

Los aceites esenciales de las plantas en la sostenibilidad medioambiental. Propuestas para la innovación educativa.

Material y métodos para los experimentos propuestos

Distinción entre los aceites esenciales de tomillos fenólicos y no fenólicos (*Thymus Piperella* y *Thymus vulgaris* L, qt. 1,8-cineol) mediante cromatografía en capa fina.

Thymus piperella y *Thymus vulgaris* son dos especies que comparten su habitat en amplias zonas del sur de la provincia de Valencia y norte de Alicante, en la Comunidad Valenciana. Aparte de sus evidentes diferencias morfológicas, sus aceites esenciales son representativos de dos amplios grupos de quimiotipos referidos a los aceites esenciales del género *Thymus*: los fenólicos, caracterizados por el predominio de los isómeros timol y carvacrol, y los no fenólicos. Entre estos últimos cabe destacar el que presenta como compuesto mayoritario el 1,8-cineol o eucaliptol, ampliamente extendido en la Península Ibérica.

Los **objetivos** de esta actividad experimental son, principalmente:

1. Llevar a cabo la obtención de un extracto del aceite esencial, mediante una sencilla y rápida destilación por arrastre de vapor a microescala, realizada con material muy sencillo y accesible.
2. Comparar la composición de los aceites esenciales de *Thymus piperella* y *Thymus vulgaris* en cuanto a la presencia de los dos compuestos más representativos: carvacrol y 1,8-cineol, utilizándolos como patrones.

Material:

Hojas secas de ambas plantas.	Carvacrol
2 matraces Erlenmeyer de 100 mL	Sulfato de sodio anhidro
Viales de 5 mL	Vainillina sulfúrica
Vasos de precipitados de 50 mL	Frasco pulverizador
Espátula	Bandeja de plástico
2 Pipetas Pasteur	Secador de pelo
Varilla de vidrio	Pinzas
Micropipetas Blaubrand® 1-5 µL	Parafilm
Cromatofolios, DC-ALUGRAM® SIL G/UV ₂₅₄	
Algodón en rama	
Placa calefactora	
Agua destilada	
hexano	
Tolueno	
Acetato de etilo	
1,8-cineol (eucaliptol)	

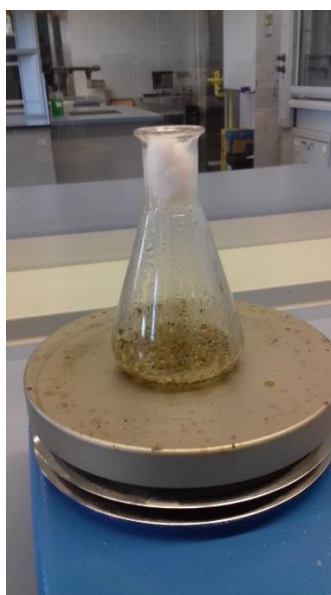
Método

1. Se pesan 0.5 g de hojas secas en un matraz Erlenmeyer de 100 mL. Se introducen 20 mL de agua destilada y en el enlenmeyer se introduce algodón en rama, sin compactar, de modo que ocupe toda la boca del Erlenmeyer. El algodón no debe compactarse para que al hervir el agua no sea expulsado. Se coloca el erlenmeyer sobre la placa calefactora de modo que el agua hierva suavemente durante 3-4 minutos.

Masa estimada de AE: $0.5 \text{ g} \times 2/100 = 0.01 \text{ g}$ (2% sería el rendimiento estimado de aceite esencial sobre planta seca)

Volumen final de extracto: 100 μL (aproximadamente): 2 gotas

[AE] = 0.1 mg/ μL



2. Se introduce el algodón en un vaso de precipitados con 2 mL de hexano y se remueve con la varilla de vidrio para que se produzca la extracción por el hexano del aceite esencial atrapado en el algodón. Se quita el algodón con las pinzas procurando escurrirlo contra las paredes del vaso de precipitados. Con una pipeta Pasteur se elimina la fase acuosa inferior y se añade una pequeña cantidad de sulfato de sodio anhidro de modo que la fase orgánica quede transparente. Se toma ésta con otra pipeta Pasteur filtrando a través de una pequeña cantidad de algodón en rama y se pasa a un vial de 5 mL que se deja abierto en la vitrina de gases hasta la total evaporación del éter (Este proceso puede realizarse más rápidamente calentando en un baño e agua a 70-80 °C, siempre en vitrina de gases, o mejor, mediante rotavapor, utilizando un matraz de 20 mL).
3. Al residuo seco, se añaden 2 gotas de tolueno y se cierra herméticamente sellando el vial con Parafilm. Este será el extracto que se utilizará en CCF.
4. Preparación de los patrones de 1,8-cineol y carvacrol. Se añade 1 gota de cada compuesto a sendos volúmenes de 1,5 mL de tolueno, guardando ambas disoluciones en viales de 5 mL. Suponiendo que ambos compuestos son el 50 % del aceite esencial, su concentración final sería de 0.05 mg/ μL .

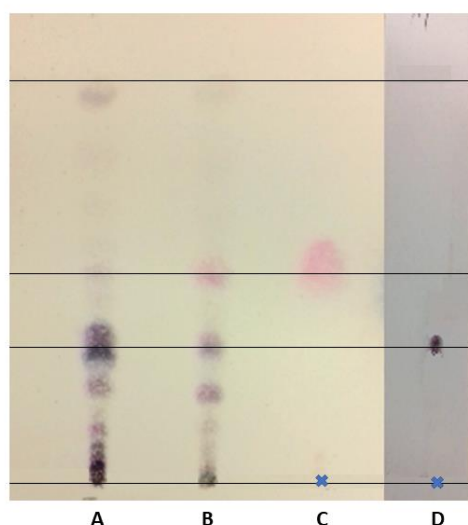
5. Cromatografía en capa fina. En un cromatofolio de 10 x 10 cm se marca con un lápiz una línea horizontal a 1 cm de uno de sus lados, marcando cuatro puntos equidistantes. Sobre ellos se introducen con un capilar mediante repetidas aplicaciones 10 μL de cada uno de los extractos. Al lado, 5 μL de disolución de carvacrol y 1 μL de la de 1,8-cineol.
6. Se introduce en la cubeta cromatográfica, en la que previamente se habrá añadido el eluyente: tolueno:acetato de etilo (93:7). Se desarrolla el cromatofolio hasta que el frente del eluyente esté aproximadamente a 1-2 cm de extremo superior.
7. Se saca con unas pinzas marcando rápidamente el frente del eluyente cosen un lápiz y se deja secar en vitrina de gases hasta la evaporación total del eluyente.
8. Se pulveriza con vainillina sulfúrica de modo uniforme y se deja secar unos minutos en la vitrina de gases. Posteriormente, se introduce la placa en estufa a 105 °C durante 3-4 minutos para observar, por la coloración adquirida, las manchas correspondientes (Un resultado similar puede obtenerse aplicando aire caliente con un secador de pelo)

Normas de seguridad

Es conveniente la utilización de guantes y gafas en todo el proceso experimental. Todas las operaciones que impliquen el manejo de hexano y tolueno se realizarán en vitrina de gases, así como la pulverización de los cromatofolios con vainillina sulfúrica. El frasco pulverizador debe lavarse con agua destilada inmediatamente después de su utilización.

Resultados

Comparando el desarrollo de los extractos con los patrones de carvacrol y 1,8-cineol puede verificarse cómo cada uno de los extractos se caracteriza por la presencia de uno de los citados compuestos.



A. *Thymus vulgaris*

B. *Thymus piperella*

C. Carvacrol. Disolución en tolueno 1:30 (V/V) 5 μL

D. 1,8 – cineol. Disolución en tolueno 1:30 (V/V) 1 μL

Eluyente: tolueno:acetato de etilo (93:7 V/V)
Fase estacionaria: cromatofolios DC-ALUGRAM® SIL G/UV₂₅₄
Revelador: vainillina 1% en disolución etanólica de ácido sulfúrico (10 %), con calentamiento posterior.

Ensayos de inhibición de la germinación in vitro en placas Petri

Estos ensayos se pueden realizar con placas Petri de diferentes tamaños. En este caso se va a explicar la metodología en el caso de utilizar placas Petri de 9 cm de diámetro. Se utilizará como sustrato papel de filtro, colocando 2 papeles de filtro (de espesor 50 g/m²) en la placa de abajo, y humedeciéndolo con 2 mL de agua. Dependiendo del tamaño de las semillas que queremos ensayar colocaremos 5, 10 o 20 semillas (para especies con semillas muy grandes, como las del género *Avena*, se deben utilizar 5, para especies de tamaño medio y bastante vigor como las del género *Echinochloa* y otras monocotiledóneas es recomendable colocar 5 o 10, y para especies de tamaño pequeño como las del género *Amaranthus* y *Portulaca* se pueden emplear 20). Una vez sembradas las semillas sobre el papel, distribuidas de modo uniforme, se colocarán otros 2 papeles de filtro cubriendo las semillas, que nuevamente se humedecerán con otros 2 mL de agua. El objetivo es que los papeles de filtro estén completamente humedecidos, pero sin exceso de agua en la placa Petri, lo que podría causar la aparición de hongos. En algunas especies monocotiledóneas o con semillas grandes es recomendable añadir 1 mL de agua más (5 mL en total). Para realizar el tratamiento con el aceite esencial se añadirán, con una pipeta, 4 µL de aceite esencial en el disco de la parte superior que está en contacto con las semillas. Una vez preparadas las placas se cerrarán con parafilm y se incubarán en cámara de germinación, si tenemos disponibilidad, o a temperatura ambiente, en caso de no disponer de ella. En algunas especies se pueden observar los efectos a los 3 días, en otras a los 5-7 días.

Ensayos de inhibición de la germinación en vasos de plástico

Para realizar estos ensayos se colocará en el fondo de un vasito de plástico previamente agujereado en la parte inferior para que haya algo de ventilación, algodón en rama humedecido con 5 mL de agua destilada. Sobre el algodón se pondrán 10 semillas, puede ser por ejemplo de algún cultivo como trigo, lentejas o soja. El vasito se cubrirá con la tapa de plástico y por la parte inferior colgaremos una torunda de algodón impregnada con 1 mL de aceite esencial, que podemos sujetar por medio de un alfiler. A las 144 h se pueden observar las diferencias en la germinación entre las semillas tratadas y las controles (con agua).

Ensayos in vitro de la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Thymus piperella* y *Thymus vulgaris* frente a *Botryotinia fuckeliana*

***Botryotinia fuckeliana* (De Bary) Whetzel**

Botryotinia fuckeliana es un patógeno vegetal que infecta a innumerables especies de plantas (polífago), causando la enfermedad conocida como moho gris. Esta especie es más conocida por el anamorfo, *Botrytis cinerea* Pers.

El género *Botrytis* cuenta con más de 20 especies, dentro de las cuales se encuentran *B. tulipae*, *B. squamosa* y *B. fabae*, que afectan al tulipán, cebolla y haba respectivamente.

B. cinerea es uno de los fitopatógenos fúngicos más importantes, debido a que se comporta como patógeno infectando a las plantas, pero también se comporta como saprófito ya que puede vivir sobre material vegetal senescente, muerto o previamente infectado por otros patógenos (Cardinale et al., 2016). Además, ocasiona grandes pérdidas en uva, tanto en el campo como después de la cosecha, así como en otros frutos como frambuesas, arándanos, moras y fresas. También causa el deterioro de manzanas, peras, tomates, frutas de hueso y kiwis (Pitt & Hocking, 2009).

En algunos países, especialmente en Francia y Alemania, se producen vinos botritizados muy apreciados por los consumidores, que se elaboran a partir de uvas infectadas por este hongo.

Descripción morfológica

Las colonias tienen un crecimiento micelial abundante, algodonoso y de color grisáceo, mientras que el crecimiento esclerocial es lento, con esclerocios de color negro distribuidos irregularmente en el medio (Figura1).

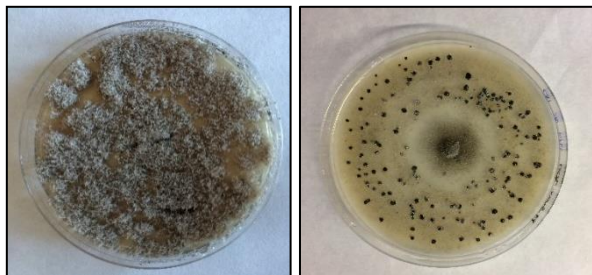


Figura 1. *Botryotinia fuckeliana* en medio PDA sin y con formación de esclerocios.



Figura 2. Conidioforos y conidios de *Botryotinia fuckeliana*.

Actividad antifúngica de los aceites esenciales sobre el crecimiento micelar. Velocidad de crecimiento.

Los aceites esenciales de *T. piperella* y *T. vulgaris* fueron disueltos, mezclados y homogeneizados por agitación en matraces con medio de cultivo PDA/Tween 20 (0.1%), previamente esterilizado, a la concentración de 300 µg/mL (6 gotas).

Una vez repartido el medio con aceite en placas Petri y solidificado, se deposita en el centro de las mismas, un disco de 8 mm de diámetro de la zona periférica de una colonia de 7 días de crecimiento de *B. fuckeliana*.

Las placas Petri control contenían únicamente PDA/Tween 20 (0.1%) y el hongo a estudiar. Se realizaron 5 repeticiones por aceite esencial estudiado y todas las placas se incubaron a 25°C durante 7 días.

El crecimiento micelar se midió a los 7 días, y para ello se midieron dos diámetros perpendiculares entre sí de la colonia. Finalmente se calcula la inhibición del crecimiento micelar utilizando la siguiente fórmula (Albuquerque et al., 2006):

$MGI = [(DC - DO) / DC] \times 100$, donde DC es la media del diámetro del crecimiento micelar de las placas control y DO es la media del diámetro de las colonias en placas tratadas con aceite esencial.

Del mismo modo que en los experimentos anteriores, puede accederse al protocolo experimental detallado a través del enlace citado en la introducción.

Resultados

En la tabla 1 se muestran los valores medios del diámetro del crecimiento de *B. fuckeliana* a los 7 días en los dos aceites estudiados y en el control. En la tabla 2, se indican los porcentajes de inhibición del crecimiento micelar de *B. fuckeliana* en los dos aceites estudiados

Tabla 1: Valores medios del diámetro de la colonia de *B. fuckeliana* crecida en PDA-control, PDA-*T.piperella* y PDA-*T. vulgaris*.

HONGO	Diámetro medio de la colonia (mm)		
	PDA-Control	PDA- <i>T. piperella</i> 300 µg/mL (DO)	PDA- <i>T. vulgaris</i> 300 µg/mL (DO)
<i>B. fuckeliana</i>	80.8	0	69.2

Tabla 2: Porcentaje de Inhibición del crecimiento micelial (MGI) de *B. fuckeliana* crecida en PDA-*T.piperella* y PDA-*T. vulgaris*.

MGI (%)	<i>T. piperella</i>	<i>T. vulgaris</i>
BF	100	14.4

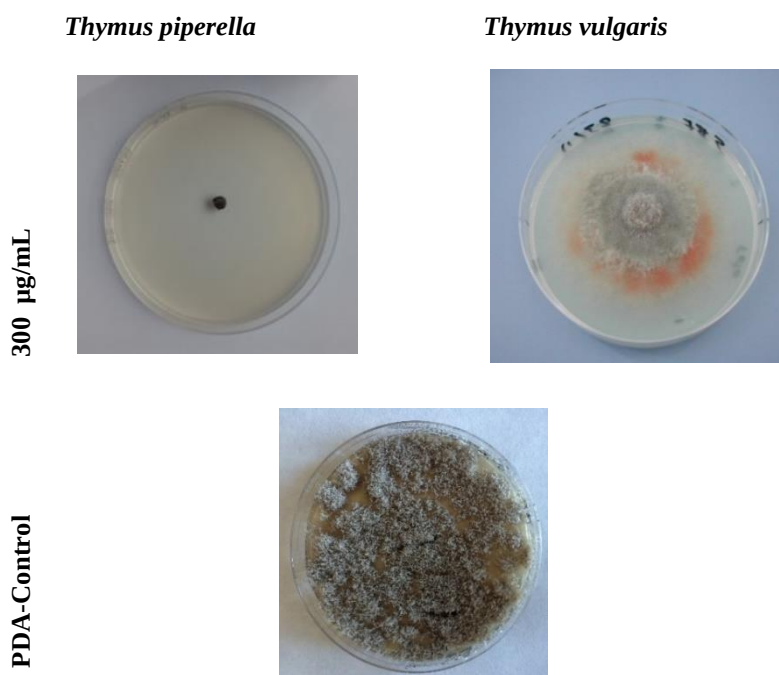


Figura 3: Crecimiento de *B. fuckeliana*, a los 7 días de incubación, en PDA-control, PDA-*T. piperella* (300 µg/mL) y PDA-*T. vulgaris* (300 µg/mL).

Los resultados obtenidos (En la Tabla 2 y Figura 3 se observa que, de los dos aceites esenciales ensayados, *T. piperella* y *T. vulgaris*, sólo el *T. piperella* tiene efecto antifúngico sobre a *B. fuckeliana*, con un 100 % de inhibición. Este aceite tiene como compuesto mayoritario el carvacrol, siendo este, por tanto, el responsable del poder antifúngico del mismo (Ruiz-Navajas et al., 2015)

Referencias

- Albuquerque C.C., Camara, T.R. R.D.R. Willadino y C. Ulises (2006). Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. Brazilian Archives of Biology and Technology, 49: 527-535.
- Cardinale, M., & Berg, G. (2016). Ecology and function of grape-associated microorganisms with a special focus on biocontrol of *Botrytis cinerea*. In S. Compant & F. Mathieu (Ed); Biocontrol of Major Grapevine Diseases: Leading Research, Chapter pp. 52-63
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). Fungi and food spoilage. New York: Springer
- Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Barber, X., Sendra, E., Pérez-Álvarez, J.A., & Fernández-López, J. (2015). Effect of chitosan edible films added with *Thymus moroderi* and *Thymus piperella* essential oil on shelf-life of cooked cured ham. Journal Food Science Technology, 52 (10), 6493–6501 DOI 10.1007/s13197-015-1733-3