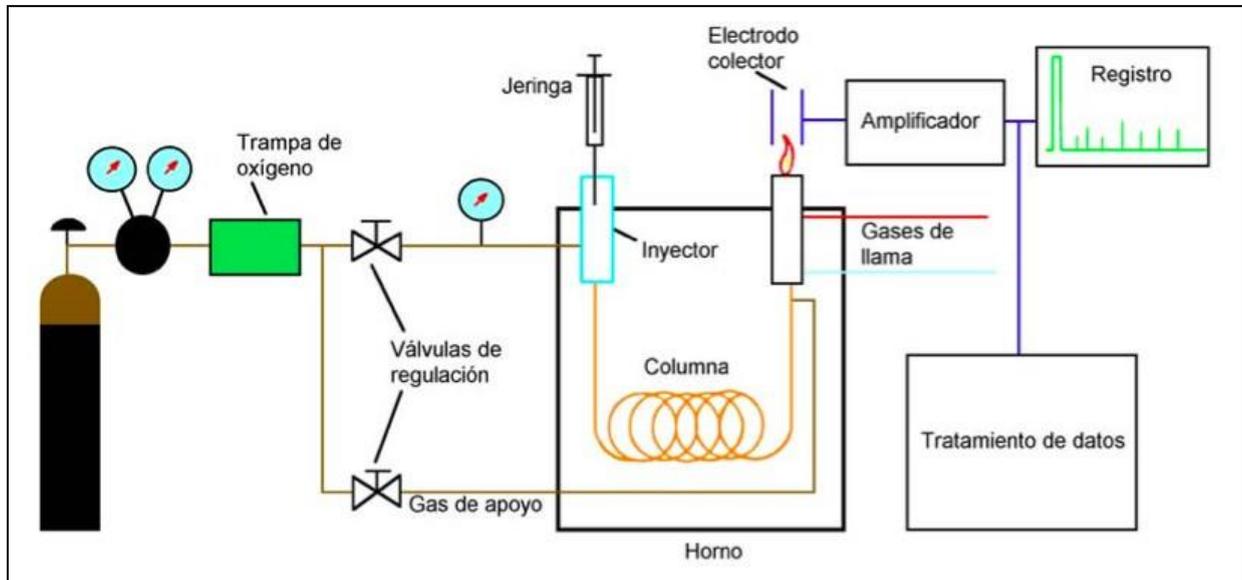


Figura 20. Representación esquemática del cromatógrafo de gases

El primer paso consiste en suministrar gases de pureza alta al cromatógrafo. Uno de ellos es el gas portador, el cual fluye hacia el inyector y atraviesa la columna hasta llegar al detector. Seguidamente se introduce una muestra en el inyector y se procede a calentar a una temperatura de entre 150 y 250°C. Esto provoca la vaporización de los componentes volátiles presentes en la muestra. Dichos componentes en estado gaseoso son transportados a través de la columna de gas portador, mientras que la columna se mantiene en un horno en el cual se lleva un control de la temperatura.

Durante su recorrido, los componentes de la muestra se desplazan a velocidades distintas, lo cual está determinado principalmente por sus propiedades físicas así como también por la temperatura y composición de la columna. El componente más rápido en su movimiento sale de la columna en primer lugar, seguidos por los demás componentes en el orden correspondiente. A medida que cada componente se eluye entra en el detector, el cual se encuentra calentado. En el detector se genera una señal electrónica basada en la interacción del componente con dicho detector. El tamaño de la señal se registra en un sistema de datos y se representa gráficamente en un cromatograma en función del tiempo transcurrido.

El cromatograma obtenido muestra los distintos componentes presentes en la muestra, identificados por sus tiempos de retención, cada uno de los tiempos que tardan los compuestos en atravesar la columna, y las señales generadas en el detector.

3.1.3. Análisis cualitativo

El análisis cualitativo se llevó a cabo mediante la técnica de cromatografía de gases - espectrometría de masas utilizando el aparato Varian Saturn 2000 equipado, utilizando una columna capilar Varian C.S. VA-5MS de 0,25 mm de diámetro interno, 0,25 μg de espesor de la película y 30 mm de longitud inyectando en modo Split, con un ratio de 1:25.

Las condiciones en las cuales se llevó a cabo el trabajo tanto con el cromatógrafo de gases con espectrómetro de masas como también con el cromatógrafo de gases con detector FID, fueron por impacto electrónico dentro del rango de masas (m/z) de 28 a 400 u.m.a. y a 70 eV como voltaje de ionización.

Los compuestos se reconocieron mediante el análisis de su espectro de masas, identificándose con los índices de retención de Van den Dool & Kratz (Lineales) y comparando cada uno de los espectros de masas y sus tiempos de retención con los de muestras de referencia o datos proporcionados en la literatura (Adams 2007).

3.1.4. Análisis cuantitativo

El análisis cuantitativo se llevó a cabo mediante cromatografía de gases usando un cromatógrafo modelo Clarus 500 GC Perkin-Elmer, equipado con un detector de ionización de llama (FID) y se utilizó una columna capilar Hewlett-Packard HP-1 de 0,2 mm de diámetro interno, 0,33 μm de espesor de la película y de 30 m de longitud.

El programa de temperatura aplicado a la columna fue de 60°C durante cinco minutos y luego se aplicó un gradiente de aumento de temperatura de 3°C cada minuto hasta alcanzar los 180°C. Después se utilizó un gradiente de aumento de temperatura de 20°C cada minuto hasta llegar a 280°C, y esta temperatura se mantuvo durante diez minutos.

El gas portador utilizado fue helio, con un flujo de 1 milímetro cada minuto. El detector de ionización de llama (FID) se mantuvo a una temperatura constante de 250°C, mientras que el inyector se mantuvo a 22°C.

El cálculo de los índices de retención de Van den Dool & Kratz (Lineales) y el análisis mediante la técnica de cromatografía de gases - espectrometría de masas han permitido llevar a cabo el análisis cuantitativo. Cuando se obtuvieron los tiempos de retención (min), se determinaron cada uno de los índices de retención lineales mediante la expresión matemática que aparece a continuación:

$$\text{LRI} = 100 \cdot (n^{\circ} \text{C HC}_{n-1}) + 100 [(t_{\text{Rx}} - t_{\text{R HC}_{n-1}}) / (t_{\text{R HC}_{n+1}} - t_{\text{R HC}_{n-1}})]$$

Sabiendo que:

$n^{\circ} \text{C HC}_{n-1}$: número total de átomos de carbono del hidrocarburo anterior al pico analizado.

t_{Rx} : tiempo de retención del pico analizado.

$t_{\text{R HC}_{n-1}}$: tiempo de retención del hidrocarburo anterior al pico analizado

$t_{\text{R HC}_{n+1}}$: tiempo de retención del hidrocarburo posterior del pico analizado.

3.2. Determinación de la actividad antifúngica del aceite esencial

3.2.1. Hongos

Los hongos con los cuales se ha experimentado en el presente trabajo fueron: *Botryotinia fuckeliana* (BF) CECT 2100, *Curvularia hawaiiensis* (CH) CECT 20934, *Fusarium oxysporum lycopersici* (FOL) CECT 2715 y *Verticillium dahliae* (VD) CECT 2694.

El hongo CH fue aislado en el Laboratorio de botánica del Departamento de Ecosistemas Agroforestales a partir de carióspsides de arroz de la variedad valenciana bomba. La identificación de este hongo se realizó mediante métodos morfológicos y moleculares además de que posteriormente fue incluido en la colección Española de Cultivos Tipo (CECT). En cambio, los hongos BF, FOL y VD fueron suministrados por la CECT directamente.

3.2.2. Ensayos “*in vitro*” de la actividad antifúngica del aceite esencial

Para llevar a cabo el experimento, se disolvió, mezcló y homogeneizó el aceite esencial en matraces usando un medio de cultivo PDA/Tween 80 previamente esterilizado. El medio se dejó enfriar hasta que alcanzó la temperatura de 45 - 50°C y se añadió el aceite esencial, en cabina, en concentraciones de 200 µg/mL y 400 µg/mL. Después se llevó a cabo la homogeneización, realizada en el agitador orbital durante 10 minutos a una velocidad de 170 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se distribuyó la mezcla en placas Petri de 90 x 15 mm y 15 x 15 mm.

El hongo usado en el experimento se sembró como explantes discoidales de 8 mm de diámetro los cuales se obtuvieron de una colonia sembrada a una temperatura de 25 - 28°C durante 7 días. Los explantes se colocaron en el centro de las placas Petri que contenían el aceite esencial. El experimento se llevó a cabo incubando las muestras a una temperatura de 25 - 28°C durante 7 días. Se realizaron 5 repeticiones por cada tratamiento. Las placas control únicamente contenían el medio de cultivo PDA/Tween 80 y el hongo.

3.2.3. Evaluación y cálculo de la Inhibición del Crecimiento Micelias (MGI)

La evaluación del crecimiento micelias se realizó midiendo dos diámetros perpendiculares de la colonia 7 días después de la siembra y el cálculo de la Inhibición del Crecimiento Micelias se calculó con las medias utilizando la fórmula que aparece a continuación (Albuquerque et al., 2006):

$$\text{MGI} = [(\text{DC} - \text{DO}) / \text{DC}] \times 100$$

Sabiendo que DC es la media del diámetro de las colonias en las placas control medido el séptimo día desde la siembra y DO es la media del diámetro de las colonias en las placas tratadas con el aceite esencial medido el séptimo día desde la siembra. Ambas medidas en mm.

3.3. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos del crecimiento micelias de los hongos estudiados fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) para su posterior evaluación. Además, se usaron los intervalos HSD de Tukey para comparar las medias de los factores simples, como la especie y el tratamiento, así como su interacción. Se consideraron significativos los valores de $P \leq 0,05$. Todo el análisis estadístico se realizó utilizando el software Statgraphics Centurion XVIII.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización química del aceite esencial

4.1.1. Identificación de los compuestos químicos

Mediante la espectroscopía de gases se ha obtenido el cromatograma que aparece en la Figura 21, donde se muestra el perfil de la composición química del aceite esencial extraído de la especie *Mentha suaveolens* proveniente de Tavernes de la Valldigna, el cual ha servido de gran ayuda para realizar la identificación.

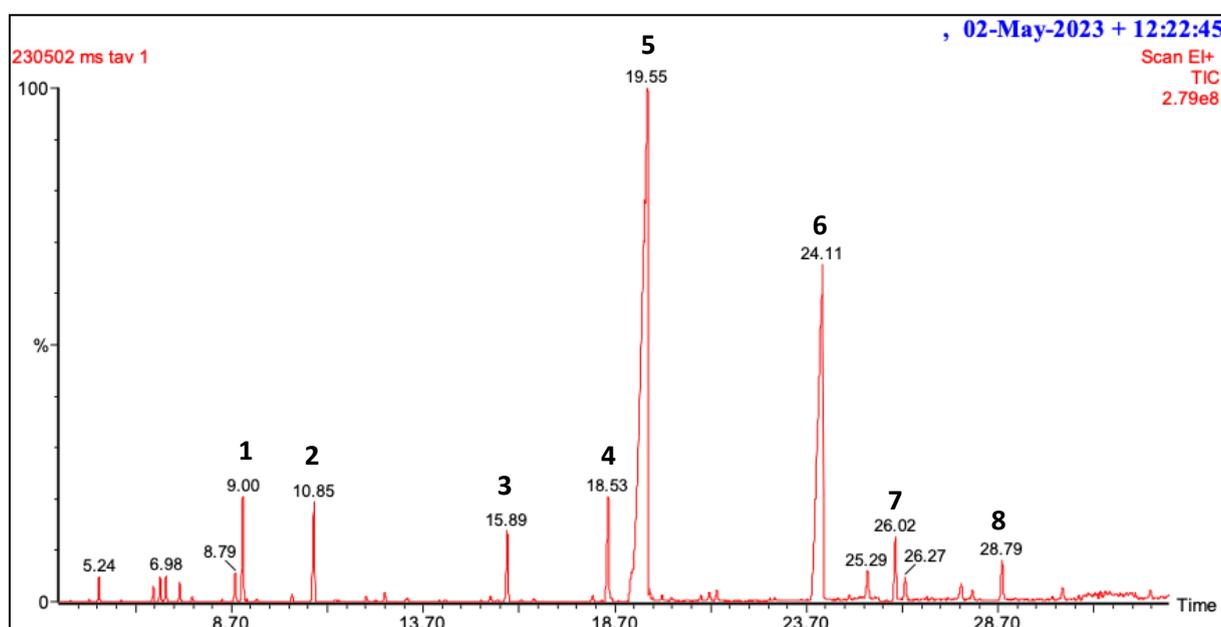


Figura 21. Cromatograma de gases del aceite esencial extraído de la *Mentha suaveolens* proveniente de Tavernes de la Valldigna

Los componentes mayoritarios en el cromatograma de iones totales (GC/MS) fueron los siguientes: 1. Mirceno (1,3 %); 2. Limoneno (3,7 %); 3. cis-Sabinenhidrato (1,6 %); 4. Piperitona (1,3 %); 5. Óxido de piperitona (39,3 %); 6. Óxido de piperitenona (33,4 %); 7. cis-Jasmona (5,2 %); y 8. Germacreno D (2,2 %).

4.1.2. Cuantificación de los compuestos químicos

Mediante el detector de ionización de llama (FID) se han podido cuantificar todos los compuestos presentes en el aceite esencial trabajado. El análisis del presente trabajo se ha realizado por triplicado, por lo que se ha obtenido la media y el error estándar de las tres muestras analizadas. Los resultados muestran que los compuestos más destacables son los óxidos de piperitona y de piperitenona, ya que representan el 39,3 y el 33,4 % de la composición total identificada, más de la mitad del total. El tercer compuesto predominante es la cis-Jasmona, ya que supone un 5,2 % de la composición total. Por otra parte, se encuentran los compuestos Limoneno (3,7 %), Germacreno D (2,2 %), cis-Sabinenhidrato (1,6 %), acetato de lavandulilo (1,4 %), mirceno (1,3 %), piperitona (1,3 %) y 1-Octen-3-ol (1 %). Todos estos componentes junto con el resto, los minoritarios, conforman el 99,6 % de la composición del aceite esencial de la *Mentha suaveolens*. La composición total identificada se puede consultar en el Anexo del documento.

4.2. Capacidad antifúngica del aceite esencial

4.2.1. Determinación de la actividad antifúngica sobre el crecimiento micelial

En la Tabla 2 se muestra el diámetro de crecimiento micelial, en milímetros (mm), de los hongos *Botryotinia fuckeliana*, *Curvularia hawaiiensis*, *Fusarium oxysporum lycopersici* y *Verticillium dahliae* en los distintos medios de cultivo; el control, el cual no contiene aceite esencial, a concentración de 200 µg/mL y de 400 µg/mL medidos a los 7 días de que fueran incubados.

Tabla 2. Cálculo de los valores de crecimiento medio (mm) y la desviación estándar para los hongos crecidos en medios con el aceite esencial *Mentha suaveolens* a concentraciones de PDA (control), 200 µg/mL y de 400 µg/mL a los 7 días de incubación.

Hongos	PDA - Control	200 µg/mL	400 µg/mL
<i>B. fuckeliana</i>	108,80 ± 4,02	56,00 ± 10,93	0,00 ± 0,00
<i>C. hawaiiensis</i>	32,40 ± 3,10	30,30 ± 3,06	0,00 ± 0,00
<i>F. oxysporum</i>	82,80 ± 2,49	56,50 ± 1,84	12,40 ± 0,97
<i>V. dahliae</i>	29,90 ± 1,10	22,60 ± 2,72	0,00 ± 0,00

El aceite esencial de *Mentha suaveolens* a la dosis de 200 µg/mL inhibe aproximadamente la mitad del crecimiento micelial del hongo *Botryotinia fuckeliana* y a la dosis de 400 µg/mL lo inhibe completamente. Por lo tanto, este hongo resulta ser el más sensible.

El aceite esencial estudiado a la dosis de 400 µg/mL también inhibe totalmente el crecimiento micelial de *Curvularia hawaiiensis* y *Verticillium dahliae*, mientras que el aceite a la dosis de 200 µg/mL a penas inhibe el crecimiento micelial de estos hongos.

Este aceite esencial a la dosis de 400 µg/mL no inhibe completamente el crecimiento micelial del hongo *Fusarium oxysporum lycopersici*, pero los resultados no son despreciables.

Las fotografías de la Figura 22 muestran las diferencias de crecimiento entre las distintas especies de hongos a las concentraciones estudiadas.

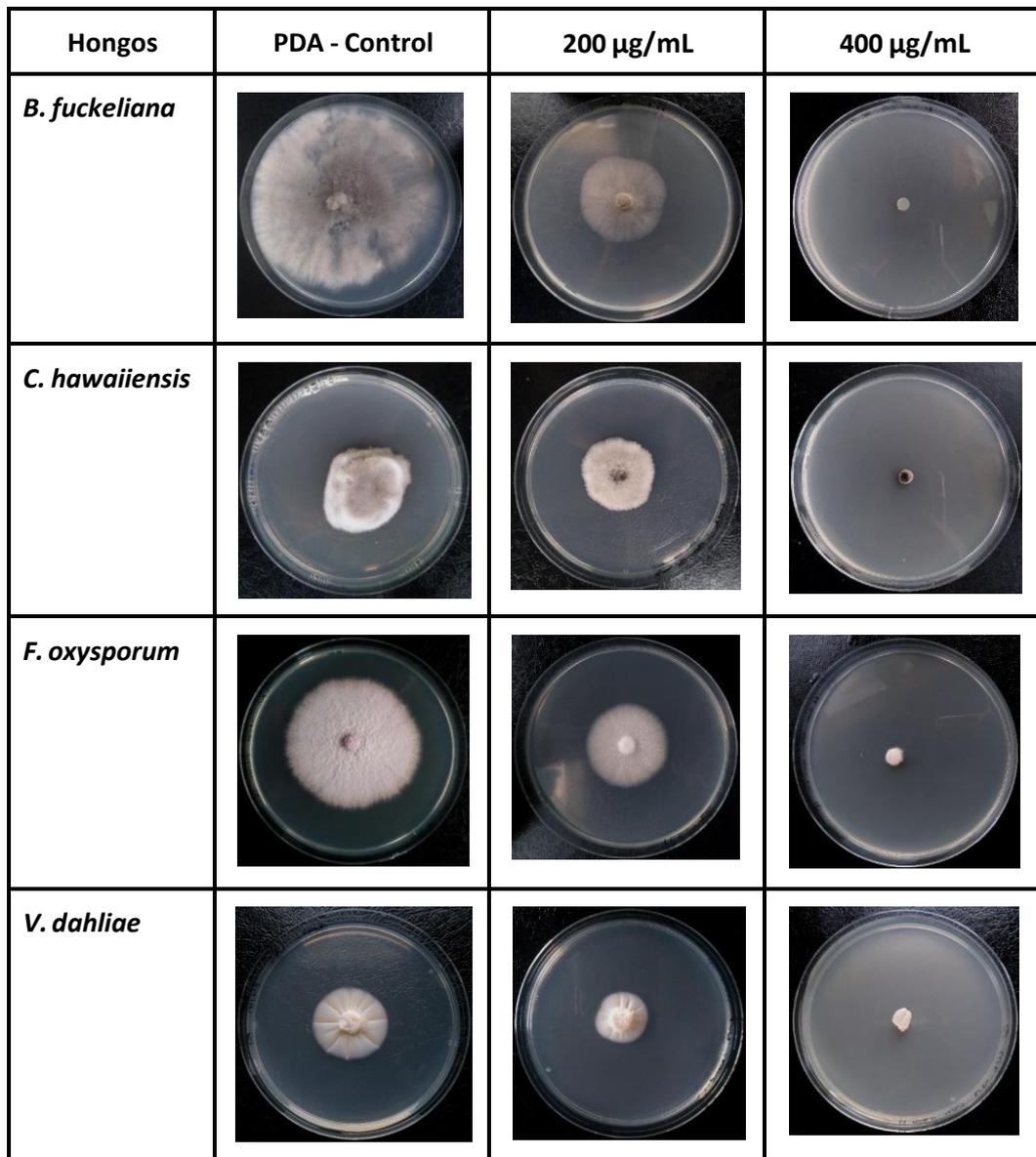


Figura 22. Crecimiento micelial de B. fuckeliana, C. hawaiiensis, F. oxysporum y V. dahliae en los medios de PDA (control) y con las dosis de 200 y 400 µg/mL del aceite esencial de Mentha suaveolens

Se observa que, pasados los 7 días desde que se incubaron los hongos, *Botryotinia fuckeliana* es el hongo que crece más rápido sobre el medio control. Le siguen *Fusarium oxysporum lycopersici*, *Curvularia hawaiiensis* y *Verticillium dahliae*.

4.2.2. Cálculo de la Inhibición del Crecimiento Miceliar (MGI)

La Tabla 3 presenta el porcentaje de Inhibición del Crecimiento Miceliar (MGI) de los hongos *Botryotinia fuckeliana*, *Curvularia hawaiiensis*, *Fusarium oxysporum lycopersici* y *Verticillium dahliae* en los distintos medios de cultivo ensayados; el control y con el aceite esencial de *Mentha suaveolens* a las concentraciones de 200 µg/mL y de 400 µg/mL tras los 7 días de ser incubados.

Tabla 3. Inhibición del Crecimiento Miceliar en % (MGI), de los hongos crecidos en los distintos medios de cultivo a las concentraciones estudiadas tras 7 días de incubación

Hongos	200 µg/mL	400 µg/mL
<i>B. fuckeliana</i>	48,54	100
<i>C. hawaiiensis</i>	9,5	100
<i>F. oxysporum</i>	31,73	85,01
<i>V. dahliae</i>	24,21	100

El tratamiento con *Mentha suaveolens* presenta el mayor % de inhibición frente al hongo *Botryotinia fuckeliana* ya que, a la concentración de 200 µg/mL, inhibe casi el 50 % del crecimiento miceliar. Por lo tanto, este aceite es el más efectivo para inhibir el crecimiento del hongo *Botryotinia fuckeliana*.

Sin embargo, a la concentración de 400 µg/mL, el efecto de la actividad antifúngica de la *Mentha suaveolens* es mucho mayor en la mayoría de los hongos, ya que se observa una inhibición del 100 % en el crecimiento de los hongos *Botryotinia fuckeliana*, *Curvularia hawaiiensis* y *Verticillium dahliae* y una del 85,01 %, ligeramente menor, en *Fusarium oxysporum lycopersici*.

La Figura 23 muestra la representación gráfica del % de Inhibición del Crecimiento Micelial de cada uno de los hongos a las distintas dosis de aceite esencial.

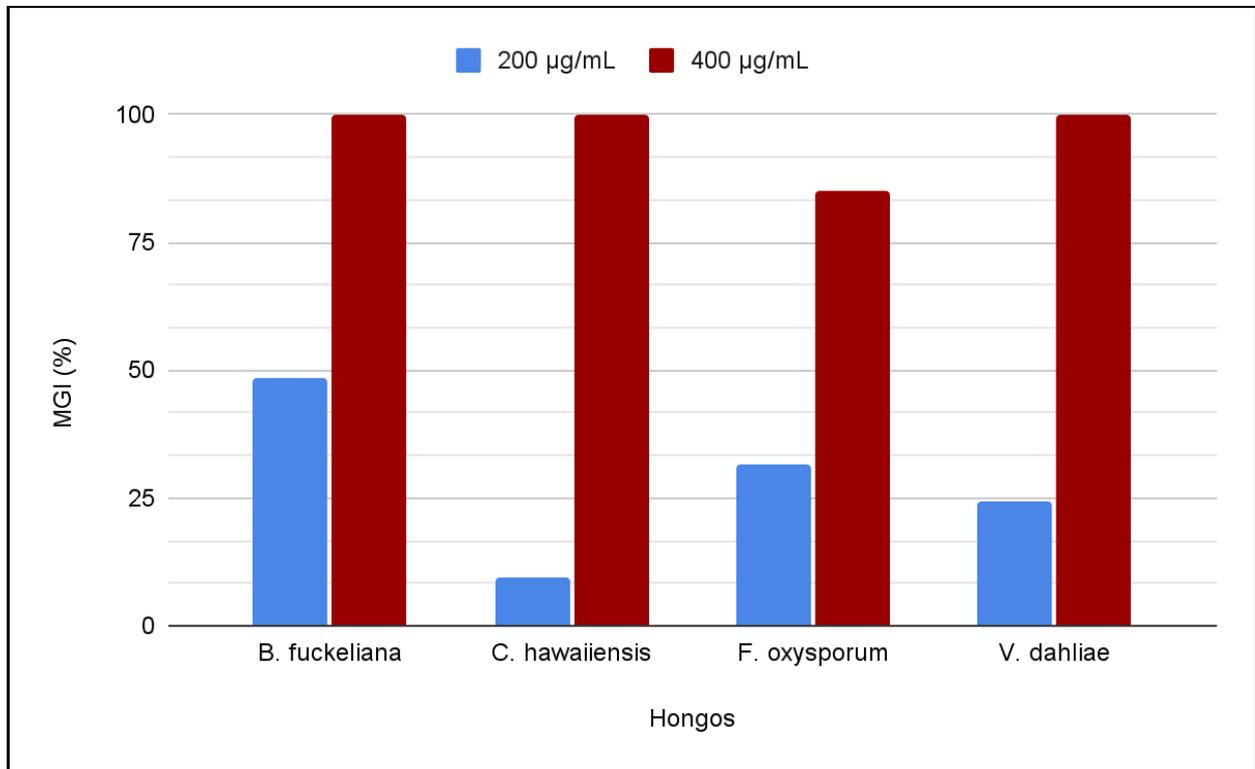


Figura 23. Gráfico del porcentaje de Inhibición del Crecimiento Micelial (MGI) del aceite esencial de *Mentha suaveolens* a las concentraciones de 200 y 400 µg/mL para los hongos *Botryotinia fuckeliana*, *Curvularia hawaiiensis*, *Fusarium oxysporum lycopersici* y *Verticillium dahliae*

4.3. Análisis estadístico

En el gráfico que aparece en la Figura 24 se representan los intervalos de Tukey HSD para la comparación de las medias entre las distintas especies y tratamientos, determinando si existen diferencias significativas entre el crecimiento medio de las especies de hongos estudiadas.

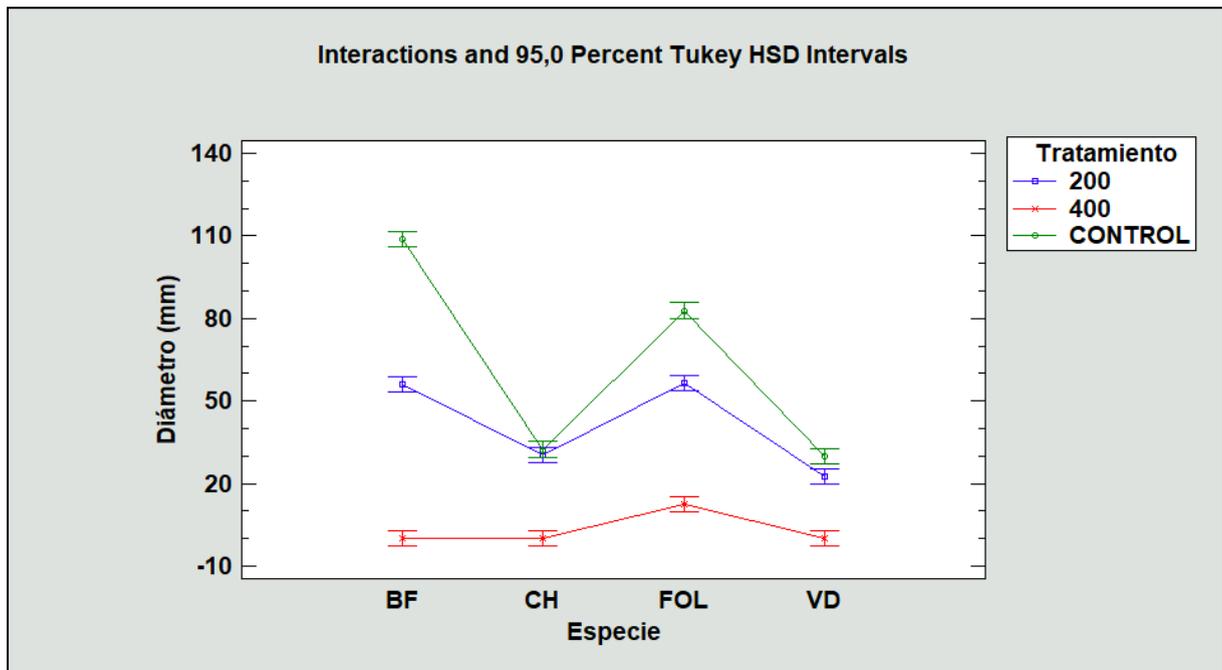


Figura 24. Gráfica de interacción, crecimiento medio, especies y concentración; Control, de 200 y 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de aceite esencial de *Mentha suaveolens* contra las especies de hongos *Botryotinia fuckeliana* (BF), *Curvularia hawaiiensis* (CH), *Fusarium oxysporum lycopersici* (FOL) y *Verticillium dahliae* (VD).

Los resultados indican que todas las especies, excepto *Curvularia hawaiiensis* a concentraciones control y de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, presentan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95 %. Esto es debido al solapamiento de *Curvularia hawaiiensis* en los tratamientos control y a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del aceite esencial de *Mentha suaveolens*.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Del trabajo realizado se llegan a obtener las siguientes conclusiones:

- El aceite esencial de *Mentha suaveolens* está compuesto principalmente por los óxidos de piperitona (39,9 %) y piperitenona (33,4 %), representando el 73,45 % de la composición total identificada. Estos dos componentes químicos son los responsables principales de la actividad antifúngica que presenta el aceite esencial estudiado.
- El hongo *Botryotinia fuckeliana* es la especie que presenta mayor sensibilidad a los tratamientos con el aceite esencial de *Mentha suaveolens*; la dosis de 200 µg/mL inhibe aproximadamente el 50 % del crecimiento micelial y la dosis de 400 µg/mL inhibe el 100 % del crecimiento.
- Existen diferencias significativas en el crecimiento de *Botryotinia fuckeliana*, *Fusarium oxysporum lycopersici* y *Verticillium dahliae* entre los tres tratamientos distintos. No hay diferencias significativas en la especie *Curvularia hawaiiensis* entre el tratamiento control y el de 200 µg/mL, pero sí a la dosis de 400 µg/mL del aceite esencial de *Mentha suaveolens*.
- La dosis de 400 µg/mL inhibe totalmente el crecimiento micelial (MGI del 100%) de las especies *Botryotinia fuckeliana*, *Curvularia hawaiiensis* y *Verticillium dahliae*.
- La misma dosis (400 µg/mL) reduce el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum lycopersici* con un MGI del 85 %, valor nada despreciable.
- El presente estudio concluye que el aceite esencial de *Mentha suaveolens*, compuesto principalmente por los óxidos de piperitona y piperitenona, es una alternativa natural muy efectiva para combatir el crecimiento de los hongos ensayados, sobre todo frente a las especies *Botryotinia fuckeliana*, *Curvularia hawaiiensis* y *Verticillium dahliae* así como también frente a *Fusarium oxysporum lycopersici*.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, R.P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry (4th Edition). *Allured publishing corporation*.
- AGRIOS, G.N. (2004). Plant pathology. Elsevier Academic Press. New York, USA. 635 pp.
- ALBUQUERQUE, U.P.; LUCENA, R.F.P.; MONTEIRO, J.M.; FLORENTINO, A.T.N. & ALMEIDA, C. DE F.C.B.R. (2006). Evaluating Two Quantitative Ethnobotanical Techniques. *Ethnobotany Research and Applications*, 4, 051-060.
- ANDERSON, N.R.; MEHL, K.M.; NEVES, D.L.; BRADLEY, C.A. & WISE, K.A. (2019). First report of *Curvularia* leaf spot of corn, caused by *Curvularia lunata*, in Kentucky. *Plant Disease*, 103, 2692.
- ASLAM, H.M.U.; GLEASON, M.L.; IKRAM, A.; ALAM, M.W.; AHMED, M.Z.; MANSHA, M.Z.; YASIN, O.; HAMEED, A. & AMRAO, L. (2019). First report of brown leaf spot of rice caused by *Curvularia hawaiiensis* in Pakistan. *Plant Disease*, 103(10), 2679.
- BARRA A. (2009). Factors affecting chemical variability of essential oils: a review of recent developments. *Natural product communications*, 4(8), 1147-1154.
- BARROW, G. (1972). Química Física, vols. 1 e 2. Ed. Reverte S.A., Barcelona, 491 pp.
- BENAYAD, N.; EBRAHIM, W.; HAKIKI, A. & MOSADDAK, M. (2012). Chemical characterization and insecticidal evaluation of the essential oil of *Mentha suaveolens* L. and *Mentha pulegium* L. growing in Morocco. *Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 13(1), 27.
- BOUYAHYA, A.; BELMEHDI, O.; ABRINI, J.; DAKKA, N. & BAKRI, Y. (2019). Chemical composition of *Mentha suaveolens* and *Pinus halepensis* essential oils and their antibacterial and antioxidant activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 12(3), 117-122.
- BOŽOVIĆ, M.; PIROLI, A. & RAGNO, R. (2015). *Mentha suaveolens* (Lamiaceae) Essential Oil and Its Main Constituent Piperitenone Oxide: Biological Activities and Chemistry. *Molecules* (Basel, Switzerland), 20(5), 8605-8633.
- CARTER, E. & BOUDREAUX, C. (2004). Fatal cerebral *Phaeohiphomycosis* due to *Curvularia lunata* in an immunocompetent patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 5419-5423.
- CHACÓN, J.Y.V. (2020). Botrytis cinerea: características, taxonomía, síntomas, control. *Lifeder*.
- CIVITELLI, L.; PANELLA, S.; MARCOCCI, M.E.; DE PETRIS, A.; GARZOLI, S.; PEPI, F.; VAVALA, E.; RAGNO, R.; NENCIONI, L., PALAMARA, A.T. & ANGIOLELLA, L. (2014). In vitro inhibition of herpes simplex virus

type 1 replication by *Mentha suaveolens* essential oil and its main component piperitenone oxide. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 21(6), 857–865.

CUI, W.L.; LU, X.; Q., BIAN, J.Y.; QI, X.L.; LI, D.W. & HUANG, L. (2020). *Curvularia spicifera* and *Curvularia muehlenbeckiae* causing leaf blight on *Cunninghamia lanceolata*. *Plant Pathology*, 69(6), 1139-1147.

EL-KASHOURY, E.; EL-ASKARY, H.I.; KANDIL, Z.A. & SALEM, M.A. (2013). Botanical and genetic characterization of *Mentha suaveolens* Ehrh cultivated in Egypt. *Pharmacogn. J.*, 5:228-237.

EL-KASHOURY, E.A.; EL-ASKARY, H.; KANDIL, Z.A. & SALEM, M.L. (2014). Chemical composition of the essential oil and botanical study of the flowers of *Mentha suaveolens*. *Pharmaceutical Biology*, 52(6), 688-697.

ENCYCLOPEDIA OF LIFE (2021). Visto el 28 de junio de 2023, www.eol.org

FARETRA, F.; ANTONACCI, E. & POLLASTRO, S. (1988). Sexual behaviour and mating system of *Botryotinia fuckeliana*, teleomorph of *Botrytis cinerea*. *Microbiology*, 134(9), 2543-2550.

FERREIRA, A.; PROENÇA, C.; SERRALHEIRO, M.L.M., & ARAUJO, M.E.M. (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of ethnopharmacology*, 108(1), 31-37.

FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G. & SCHEFFER, J.J. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(4), 213-226.

FLORA IBERICA, 2010. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol XII Verbenaceae – Labiatae – Callitrichaceae. Real Jardín Botánico, C.S.I.C., Madrid, pp. 414-421.

FORMISANO, C., RIGANO, D.; NAPOLITANO, F.; SENATORE, F.; APOSTOLIDES, A.N.; PIOZZI, F. & ROSSELLI, S. (2007). Volatile Constituents of *Calamintha origanifolia* Boiss. Growing Wild in Lebanon. *Natural Product Communications*, 2(12).

GARCÍA, M.R.; GARCÍA, D.M.; I LATORRE, J.P.; DE ERIBE, J.O.; SPA, P.Q.S I. & EDMONDS, J. (2015). ARAW: Uva sin botritis y sin residuos. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (274), 18.

INDEX FUNGORUM (2020). Visto el 28 de junio de 2023, www.Indexfungorum.org

KAROUSOU, R.; BALTA, M.; HANLIDOU, E. & KOKKINI, S. (2007). "Mints", smells and traditional uses in Thessaloniki (Greece) and other Mediterranean countries. *Journal of ethnopharmacology*, 109(2), 248-257.

KHIRALLA, A.; SPINA, R.; SALIBA, S. & LAURAIN-MATTAR, D. (2019). Diversity of nature products of the genera *Curvularia* and *Bipolaris*. *Fungal Biology Reviews*, 33, 101-122.

LITTLEWOOD, A.B. (2013). *Gas chromatography: principles, techniques, and applications*. Elsevier. 103 pp.

MANAMGODA, D.S.; ROSSMAN, A.Y.; CASTLEBURY, L.A.; CHUKEATIROTE, E. & HYDE, K.D. (2015). A taxonomic and phylogenetic re-appraisal of the genus *Curvularia* (Pleosporaceae): human and plant pathogens. *Phytotaxa*, 212, 175-198.

ORTIZ DE URBINA, A.V.; MARTÍN, M.L.; MONTERO, M.J.; MORÁN, A. & SAN ROMÁN, L. (1989). Sedating and antipyretic activity of the essential oil of *Calamintha sylvatica* subsp. *ascendens*. *Journal of ethnopharmacology*, 25(2), 165-171.

OUMZIL, H., GHOULAMI, S., RHAJAOU, M., ILIDRISSI, A., FKI-H-TETOUANI, S., FAID, M., & BENJOUAD, A. (2002). Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 16(8), 727-731.

PETRETTO, G. L.; FANCELLO, F.; ZARA, S.; FODDAI, M.; MANGIA, N. P.; SANNA, M.L.; OMER, E.A.; MENGHINI, L.; CHESSA, M. & PINTORE, G. (2014). Antimicrobial activity against beneficial microorganisms and chemical composition of essential oil of *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* grown in Sardinia. *Journal of Food Science*, 79(3), M369-M377.

PRABUSEENIVASAN, S.; JAYAKUMAR, M. & IGNACIMUTHU, S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC complementary and alternative medicine*, 6, 39.

SENASICA (2018). Protocolo de Diagnóstico: *Verticillium dahliae* (Marchitez por *Verticillium*). *Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria*. Tecaámac, México. 18 pp.

SHUTTERSTOCK (2023). Visto el 29 de junio de 2023, www.shutterstock.com

TEPE, B.; DAFERERA, D.; SÖKMEN, M.; POLISSIOU, M. & SÖKMEN, A. (2004). In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigi* M. Zohary et P.H. Davis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(5), 1132-1137.

VALLE, M.G.V.; POUDEL, B. & ZHANG, S. (2017). First report of *Curvularia* blight on sunflower caused by *Curvularia aeria* in Mexico. *Plant Disease*, 101, 1955.