

# **I. INTRODUCCIÓN**



## I. 1. CONCEPTO DE PLANTA AROMÁTICA.

Los organismos vegetales producen una gran diversidad de compuestos químicos, de los que sólo una parte se sintetiza en las rutas del *metabolismo primario*, a partir del cual se originan los componentes que intervienen en la fotosíntesis o el metabolismo respiratorio. El resto, que no son directamente esenciales para estos procesos, se forman siguiendo las vías del *metabolismo secundario*.

La habilidad para sintetizar compuestos secundarios ha sido seleccionada a través del curso de la evolución en función de las necesidades de cada planta: en la naturaleza, las plantas están expuestas a factores bióticos y abióticos con los cuales han co-evolucionado, y la presión ejercida por estos a lo largo del proceso evolutivo determina el desarrollo en los vegetales de rutas de biosíntesis a través de las cuales sintetizan y acumulan en sus órganos una gran variedad de metabolitos secundarios. Muchos de ellos desempeñan una importante función en las interacciones entre las plantas y el medio que las rodea. Por ejemplo, los aromas florales y los pigmentos se emplean para atraer polinizadores, principalmente insectos, que son capaces de distinguir entre mezclas complejas de fragancias (Dudareva y Pichersky, 2000); la síntesis de sustancias tóxicas (fitoalexinas) protege a la planta que las produce frente a patógenos y herbívoros (desde bacterias y hongos hasta insectos y mamíferos), o impide el crecimiento de las plantas vecinas (Bennet y Wallsgrove, 1994).

Los estudios acerca de la evolución y la ecología de los metabolitos secundarios han estado estrechamente unidos a causa del reconocimiento de que muchos de estos compuestos desempeñan distintas funciones ecológicas, en tanto que también muestran afinidades filogenéticas (Theis y Ler dau, 2003).

Las plantas sujetas a estrés a menudo acumulan estos metabolitos como respuesta a elicitores o señales moleculares originadas por la acción de microorganismos patógenos o un ambiente desfavorable, que la planta reconoce por medio de receptores presentes en la célula vegetal.

El reconocimiento de estos elicitores provoca una cascada de reacciones cuyo fin es activar los mecanismos de defensa de la planta ([www.biojournal.net](http://www.biojournal.net)). Sería interesante conocer las vías metabólicas que permiten pasar de una señal o elicitore a la producción y acumulación de metabolitos secundarios por parte de la planta, considerando que tales compuestos son fuente de productos farmacéuticos, aditivos alimentarios, perfumes, y otros materiales para la industria (Zhao *et al.*, 2005).

La manipulación genética de las rutas que conducen a la síntesis de estos productos naturales, con el fin de conseguir la mejora de la calidad las plantas o su resistencia a diferentes tipos de estrés, ha estado a menudo limitada por un escaso conocimiento acerca de su bioquímica, y por la necesidad de coordinar la regulación de múltiples actividades génicas (Dixon, 2005).

Así, aunque la mayoría de tales rutas aún no se conocen, posiblemente existen cientos de miles de enzimas diferentes implicadas en el metabolismo secundario de las plantas. En muchos casos, la síntesis de múltiples productos puede ser catalizada por una única enzima, bien a partir de diferentes sustratos o, más raramente, a partir del mismo sustrato. Sin embargo, en la mayoría de los casos que han sido investigados, las enzimas del metabolismo secundario de las plantas son específicas para un sustrato dado y generan un sólo producto (Pichersky y Gang, 2000).

Se estima que el genoma vegetal contiene entre 20.000 y 60.000 genes, y quizás entre un 15 y un 25% de esos genes están implicados en el metabolismo secundario. El genoma de una especie vegetal concreta codifica únicamente una pequeña fracción de todas las enzimas que

serían requeridas para sintetizar el conjunto completo de metabolitos secundarios encontrados en el Reino Vegetal.

Todo lo expuesto tiene relación con la presente memoria en lo que se refiere a la definición de planta aromática, medicinal y condimentaria, ya que estas plantas se caracterizan por la producción, a partir del metabolismo secundario, de una serie de componentes denominados *principios activos*, con aplicaciones en el campo de la medicina, industria aromática e industria alimentaria. Dichos componentes son la base para el control de rendimiento y calidad de productos cultivados y el principal criterio para su selección y mejora.

Se define como principio activo una sustancia contenida en un fármaco o preparado (magistral), por la cual dicho fármaco adquiere su propiedad medicinal.

En el caso de las plantas aromáticas, sus principios activos están constituidos, total o parcialmente, por *aceites esenciales* que confieren a la planta, a su extracto, o a los productos con los que se mezcle, un aroma agradable al olfato (Sotomayor, 1998).

Tradicionalmente se consideran principios activos tanto el aceite esencial como el componente fundamental y característico, en estado puro, extraído de dicho aceite o sintetizado.

Un elevado número de genes ampliamente distribuidos por el genoma de la planta controla la composición química de estos aceites esenciales (Echeverrigaray *et al.*, 2001).

Los olores florales, por otra parte, están determinados por una compleja mezcla de compuestos volátiles de bajo peso molecular, y la habilidad para producir y emitir tales olores es un rasgo evolutivo que algunas plantas pueden adquirir de forma relativamente sencilla, sin el desarrollo de glándulas especializadas, simplemente mediante la expresión, preferentemente en células epidérmicas, de determinadas enzimas implicadas en la biosíntesis de compuestos volátiles, lo que conduce a la producción de dichos compuestos sobre la superficie de

determinados órganos, facilitándose así su emisión a la atmósfera (Dudareva *et al.*, 1996). Se ha encontrado una correlación positiva entre la cantidad de ARNm transcrito a partir de los genes que codifican para estas enzimas, la cantidad de proteína y actividad enzimática, y la emisión del componente volátil correspondiente, por lo que los niveles de actividad de las proteínas que intervienen en la producción de volátiles estarían regulados principalmente por los niveles de ARNm de las células presentes en el órgano que emite tales compuestos (Dudareva y Pichersky, 2000).

El género ***Thymus***, cuyo nombre proviene del verbo griego *Thym* (perfumar), en alusión al intenso y agradable olor de la planta, se caracteriza por su gran riqueza en aceite esencial, por lo que este género se sitúa en el ámbito de las plantas aromáticas. Igualmente, dicho aceite, por la naturaleza de sus constituyentes químicos, puede ejercer un efecto beneficioso sobre la salud, lo cual nos permite también considerar a estas plantas como medicinales.

Es importante señalar que el gran valor estratégico de las plantas aromáticas, así como de las medicinales y condimentarias, está determinado por su *código genético*, el cual identifica una composición química concreta que representa un perfil farmacológico u organoléptico específico (Bandoni, 1994). Si bien puede verse afectada por las condiciones climáticas o edáficas, la composición química de un aceite esencial está determinada genéticamente (Morales, 1986). Esta es una importante razón para considerar primordial la protección de los recursos genéticos de estas plantas, en peligro por la explotación indiscriminada de la flora silvestre.

## I. 2. TAXONOMÍA DEL GÉNERO *THYMUS*.

En taxonomía, el género o el subgénero complejos pueden dividirse en secciones. Por lo tanto, la sección corresponde a una jerarquía taxonómica situada entre género o subgénero y especie (Font Quer, 1982), siendo grupos de especies que se establecen por la presencia de ciertos caracteres comunes, no teniendo estos grupos la suficiente entidad para ser considerados géneros.

El género *Thymus* se divide en siete Secciones, según el siguiente esquema (Morales, 1986):

### I. Sección **Mastichina** (Miller) Benth.

1. *Th. mastichina* (L.) L.  
    subsp. *mastichina*.  
    subsp. *donyanae* R. Morales.
2. *Th. albicans* Hoffmanns. & Link.

### II. Sección **Micantes** Velen.

3. *Th. caespititius* Brot.

### III. Sección **Piperella** Willk.

4. *Th. piperella* L.

### IV. Sección **Pseudothymbra** Benth.

#### a) Subsec. **Pseudothymbra** (Benth.) R. Morales.

5. *Th. lotocephalus* G. López & R. Morales.
6. *Th. villosus* L.  
    subsp. *villosus*.

subsp. *lusitanicus* (Boiss.) Coutinho.

7. *Th. longiflorus* Boiss.
8. *Th. membranaceus* Boiss.
9. *Th. moroderi* Pau ex Martínez.
10. *Th. funkii* Cosson.

b) Subsec. **Anomali** (Rouy) R. Morales.

11. *Th. antoninae* Rouy & Coincy.

## V. Sección **Thymus**.

a) Subsec. **Thymastra** (Nyman ex Velen.) R. Morales.

12. *Th. capitellatus* Hoffmanns. & Link.
13. *Th. camphoratus* Hoffmanns. & Link.

b) Subsec. **Thymus**.

14. *Th. carnosus* Boiss.
15. *Th. vulgaris* L.
  - subsp. *vulgaris*.
  - subsp. *aestivus* (Willk.) O. Bolós & A. Bolós.
16. *Th. orospedanus* Huguet del Villar.
17. *Th. hyemalis* Lange.
18. *Th. zygis* Loefl. ex L.
  - subsp. *zygis*.
  - subsp. *gracilis* (Boiss.) R. Morales.
  - subsp. *sylvestris* (Hoffmanns. & Link) Brot. ex Coutinho.
19. *Th. baeticus* Boiss. ex Lacaíta.
20. *Th. willdenowii* Boiss.
21. *Th. loscosii* Willk.

22. *Th. serpylloides* Bory.  
    subsp. *serpylloides*.  
    subsp. *gadorensis* (Pau) Jalas.

VI. Sección **Hyphodromi** (A. Kerner) Halácsy.

23. *Th. mastigophorus* Lacaita.  
24. *Th. lacitae* Pau.  
25. *Th. granatensis* Boiss.  
    subsp. *granatensis*.  
    subsp. *micranthus* (Willk.) O. Bolós & Vigo.  
26. *Th. leptophyllus* Lange.  
    subsp. *leptophyllus*.  
    subsp. *pau* R. Morales.  
27. *Th. bracteatus* Lange ex Cutanda.  
28. *Th. fontqueri* (Jalas) Molero & Rovira.

VII. Sección **Serpyllum** (Millar) Benth.

- a) Subsec. **Insulares**.  
  
b) Subsec. **Pseudopiperellae**.  
  
c) Subsec. **Kotschyani**.  
  
d) Subsec. **Isolepides**.  
  
e) Subsec. **Alternantes**.

29. *Th. pulegioides* L.

- f) Subsec. **Pseudomarginati**.

g) Subsec. **Serpyllum**.

En el presente trabajo se ensayan tres especies de la Subsección *Thymus*: *Th. hyemalis*, *Th. zygis* subsp. *gracilis* y *Th. vulgaris*.

**I. 3. CARACTERIZACIÓN BOTÁNICA DEL GÉNERO THYMUS.**

Este género, perteneciente a la familia *Labiatae* o *Lamiaceae*, comprende plantas típicamente mediterráneas, adaptadas a períodos de sequía y pluviosidad alternantes. En los períodos más secos suelen perder las hojas como mecanismo para protegerse de la pérdida de agua.

Son en su mayoría plantas heliófilas y pioneras, que colonizan rápidamente los lugares abiertos y desprovistos de vegetación, como matorrales quemados, barbechos o cultivos abandonados, presentando por ello un papel fundamental en las primeras fases de desarrollo de los matorrales mediterráneos, llamados frecuentemente tomillares. Esta capacidad de colonización se debe en parte al rápido crecimiento de estas plantas, que en algunos casos pueden alcanzar casi el tamaño adulto durante su primer año de vida (Morales, 1986).

En cuanto a su **morfología**, el género *Thymus* presenta un sistema radicular con una raíz principal leñosa con bastantes raíces secundarias. Las raíces de estas plantas no suelen tener una gran extensión, por lo que arrancarlas del suelo no resulta especialmente complicado en la mayor parte de los casos. Por ello, tradicionalmente, los tomillos silvestres se recolectan de esta forma, con todos los inconvenientes ecológicos y comerciales que acompañan a una práctica de este tipo.

El tallo de estas plantas es más o menos leñoso, variando desde erecto hasta prostrado y radicante. Posee numerosas ramas leñosas, erectas, compactas, parduscas o blanco aterciopeladas. Suelen ser

arbustos de unos 30–40 cm, aunque en algunos casos pueden alcanzar lo 80 cm.

Las hojas son opuestas, simples, enteras, generalmente alargadas, y varían en forma, tamaño, pilosidad, presencia de cilios en su borde y glándulas esenciales esferoidales en su superficie. Su tamaño oscila entre 4 y 10 mm de longitud. En la Península Ibérica, los tomillos suelen presentar las hojas con los bordes revueltos hacia el envés, resultando hojas lineares si éstas eran estrechas (Figura I-1). De esta forma, la superficie expuesta a la pérdida de agua y a la gran insolación, condiciones características del clima en el que viven estas plantas, es menor. Las glándulas esenciales que aparecen sobre estas hojas, donde se almacena el aceite, tienen un tamaño aproximado de 0,1–0,2 mm (Morales, 1986).

a)



b)



Fig. I-1. Detalle de fragmento de tallo (a) y envés de hoja (b) de *Th. vulgaris*. En la hoja se aprecian las glándulas productoras de aceite esencial.

Respecto a la distribución de dichas glándulas, Letchamo y Gosselin (1996), trabajando con plantas de *Th. vulgaris* en Canadá, determinan que el número de estas estructuras es mayor en el envés que en haz de las hojas.

Al ser plantas que viven expuestas al sol, los tomillos tienen muy frecuentemente todos sus órganos cubiertos de pelos (Figura I-2), a veces blanquecinos, para evitar la transpiración y reflejar la luz intensa (Morales, 1989).



Fig. I-2. Detalle de glándulas esenciales y estructuras pilosas en *Th. hyemalis*.

La floración de la mayoría de las especies de este género tiene lugar en primavera, principalmente durante los meses de mayo y junio.

Las flores se suelen agrupar en inflorescencias globosas. Muestran un cáliz bilabiado, con cinco dientes. El labio superior consta generalmente de tres dientes cortos, normalmente ciliados en sus bordes. El diente central puede ser igual o de mayor tamaño que los laterales. El labio inferior presenta dos dientes largos iguales. El tamaño total del cáliz varía entre 3 y 8 mm aproximadamente, y es la estructura que más caracteriza al género *Thymus* (Figura I-3).

La corola está formada por un tubo con dos labios en su extremo, de entre 2 y 18 mm de longitud. El labio superior está formado por dos lóbulos poco diferenciados y en el labio inferior aparecen tres lóbulos generalmente iguales. El color varía entre blanco, crema, rosa o púrpura (Morales, 1986).

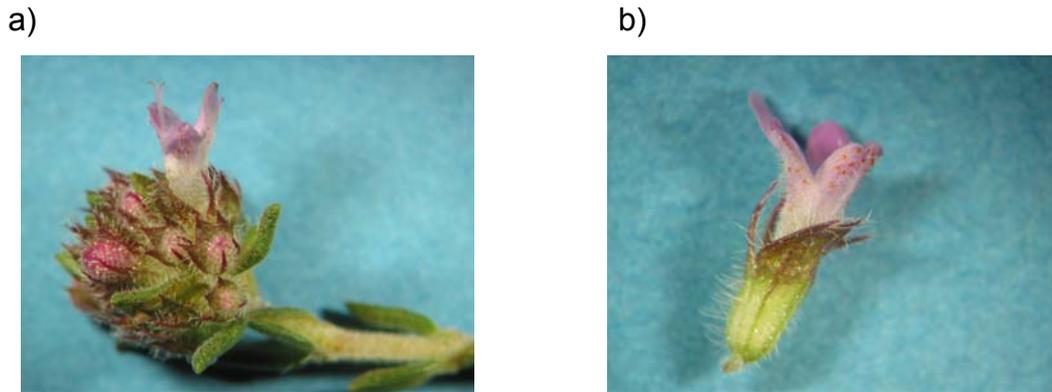


Fig. I-3. Detalle de inflorescencia (a) y flor (b) de *Th. hyemalis*.

Estas plantas presentan cuatro estambres que sobresalen de la corola, y ovario súpero tetralocular y tetraovulado. El fruto es un tetraquenio de color marrón.

La mayor parte de las especies del género *Thymus* presentan *ginodioecia*, modalidad de la poligamia en la que unos pies de planta tienen flores hermafroditas mientras otros poseen flores femeninas. Cuando en las flores hermafroditas los estambres y el pistilo no llegan a la madurez al mismo tiempo, a este fenómeno se le conoce como *dicogamia*. Así pues, las flores son morfológicamente hermafroditas, pero funcionalmente unisexuales (Font Quer, 1982). La finalidad de la dicogamia es evitar la autofecundación. Se suele presentar en plantas de polinización entomófila, con escasa producción de polen, como es el caso de los tomillos, pero su eficacia es limitada si se prolonga la floración. Por ello en las poblaciones de estas plantas aparece un porcentaje variable de individuos con flores femeninas, asegurando así la fecundación cruzada (Morales, 1986).

La **polinización**, como se menciona anteriormente, es llevada a cabo por insectos, principalmente abejas, por lo que los tomillos tienen gran importancia como plantas melíferas. Hormigas, himenópteros, dípteros (mosquitos) y ácaros (arácnidos) también polinizan este género. Es igualmente frecuente la presencia de coleópteros coccinélidos,

especialmente *Coccinella septempunctata*, insectos que se alimentan básicamente de pulgones, por lo que llevan a cabo una labor beneficiosa para la planta.

Por último, resulta interesante mencionar algunas **plagas** que pueden afectar a estas plantas. En este sentido, la infección más común es la causada por áfidos, parásitos que se pueden combatir con los productos recomendados en lucha ecológica. Los áfidos o pulgones ocasionan a las plantas daños directos e indirectos. Los primeros se producen por tratarse de insectos chupadores, que se alimentan principalmente sobre el floema. Las ninfas y los adultos extraen nutrientes de la planta y alteran el balance de las hormonas del crecimiento, lo que origina debilitamiento y detención del desarrollo de los individuos afectados. Si el ataque es muy severo, se puede llegar a secar la planta. Los áfidos también pueden causar daños indirectos, al actuar como vectores de virus fitopatógenos (Bellardi y Rubies-Autonell, 2001). Uno de estos áfidos es *Aphis viburnii*, que ataca principalmente a *Thymus vulgaris*.

Sobre los tomillos es posible encontrar plantas herbáceas parásitas del género *Cuscuta*, como *C. epithymum*, cuya presencia es relativamente frecuente en la naturaleza. Estas plantas presentan tallos filiformes que se fijan por medio de haustorios sobre los troncos de distintas fanerógamas, penetrando en los tejidos de la planta hospedante. Es muy difícil desinfectar un campo atacado por cuscuta, ya que estas plantas se deben eliminar manualmente, por lo que cuando se detecta su presencia sobre algún individuo en un cultivo, lo más aconsejable es arrancar las plantas afectadas para evitar que se propague la infección.

Igualmente, se han encontrado tomillos con malformaciones en el tallo que originan un hacinamiento de las hojas, enfermedad producida por el ácaro *Eriophites thomasi*. Esto es frecuente en *Thymus zygis*, y parece que las plantas afectadas son aquellas que no contienen timol ni carvacrol en su aceite esencial, sirviendo por lo tanto estos componentes como protección frente a este tipo de infecciones (Morales, 1986).

Este género es también sensible a enfermedades radiculares causadas, por ejemplo, por nemátodos fitófagos.

### **I. 3. 1. Distribución geográfica.**

Las regiones del oeste del Mediterráneo parecen ser el centro del origen de este género, que alcanzó un gran éxito evolutivo debido al predominio cada vez mayor de períodos de aridez, condiciones a las que estas plantas están bien adaptadas (Morales, 1986).

La desaparición del bosque, consecuencia sobre todo de la acción humana, ha influido en su gran extensión actual. Las tierras que quedan libres de vegetación, como ocurre, por ejemplo, tras un incendio, son colonizadas en etapas sucesivas por nuevas plantas, pudiendo llegar a recuperarse el bosque si se dan las condiciones adecuadas. Esto explica que los tomillos, que solían vivir en terrenos marginales, hayan podido colonizar hoy grandes extensiones libres de otras plantas. Pero este género no siempre aparece como una etapa de sustitución de otro tipo de vegetación. En ciertos hábitats, sobre todo en zonas áridas, estas plantas parecen ser la vegetación óptima en la actualidad, presentándose como formaciones maduras.

En general, los tomillares cumplen una importante función como asociaciones vegetales pioneras fijadoras del suelo, después de incendios forestales o en márgenes de carreteras u otras vías de comunicación y en terrenos removidos (Morales, 1989). El tomillo es, por lo tanto, de una importancia trascendental para la recolonización de terrenos erosionados.

Centrándonos en su distribución actual, el género *Thymus* está compuesto por alrededor de 150 especies que se extienden por Europa, Asia, parte de África y Groenlandia (Figura I-4). Se ha diversificado extraordinariamente en la Península Ibérica, donde aparecen numerosas especies endémicas.

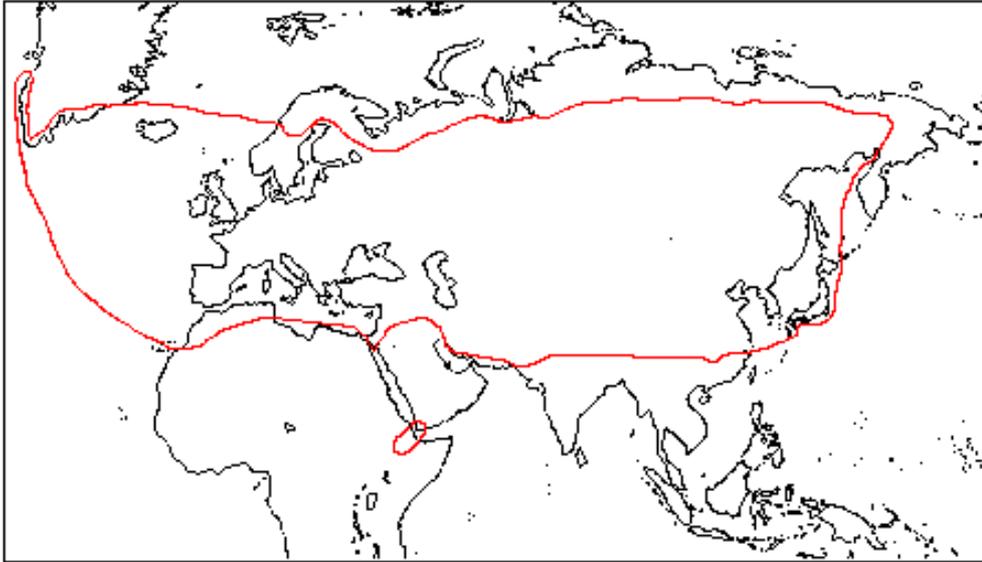


Fig. 1-4. Distribución geográfica del género *Thymus* (Morales, 1986).

La mayoría de estas plantas se circunscriben geográficamente a la región mediterránea, pudiendo soportar etapas de sequía acusada durante la época estival, así como los inviernos fríos propios de los climas mediterráneos continentales.

El punto más occidental de la zona circummediterránea de distribución de este género se sitúa en las Islas Azores, y el límite oriental sería el margen este del Mar Negro. Dentro de este área los núcleos más importantes son la Península Ibérica y el noroeste de África en el Mediterráneo occidental, y la Península Balcánica y Turquía en el oriental (Morales, 1986).

Además de las zonas colonizadas espontáneamente por este género, se han introducido poblaciones, que ahora crecen en estado silvestre, en Estados Unidos, Canadá, Chile, Australia o Nueva Zelanda, lo que amplía su área de distribución.

Los tomillos son plantas que no toleran la excesiva humedad ambiental ni edáfica, por lo que están adaptados perfectamente a las condiciones semiáridas del Sudeste Ibérico (Sotomayor, 1998).

#### **I. 4. CARACTERÍSTICAS DEL ACEITE ESENCIAL.**

Las plantas medicinales y aromáticas sintetizan y acumulan aceites en estructuras glandulares que pueden estar distribuidas por toda la parte aérea de la planta, aunque esta distribución no es uniforme, ya que generalmente se suelen encontrar en hojas y flores.

En algunos casos, por ejemplo, las flores pueden poseer un número más elevado de estas células secretoras que el resto de la planta (Miguel *et al.*, 2005), por lo que el rendimiento del aceite esencial puede variar si se obtiene destilando separadamente flores, tallos y hojas.

Además, la capacidad secretora de estas glándulas depende de la etapa de desarrollo de las plantas, siendo por lo tanto el estado fenológico un factor determinante en la producción de estos aceites (Cabo *et al.*, 1987; Jordán *et al.*, 2006), producción que también puede verse afectada por las condiciones ambientales.

En general, los aceites esenciales son productos formados por la mezcla de numerosas sustancias, con una composición química bastante compleja, obtenidos a partir del metabolismo secundario de las plantas. Son lípidos simples sin ácidos grasos, y están compuestos por sustancias volátiles, a diferencia de los aceites fijos, que contienen ácidos grasos como componentes estructurales fundamentales, y no son volátiles (Sotomayor, 1998).

El número de compuestos volátiles diferentes que aparecen en las plantas es muy elevado pero, sin embargo, estos constituyentes son biosintetizados por un número relativamente pequeño de rutas metabólicas, a menudo solapadas. En general, la mayor parte de estas sustancias volátiles derivan de tres clases principales de compuestos: terpenoides, fenilpropanoides/benzenoides, y derivados de ácidos grasos (Vainstein *et al.* 2001).

Estos aceites pueden actuar como agentes alelopáticos, al ser liberados por la planta que los produce y actuar sobre las plantas vecinas impidiendo su crecimiento.

En este sentido, Angelini *et al.* (2003), llevan a cabo un trabajo sobre inhibición de la germinación de malas hierbas por medio de aceites esenciales de distintas plantas, entre las que se encuentra *Thymus vulgaris*. Como resaltan estos autores, el uso continuado de herbicidas sintéticos puede amenazar la producción agrícola y causar problemas ecológicos y medioambientales. La alelopatía ofrece una alternativa biológica al tratamiento de las malas hierbas a través de la producción y liberación de sustancias aleloquímicas por parte de las plantas. En este trabajo se ensayan plantas de tomillo con un 44,1% de timol, comprobándose que la actividad alelopática del aceite esencial de tomillo es elevada, aunque poco selectiva. Cuando se analiza la actividad de los constituyentes de los aceites por separado, los investigadores constatan que tanto el timol como su isómero carvacrol ejercen también un efecto inhibitorio sobre la germinación de la mayor parte de las plantas tratadas en este estudio, y muestran un comportamiento más selectivo.

La presencia de aceites esenciales en estas plantas también se puede explicar como método de defensa frente a la pérdida de agua, teniendo en cuenta los ambientes cálidos y secos en los que suelen vivir los tomillos. A consecuencia de las altas temperaturas, las glándulas esenciales se rompen y liberan los aceites de su interior, que se evaporan y producen un ambiente alrededor de la planta con aire saturado por estas sustancias, lo que impide que se produzca evapotranspiración (Morales, 1989).

El género *Thymus* presenta una gran riqueza en aceite esencial y una alta variabilidad intraespecífica que afecta tanto al rendimiento en aceite como a su composición química. Es interesante señalar la facilidad de hibridación que tiene lugar entre distintas especies de tomillo cuando existe proximidad geográfica y sus períodos de floración coinciden,

incluso teniendo diferente número de cromosomas, lo que prueba las afinidades genéticas que existen entre estas plantas. La formación de híbridos incrementa la variabilidad que podemos encontrar en el aceite esencial.

A pesar de ser sustancias con una composición química muy heterogénea, los aceites esenciales presentan ciertas propiedades en común, entre las que se encuentran las que aparecen en la Tabla I-1.

Tabla I-1. Propiedades del aceite esencial.

Aroma intenso
Generalmente líquidos a temperatura ambiente
Volátiles, a diferencia de los aceites fijos
Generalmente incoloros o con tonalidad amarillenta
Fácilmente oxidables.
Su densidad relativa oscila entre 0,84 y 1,18, siendo la gran mayoría de estas sustancias menos densas que el agua.
Tienen un índice de refracción elevado y suelen presentar actividad óptica.
Punto de ebullición relativamente alto, situado entre 150 y 300 °C.
Insolubles en agua, y fácilmente solubles en disolventes orgánicos

Fuente: Biblioteca digital de la Universidad de Chile (<http://www.uchile.cl>)

#### I. 4. 1. Definición de calidad.

Se define calidad como “grado en el que un conjunto de características inherentes cumple con los requisitos” (UNE-EN ISO 9000:2000).

En el caso de los aceites esenciales, la calidad viene determinada por su composición química, ya que de ella dependen las propiedades que se atribuyen a estas sustancias.

Los aceites más demandados actualmente son aquellos que presentan compuestos fenólicos como constituyentes mayoritarios, siendo el timol y su isómero carvacrol los componentes definatorios de calidad en tomillo. La cantidad relativa de ambos compuestos, especialmente timol, es la característica que más valoran los compradores, aunque dado el efecto sinérgico que parece existir entre determinados constituyentes de estos aceites (Ultee *et al.*, 2000), una cantidad excesivamente alta de un único componente tampoco es deseable.

La normativa legal, a través de las normas ISO o UNE, establece las especificaciones que debe reunir el perfil cromatográfico del aceite esencial de algunas especies del género *Thymus*, entre las que se encuentra el tomillo rojo español o *Th. zygis*, tipo timol (UNE 84303. Tabla I-2).

Para *Th. vulgaris* y *Th. hyemalis*, las otras dos especies objeto de esta Tesis, no existen normas legales que regularicen la composición química de sus aceites. No obstante, en el caso de *Th. vulgaris* pueden adoptarse criterios similares a los aplicados a *Th. zygis*; *Th. hyemalis* es una especie con una gran diversidad de quimiotipos, siendo las plantas ricas en timol las más apreciadas, si bien el contenido fenólico que presenta esta labiada no suele ser tan alto como el encontrado en las otras dos especies.

Tabla I-2. Normativa UNE 84303 para el aceite esencial de *Th. zygis*, tipo timol.

<b>Componentes</b>	<b>% Mínimo</b>	<b>% Máximo</b>
$\alpha$ -Tujeno	0,2	1,5
$\alpha$ -Pinoeno	0,5	2,5
Mirceno	1	2,5
p-Cimeno	14	28
Limoneno	0,2	3,5
$\gamma$ -Yerpineno	4	11
Linalol	3	6,5
Terpinen-4-ol	0,1	2,5
Metilcarvacrol	0,1	1,5
$\beta$ -Cariofileno	0,5	2
Timol	37	55
Carvacrol	0,5	5,5

#### I. 4. 2. Métodos de extracción.

El aceite esencial que sintetizan las distintas especies aromáticas puede ser obtenido por diferentes métodos, pudiendo verse afectados tanto el rendimiento como la composición de dicho aceite en función del sistema de extracción empleado (Scheffer, 1993; Sotomayor *et al.*, 2001). Los métodos más usados con este fin son la hidrodestilación, la extracción con disolvente y la destilación-extracción simultáneas, aunque nuevos métodos se han venido desarrollando para recuperar los compuestos de interés, intentando no producir alteraciones de los mismos ni introducir contaminantes o desarrollar artefactos que puedan interferir en el posterior análisis, como es el caso de técnicas tales como la extracción con fluidos supercríticos y el uso de microondas.

Es considerando esta variedad de métodos y la diversidad de resultados donde se debe encuadrar la aplicación más adecuada en cada

caso para que resulte lo más representativo de la composición en la muestra en estudio (Jordán, 1999).

### **A) Destilación.**

Esta técnica, basada en la volatilidad de los aceites esenciales, es la más usada para la separación de tales sustancias, tanto a nivel industrial como de laboratorio.

Los avances en esta técnica de extracción a lo largo del siglo XX han permitido que actualmente los aceites esenciales sean considerados como materias primas para la industria. Su mezcla de constituyentes puede ser separada y los componentes individuales usados como elementos esenciales para introducir un aroma particular a un producto (New Zealand Institute for Crop and Food Research, <http://www.crop.cri.nz>).

Se distingue:

A. 1) *Destilación con agua o hidrodestilación.* La planta está sumergida en agua dentro de un recipiente o destilador que se calienta directamente hasta ebullición. Este proceso puede durar algunas horas.

A. 2) *Destilación en corriente de vapor.* El material vegetal se sitúa en un destilador a través del cual se hace pasar vapor de agua generado en otro recipiente, sin que exista contacto entre la planta y el agua hirviendo. Masango (2005) diseña una técnica que permite determinar el mínimo flujo de vapor requerido para una masa vegetal dada, de forma que se necesita una menor cantidad de agua para la destilación. Con esta mínima cantidad de vapor pasando a través del material vegetal, se reduce la pérdida de compuestos polares solubles en agua.

A. 3) *Destilación mixta*. El vapor se produce en el mismo recipiente en el que se encuentra la planta, sostenida sobre el nivel del agua por una rejilla metálica.

En los tres casos, los productos volátiles son arrastrados por el vapor de agua hacia un refrigerante donde ambos, aceite y vapor de agua, se condensan. Estos aceites tienen una densidad menor a la del agua, por lo que quedan depositados sobre ella, pudiendo ser separadas ambas sustancias tras la destilación.

### **B) Extracción con disolvente (SE).**

Procedimiento basado en el coeficiente de distribución favorable entre el disolvente y la muestra en estudio (Jordán, 1999).

El disolvente se selecciona en función de los componentes que interesa extraer. En el caso del aceite esencial, se suelen emplear solventes tales como éter etílico, éter de petróleo, hexano, benceno o diclorometano. Estas sustancias deben ser eliminadas posteriormente.

### **C) Destilación-Extracción simultáneas (SDE).**

Con el objeto de minimizar las alteraciones que puedan sufrir los constituyentes del aceite debido al calor generado con la destilación, se han desarrollado técnicas como la SDE, que ha experimentado mejoras dirigidas a reducir tales daños térmicos.

En esta técnica, la muestra se sitúa en agua dentro de un matraz conectado a un sistema de refrigeración. Frente a él, otro matraz conteniendo el disolvente se conecta al mismo sistema. Los matraces se calientan por separado y los vapores de agua y de disolvente condensan juntos en la sección central de refrigeración. Como consecuencia, las fases de agua y disolvente inmiscibles quedan separadas en la sección en forma de U, recirculando cada fase a su respectivo matraz (Likens y

Nickerson, 1964). El resultado es una destilación continua que sólo requiere un pequeño volumen de disolvente para la extracción de muestras incluso de cierto tamaño.

Una modificación de este sistema se debe a Maarse y Kepner (1970), los cuales aplican una trampa de vacío para evitar la prematura condensación del vapor, y un condensador de hielo seco para evitar las pérdidas del disolvente. En 1974, Römer y Renner aplican un generador de vapor externo al equipo original.

Buttery *et al.* (1976) emplean este sistema trabajando presión reducida, lo cual minimiza la degradación y aparición de componentes extraños que sufre el producto al someterlo a las elevadas temperaturas que requiere la técnica cuando trabaja a presión atmosférica, tal como fue diseñada originalmente.

#### **D) Extracción con fluidos supercríticos (SFE).**

Este es un caso particular de la técnica de extracción con disolvente mencionada anteriormente. En este caso, se emplea como disolvente un fluido supercrítico.

Fluido supercrítico es aquel que se encuentra sometido a condiciones por encima de su presión y temperatura críticas. En este estado, el fluido tiene propiedades intermedias entre las de un líquido y un gas. La cualidad más característica de los fluidos supercríticos es el amplio rango de altas densidades que pueden adoptar dependiendo de las condiciones de presión y/o temperatura, con lo que estos fluidos presentan la capacidad de modular su poder solvatante, directamente relacionado con su densidad, en función de tales condiciones.

De esta forma, los fluidos supercríticos se convierten en disolventes ideales, lo que les permite ser empleados, entre otras aplicaciones, en la extracción de productos naturales, ya que esta técnica no deja residuos, se obtienen extractos de alta pureza y no requiere altas

temperaturas, lo que es especialmente importante cuando se extraen compuestos termolábiles.

El fluido más utilizado en este método es el CO<sub>2</sub>, gas de baja toxicidad, abundante y de coste reducido.

El proceso de extracción sería el siguiente: en un reactor se introduce el sustrato original y una cantidad de CO<sub>2</sub>. El sistema se presuriza hasta alcanzar condiciones supercríticas, con lo que el CO<sub>2</sub> disuelve los compuestos a extraer. A continuación, se transfiere el fluido a otro reactor donde se despresuriza la mezcla, provocando la liberación del soluto y la eliminación del CO<sub>2</sub> como gas, con lo que no quedan residuos en el extracto, el cual tendrá una mayor pureza. La SFE presenta además un mejor rendimiento que otros procedimientos de extracción, ya que el soluto, una vez extraído, se recupera totalmente al ser insoluble en el gas. (Instituto de Ciencia de Materiales de Barcelona – CSIC: <http://www.icmab.es>).

### **E) Microondas.**

La extracción del aceite esencial se realiza en un reactor de microondas, de forma rápida, sin el empleo de agua ni disolventes. Se trata de un proceso de destilación acelerada, que al no emplear agua evita las transformaciones que pueden sufrir los componentes de estos aceites al estar en contacto prolongado con agua hirviendo.

Las microondas generadas provocan un calentamiento de las moléculas de agua del interior del material vegetal, dilatando y provocando la rotura de las glándulas que contienen el aceite, liberándose éste. En el exterior del microondas se encuentra el refrigerante, donde se condensan los productos destilados. Finalmente, se separa el aceite de la fase acuosa por decantación. La destilación completa puede realizarse en unos 30 min, consiguiéndose unos resultados en cuanto a rendimiento y composición del aceite esencial similares a los obtenidos por

hidrodestilación (Fuente: DryDist. Labstation for Rapid Solvent Free Microwave Extraction (SFME) of essential oils).

Numerosas publicaciones analizan los efectos de los diferentes métodos de extracción sobre el rendimiento y la composición del aceite esencial.

Hawthorne *et al.* (1993), comparando hidrodestilación y extracción con fluidos supercríticos, comprueban que la velocidad de extracción con CO<sub>2</sub> puro es relativamente lenta (recuperación del 80% tras 90 min), pero una extracción estática usando cloruro de metileno como modificador durante 15 min, seguida de la extracción dinámica con CO<sub>2</sub> durante otros 15 min, proporciona los mismos resultados conseguidos con 4 horas de hidrodestilación. La SFE también recupera algunos compuestos orgánicos que no se extraen con hidrodestilación.

Moldão-Martins *et al.* (2002) determinan, en plantas de *Th. zygis* subsp. *sylvestris*, una composición cuantitativa diferente en función del procedimiento empleado para la extracción de los compuestos volátiles, siendo los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación más ricos en  $\gamma$ -terpineno, geraniol y timol, en tanto que la SFE proporciona extractos con mayor presencia de p-cimeno y  $\beta$ -cariofileno.

Lemberkovics *et al.* (2003) contrastan la composición de aceites extraídos por destilación con vapor con fracciones volátiles obtenidas con SFE, observando que estas últimas son más ricas en ésteres y más pobres en alcoholes. Por otra parte, con SFE se alcanzan mayores porcentajes de sesquiterpenos que en los aceites destilados.

Con extractos volátiles de *Th. vulgaris* obtenidos por destilación-extracción simultánea y por extracción supercrítica, Díaz-Maroto *et al.* (2005) observan que timol y p-cimeno, los compuestos más abundantes en tomillo, se obtienen generalmente en mayor cantidad con SDE.

Por su parte, Lucchesi *et al.* (2004), comprueban con diferentes plantas, entre las que se encuentra el tomillo, que el rendimiento en aceite esencial extraído con el empleo de microondas (SFME) durante 30 minutos es similar al que se obtiene con hidrodestilación en cuatro horas. Además, con SFME, los aceites muestran cantidades más elevadas de compuestos oxigenados y concentraciones más bajas de monoterpenos, en comparación con los resultados proporcionados por la hidrodestilación.

## **I. 5. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL EN EL GÉNERO *THYMUS*.**

En los últimos años, con el desarrollo de las técnicas de análisis instrumental, se han realizado numerosos estudios acerca de la composición cualitativa y cuantitativa de los aceites esenciales de las plantas aromáticas. Las plantas producen metabolitos secundarios característicos, y en los aceites encontramos estos productos en distintas proporciones, siendo este hecho determinante para establecer sus diversas aplicaciones. Los análisis cromatográficos practicados a dichos aceites han permitido encontrar especies cuyos individuos son morfológicamente idénticos y que, sin embargo, presentan diferencias en la composición química de sus aceites esenciales, manteniéndose estas diferencias en el tiempo y en diferentes condiciones ecológico-climáticas. La *Cromatografía de Gases* con columnas capilares es la técnica que se emplea habitualmente para analizar tales sustancias, siendo necesario completar estos estudios con análisis por *Espectrometría de Masas*, para obtener una identificación rigurosa de los componentes. En base a los caracteres químicos determinados en estos aceites se desarrolla una clasificación denominada *quimiotaxonomía*, y a los taxones químicos o variedades de plantas establecidos desde el punto de vista de la composición química de su aceite esencial, se les llama *quimiotipos*.

El aceite esencial de una planta contiene componentes que se encuentran en concentraciones elevadas y otros que aparecen de forma

minoritaria, siendo los componentes mayoritarios los que confieren el quimiotipo. Cuando aparece un único componente en cantidad significativamente superior al resto, se habla de *quimiotipo simple*. Los *quimiotipos mixtos* son aquellos que presentan concentraciones importantes de más de un constituyente (Sotomayor, 1998).

El género *Thymus* presenta un elevado polimorfismo químico, con componentes que varían de una especie a otra y también, como se ha dicho, dentro de una misma especie. Este polimorfismo está motivado por factores genéticos y ambientales, siendo responsables los primeros de las características químicas de estos aceites, determinando su quimiotipo, y pudiendo influir los segundos, relativamente, en su composición cuantitativa.

Además de los factores ambientales, hay otros parámetros externos que pueden afectar al perfil volátil de un aceite esencial, tales como época en la que se recolecta la planta, método de secado, condiciones de almacenaje, procedimiento empleado para la extracción del aceite esencial, y características del análisis cromatográfico usado para identificar los componentes de ese aceite (Scheffer, 1993; Miguel *et al.*, 2005; Jordán *et al.*, 2006).

La influencia del hábitat en la composición cuantitativa de los aceites esenciales queda de manifiesto en un trabajo realizado sobre plantas de *Th. hyemalis* cultivadas en dos zonas con diferentes condiciones edafoclimáticas (Martínez *et al.*, 2005), en el que se aprecian diferencias en los perfiles volátiles de tales aceites en función de la zona en la que crecen las plantas.

Por otra parte, Sáez (1995a; 1995b; 1999) encuentra una gran complejidad en la composición química del aceite esencial de algunas especies del género *Thymus* localizadas en el SE Ibérico, consecuencia según este autor de la variabilidad ecológica que se presenta en esta zona, lo cual se refleja en esa gran variabilidad química.

No obstante, como se indica anteriormente, dichas condiciones ambientales sólo tienen un efecto parcial sobre los componentes que definen el quimiotipo, que podrían aumentar o disminuir su concentración relativa, pero seguirían siendo mayoritarios, ya que el quimiotipo está establecido genéticamente. Esto se demuestra con el hecho de que plantas con diferentes quimiotipos pueden crecer en el mismo hábitat (Salgueiro *et al.* 2000a), e igualmente, se pueden encontrar individuos con el mismo quimiotipo en diferentes zonas bioclimáticas (Sotomayor, 1998). Es decir, una planta concreta no varía su quimiotipo en función de los factores externos, ya que tal característica está especificada en el mapa genético de esa planta.

En este sentido, Ložienė y Venskutonis (2005) realizan un interesante trabajo en el que analizan la influencia de ambos factores, genéticos y ambientales, en la composición del aceite esencial de *Thymus pulegioides*. Para ello recolectan individuos de diferentes quimiotipos procedentes de distintos hábitats naturales y los transfieren a una plantación experimental, donde crecen en condiciones ambientales uniformes. Estas plantas son clonadas y replantadas anualmente, durante 5 años, en el mismo entorno. Comparando el perfil químico de los aceites esenciales de las plantas clonadas con las recolectadas en estado silvestre, estos autores comprueban que la composición de los aceites a lo largo de las clonaciones anuales permanece prácticamente igual a la encontrada en los hábitats naturales, sin fluctuaciones reseñables para la gran mayoría de las plantas. Las cantidades de los componentes principales de todos los quimiotipos permanecen bastante estables, a pesar del marcado cambio en las condiciones del medio. Tan solo un reducido número de individuos se muestra sensible a los cambios de hábitat, pero cuando se clonan tales individuos durante unos pocos años en el nuevo entorno recuperan una composición similar a la de las plantas originales, de lo que se deduce que una modificación repentina de sus condiciones de crecimiento causa una variación en la biosíntesis de algunos componentes del aceite esencial en estas plantas, que necesitan algunos años para recuperar una composición similar a la de sus

parentales. Por lo tanto, los autores concluyen que, en general, la composición cualitativa del aceite esencial de estas plantas es estable, y está predeterminada genéticamente.

Entre los diversos constituyentes que definen la composición química de los aceites esenciales destacan por su importancia los compuestos terpénicos, que incluyen hidrocarburos terpénicos y sus derivados oxigenados, tales como alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres o peróxidos. Los compuestos oxigenados son altamente odoríferos (Lucchesi *et al.*, 2007), y son los principales responsables del olor de estos aceites.

Los terpenos están formados por la unión de varias moléculas del hemiterpeno *isopreno*, con fórmula general  $(C_5H_8)_n$ . Considerando que el isopreno es su precursor biológico, los terpenos son a menudo llamados isoprenoides, y se clasifican por el número de unidades de cinco carbonos que contienen, denominándose monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ), tetraterpenos ( $C_{40}$ ) y politerpenos ( $>C_{45}$ ). Los compuestos terpénicos presentes en estos aceites son principalmente mono y sesquiterpenos, y raramente diterpenos.

Mención especial merecen los compuestos fenólicos, con estructura aromática, que comprenden un conjunto importante de sustancias que se pueden encontrar en estos aceites. Los fenoles son alcoholes que pueden producirse por la oxidación parcial del benceno. El timol y su isómero carvacrol son los fenoles que se hallan en mayor proporción en el aceite esencial de tomillo. Ambos derivan del monoterpeno p-cimeno. Se trataría, por lo tanto, de alcoholes terpénicos.

Algunos ejemplos de los componentes químicos más habituales encontrados en el aceite esencial de las distintas especies del género *Thymus* se pueden ver en la Figura I-5.

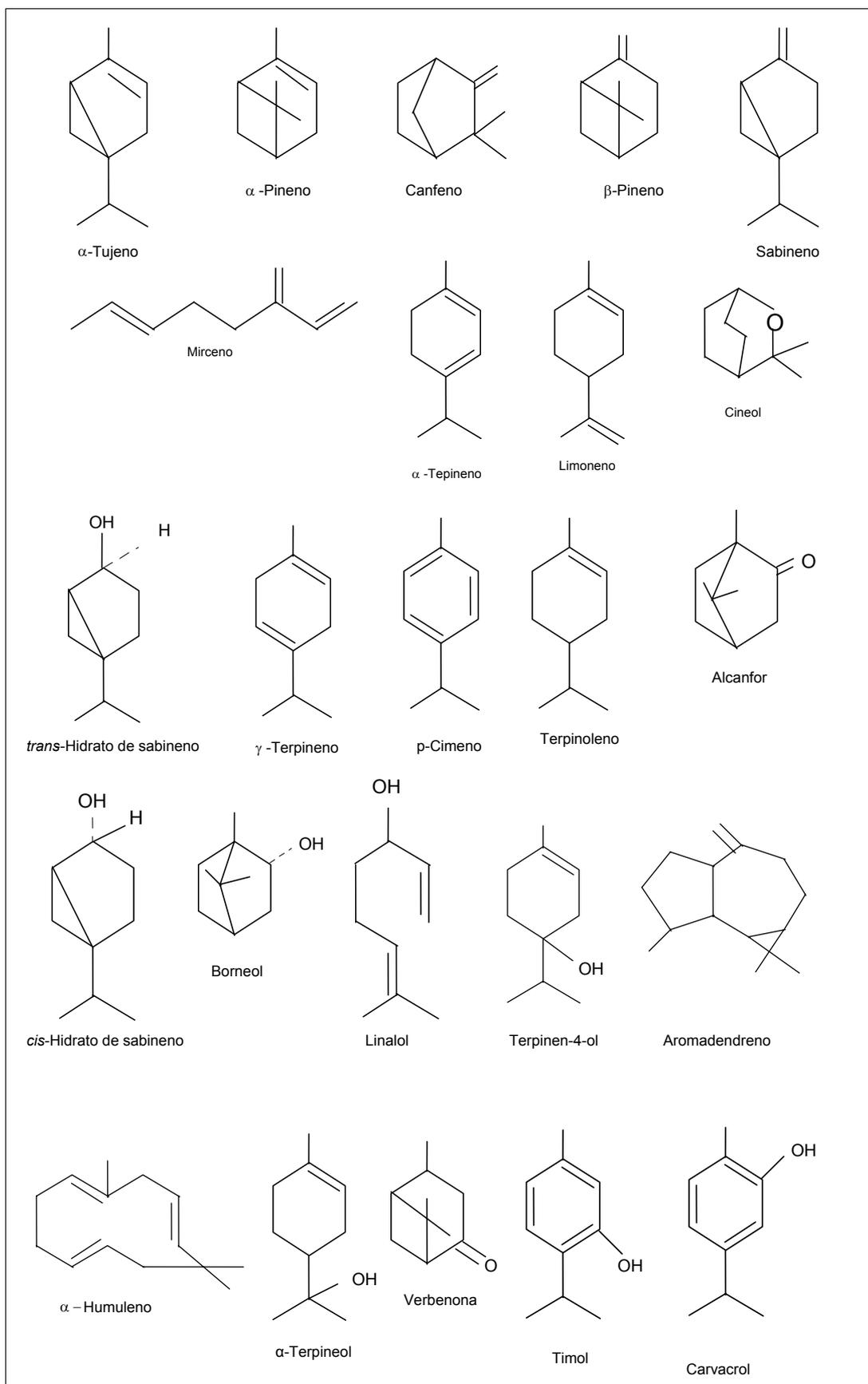


Fig. 1-5. Estructuras químicas de algunos componentes identificados en los aceites esenciales de tomillo.

### I. 5. 1. Antecedentes bibliográficos.

Dada la complejidad y riqueza en especies del género *Thymus*, se ha considerado interesante realizar una aproximación a los resultados obtenidos por diversos autores acerca de la composición del aceite esencial tanto de las tres especies objeto de esta Tesis, como de algunos otros individuos de este género, con el fin de ofrecer una perspectiva de la variabilidad química presente en estas plantas.

#### I. 5. 1. 1. *Thymus vulgaris* L.

También conocido como tomillo común, es una planta nativa de la región Mediterránea (España, Italia, Francia, Grecia, etc.). En España se puede encontrar en la mitad Este de la península, disminuyendo su presencia hacia el Sur (Figura I-6).



Fig. I-6. Distribución en la Península Ibérica de *Th. vulgaris* (Fuente: Sotomayor, 1998).

Florece de marzo a julio, principalmente de abril a junio. Se encuentra preferentemente en suelos ricos en bases, sobre todo calizas y margas. Vive desde el nivel del mar hasta 2.000 m.s.n.m. (Morales, 1986).

En la Figura I-7 se pueden apreciar algunos aspectos morfológicos de esta especie. Las imágenes corresponden a plantas de *Th. vulgaris* obtenidas de semillas disponibles comercialmente, procedentes de Francia, ya que tales plantas han sido las empleadas para la realización de esta Tesis. Este tomillo tiene un porte distinto al común español, con hojas de mayor tamaño, y presenta además un quimiotipo diferente.

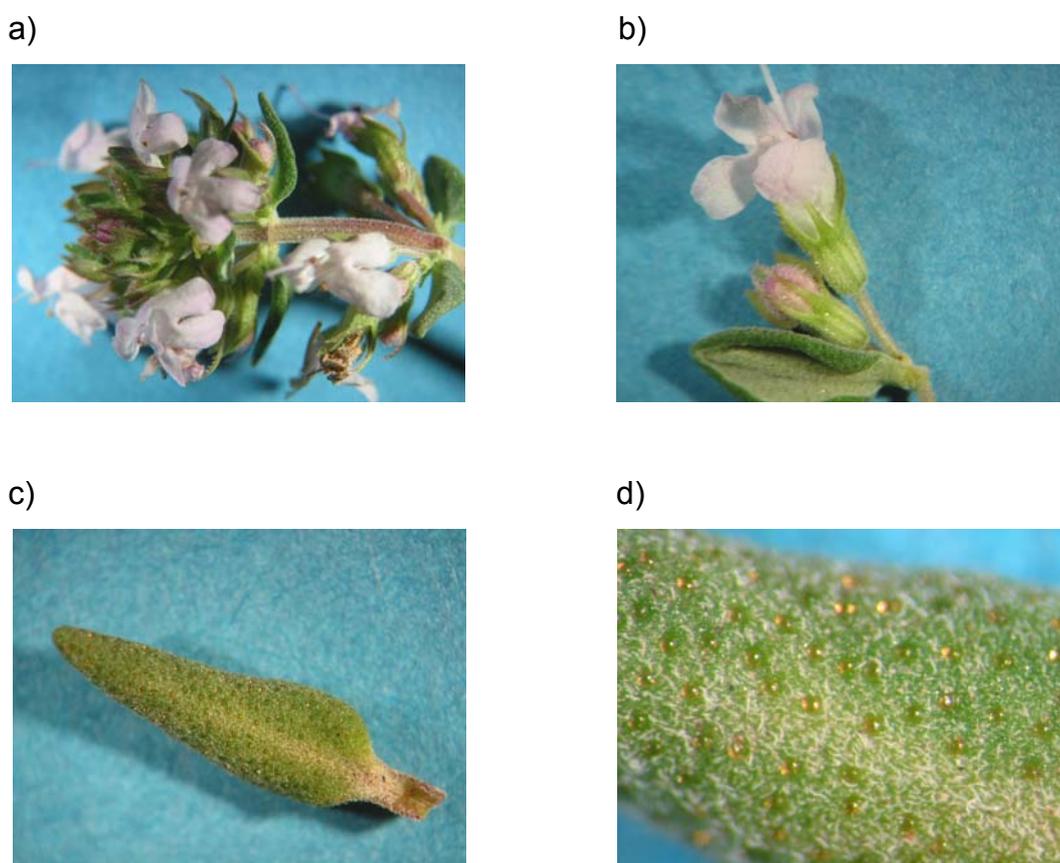


Fig. I-7. Detalle de inflorescencia (a), flor (b), hoja (c) y glándulas oleíferas (d) de *Th. vulgaris*.

Se han realizado numerosos estudios acerca de la composición química del aceite esencial de esta especie.

Granger y Passet (1973), en su trabajo sobre tomillos espontáneos en Francia, encuentran individuos que presentan un quimiotipo fenólico, con timol y carvacrol como componentes mayoritarios, y plantas con

quimiotipos no fenólicos, en los que los componentes más representativos son geraniol, linalol,  $\alpha$ -terpineol y (*E*)-hidrato de sabineno/terpinen-4-ol. Los autores observan que estos quimiotipos se distribuyen por áreas geográficas, ya que los tomillos fenólicos se suelen presentar en zonas con suelo calcáreo árido y clima cálido y seco; las formas no fenólicas aparecen en general en los lugares menos favorables para la especie, como suelos ácidos y más húmedos. La frecuencia de distribución de los quimiotipos en las poblaciones está determinada por factores genéticos y ecológicos.

Adzet *et al.* (1976a), detectan seis quimiotipos distintos estudiando plantas de *Th. vulgaris* procedentes de Francia y España: geraniol, linalol,  $\alpha$ -terpineol, timol, carvacrol y (*E*)-hidrato de sabineno/terpinen-4-ol. Estos seis quimiotipos son comunes en ambos países, en tanto que identifican también el 1,8-cineol como componente mayoritario en plantas de *Th. vulgaris* que se hallan sólo en España.

El quimiotipo 1,8-cineol es el característico del tomillo común que crece en la Península Ibérica (Jordán *et al.*, 2006). García Vallejo *et al.* (1989) manifiestan que las únicas variedades químicas existentes en España para esta especie son, además de dicho quimiotipo, el mixto 1,8-cineol/alcanfor encontrado por estos autores; y de los localizados en Francia, únicamente los quimiotipos linalol,  $\alpha$ -terpineol y (*E*)-hidrato de sabineno/terpinen-4-ol estarían representados también en España. Los quimiotipos fenólicos descritos en nuestro país se deberían a híbridos de *Th. vulgaris* con *Th. zygis*.

El polimorfismo químico que presenta esta especie ha sido estudiado por Vernet y Gouyon (1979), los cuales determinan que la naturaleza del aceite producido por estas plantas no se ve afectada cualitativamente por las condiciones de desarrollo de las mismas, lo que se evidencia realizando trasplantes y colocando las plantas en distintas condiciones de crecimiento, sin que se vea afectada la composición

química de sus aceites. Teniendo en cuenta el origen genético de los quimiotipos, estos autores concluyen que son cinco los genes que participan en la determinación de los seis quimiotipos mencionados anteriormente encontrados en Francia, y, realizando trabajos de hibridación, establecen entre estos genes la siguiente relación de epistasia:

Geraniol > $\alpha$ -Terpineol > (E)-Hidrato de sabineno > Linalol > Carvacrol > Timol
--

Las formas dominantes serían, por lo tanto, las no fenólicas.

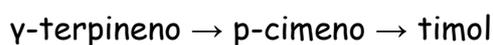
El que se presente un quimiotipo u otro está condicionado por mecanismos de regulación genética, ya que, según estos autores, el quimiotipo base sería el timol, y la activación de determinados genes reguladores, cuyos productos inhiben la expresión de los genes implicados en la síntesis de timol, promueve la generación de los otros quimiotipos.

La adaptación genética, desde el punto de vista evolutivo, a condiciones ecológicas precisas, es considerada por estos investigadores la causa de la variación en la composición química del aceite esencial que encontramos dentro de esta labiada. Dicha adaptación confiere a los individuos ventajas fisiológicas, como resistencia a la sequía, defensa contra depredadores, colonización de otros hábitats, etc.

Por otra parte, en un trabajo desarrollado por Amiot *et al.* (2005), queda comprobada la desigual tolerancia al frío de los quimiotipos fenólicos y no fenólicos de esta planta, mostrando los no fenólicos una mayor supervivencia frente a las bajas temperaturas. De esta forma, la resistencia al frío sería un factor importante en la distribución de estas labiadas.

La mayor parte de los trabajos llevados a cabo sobre esta especie de tomillo se refieren al quimiotipo fenólico. Podemos citar en este sentido

a Piccaglia y Marotti (1993), que realizan un estudio en el norte de Italia con objeto de valorar la adaptabilidad agronómica de distintas plantas a un ambiente con situado a 630 m.s.n.m., para lo cual la composición del aceite esencial es un parámetro importante a considerar. Por ello, estos autores evalúan la influencia de diferentes condiciones climáticas y de abonado en la composición cualitativa y cuantitativa del aceite esencial de estas plantas. En dicho estudio, en el caso de *Th. vulgaris*, se emplean individuos de 3 ó 4 años recolectados en plena floración, encontrándose, tras el análisis cromatográfico del aceite esencial, que los componentes mayoritarios para esta planta son p-cimeno,  $\gamma$ -terpineno y timol. Las cantidades relativas encontradas para estos constituyentes, en recolecciones realizadas en dos años consecutivos, oscilan entre 18,60–25,34% en el caso de p-cimeno, 12,06–12,27% para  $\gamma$ -terpineno, y 16,55–38,24% para timol. Otros componentes que se encuentran en una concentración relativamente alta son  $\alpha$ -tujeno (0,87–2,10%),  $\alpha$ -pineno (0,49–1,34%), mirceno (1,40–2,14%),  $\alpha$ -terpineno (1,67–2,34%), terpinen-4-ol (0,98–1,10%) o linalol (2,42–2,82%). Las diferencias en las concentraciones de los componentes en los dos años considerados se pueden atribuir al efecto de las condiciones ambientales, que tal como se ha dicho antes, pueden influir en la composición cuantitativa del aceite, dando lugar a un amplio rango de variación en las cantidades de sus constituyentes. Según estos autores,  $\gamma$ -terpineno es el componente implicado en el proceso de aromatización que resulta en la formación de p-cimeno, precursor de timol y carvacrol. El quimiotipo se puede definir por la secuencia:



Igualmente, Bhaskara Reddy *et al.* (1998) analizan el aceite esencial de dos líneas clonales diferentes de *Th. vulgaris*, identificando como principales componentes carvacrol, p-cimeno, terpinen-4-ol y timol, cuya suma corresponde aproximadamente al 50% del total de componentes analizados en ambas líneas.

Daferera *et al.* (2000) determinan la composición del aceite esencial de diversas plantas recolectadas en Grecia para evaluar la actividad biológica sobre *Penicillium digitatum* de dicho aceite. Para *Th. vulgaris* estos autores determinan que los componentes mayoritarios son  $\gamma$ -terpineno (4,30%), p-cimeno (23,50%), carvacrol (2,20%) y timol (63,60%), lo que representa el 93,6% de la composición total del aceite esencial. Otros componentes reseñables son  $\alpha$ -terpineno (1,00%),  $\beta$ -cariofileno (1,30%) y borneol (1,40%). De los resultados de este ensayo se desprende que, además de los compuestos fenólicos, hay otros constituyentes que sumados a ellos contribuyen a la actividad antifúngica de un aceite esencial.

En otro estudio realizado en Italia, Hudaib *et al.* (2002) analizan plantas de *Th. vulgaris* de dos y cinco años en diferentes momentos de su ciclo vegetativo. Los datos correspondientes al aceite esencial extraído muestran que el componente mayoritario es timol, con un porcentaje mayor en plantas de cinco años. Cuando las plantas se encuentran en floración, las cantidades relativas de los principales componentes identificados en este estudio se repartirían como se aprecia en la Tabla I-3.

Tabla I-3. Composición porcentual del aceite esencial de *Th. vulgaris*.

Componentes	Cantidad (%)	
	Dos años	Cinco años
$\alpha$ -Tujeno	1,28	0,15
Mirceno	1,14	0,15
$\alpha$ -Terpineno	3,1	0,58
p-Cimeno	21,57	12,88
1,8-Cineol	1,9	2,4
$\gamma$ -Terpineno	16,88	1,14
Linalol	1,57	2,19
Borneol	0,42	1,33
Terpinen-4-ol	0,65	1,41
Éter metílico de carvacrol	3,36	5,02

Tabla I-3 (continuación)

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad (%)</b>	
	<i>Dos años</i>	<i>Cinco años</i>
Timol	35,83	54,1
Carvacrol	2,62	3,55
$\beta$ -Cariofileno	3,5	5,28

Otros autores han analizado en estudios más recientes la composición química del aceite esencial de *Th. vulgaris*, encontrando concentraciones de timol que alcanzan el 39,10% (Mirza y Baher, 2003) o hasta el 60,15% (Asllani y Toska, 2003).

Por otra parte, Sotomayor (1998) lleva a cabo un estudio del género *Thymus* con objeto de determinar las condiciones óptimas para su establecimiento como cultivo, y en dicho estudio analiza el aceite esencial del tomillo común de origen español, que presenta 1,8-cineol como componente mayoritario. Las recolecciones de estas plantas de *Th. vulgaris*, cultivadas en secano en dos localidades de Murcia (Moratalla y Torre Pacheco), se realizan en el período 1991–1993, mostrándose en la Tabla I-4 la composición química porcentual obtenida para los componentes que se encuentran en mayor proporción en dicho período, para plantas que se encuentran en estado de floración-fructificación. La tabla recoge las cantidades máxima y mínima encontradas para cada componente.

Tabla I-4. Composición porcentual del aceite esencial de *Th vulgaris* (español).

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad (%)</b>	
	<i>Moratalla</i>	<i>Torre Pacheco</i>
$\alpha$ -Pineno	4,40 – 5,50	5,50 – 6,50
Canfeno	7,00 – 7,80	7,60 – 9,20
$\beta$ -Pineno	3,50 – 3,70	3,20 – 3,90
Sabineno	1,50 – 2,70	2,00 – 2,90
Mirceno	6,00 – 7,50	1,50 – 7,60

Tabla I-4 (continuación)

Componentes	Cantidad (%)	
	<i>Moratalla</i>	<i>Torre Pacheco</i>
Limoneno	1,40 – 2,30	1,60 – 1,90
1,8-Cineol	29,10 – 29,70	31,30 – 33,90
p-Cimeno	3,10 – 4,90	5,10 – 5,90
<i>trans</i> -Hidrato de sabineno	0,60 – 0,90	0,60 – 1,20
Alcanfor	7,40 – 9,10	7,20 – 9,70
Linalol	2,80 – 3,10	2,40 – 3,50
Terpinen-4-ol	0,30 – 0,70	0,80 – 3,10
$\alpha$ -Terpineol	3,70 – 4,80	2,30 – 5,00
Borneol	2,00 – 4,40	1,90 – 3,70

Respecto al cultivo de esta labiada, se pueden encontrar parcelas de tomillo común en Provenza (Francia), donde se ha llevado a cabo una selección con el fin de obtener plantas con buen rendimiento en biomasa, de porte erecto y mejor estructura para la siega mecánica, de las que existen semillas a nivel comercial. Este tomillo, que necesita mucha humedad ambiental y edáfica para su cultivo, se destina fundamentalmente a la obtención de hoja seca, ya que es pobre en aceite esencial. En los últimos años, se han establecido cultivos experimentales y comerciales en Aragón, Navarra, Cataluña y Baleares de procedencias francesas de *Th. vulgaris*.

#### I. 5. 1. 2. *Thymus zygis* Loefl. ex L.

Esta planta, también conocida como tomillo rojo o salsero, florece de mayo a julio y crece desde el nivel del mar hasta 2.000 m.s.n.m. Vive sobre todo tipo de sustrato, desde arenas hasta calizas, con la condición de que estén bien drenados (Morales, 1989). Aparece ampliamente distribuida en la Península Ibérica, con tres subespecies diferentes: *Th. zygis* subsp. *gracilis* (Boiss.) R. Morales, *Th. zygis* subsp. *sylvestris*

(Hoffmanns & Link) Brot. Ex Coutinho, y *Th. zygis* subsp. *zygis* (Hoffmanns & Link) Brot. Ex Coutinho. Las dos primeras se pueden encontrar en el Sudeste de España.

La subespecie *gracilis*, única de porte erecto, es la más comercializada en España, destilándose para extraer su aceite esencial, y explotándose asimismo como “hoja de tomillo” para herboristería. Las otras dos subespecies son de hábito postrado.

*Th. zygis* subsp *gracilis* crece en el sur de España y norte de África, estando principalmente representado en Andalucía oriental, Albacete y Murcia, tal como se aprecia en la Figura I-8, y es muy utilizado como condimento y para adobo de aceitunas (Morales, 1989).

Blanco *et al.* (2007), detectan también poblaciones de esta subespecie en el centro de Badajoz, sobre terrenos calcáreos, siendo estas poblaciones extremeñas las más occidentales y septentrionales que se conocen.



Fig. I-8. Distribución en la Península Ibérica de *Th. zygis* subsp. *gracilis*.  
(Fuente: Sotomayor, 1998).

En cuanto a su morfología, esta especie presenta hojas más estrechas y alargadas que las encontradas en *Th. vulgaris* (Figura I-9).

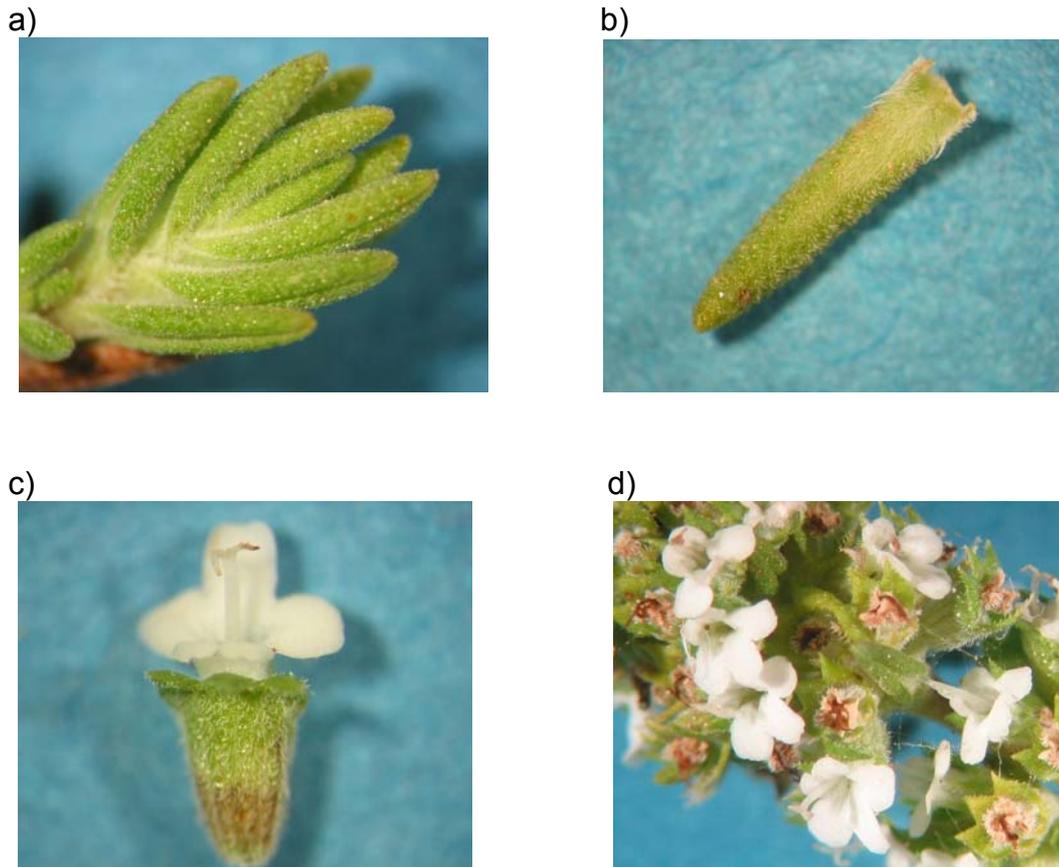


Fig. I-9. Detalle de hojas (a y b), y flores (c y d) de *Th. zygis* subsp. *gracilis*.

Estudios acerca de la composición del aceite esencial de esta subespecie han evidenciado la presencia mayoritaria del quimiotipo timol, con la excepción del quimiotipo linalol (Sánchez Gómez *et al.*, 1995), encontrado en poblaciones de la Sierra de Filabres (Almería).

Desde el punto de vista comercial, el componente con mayor interés económico y que confiere calidad al aceite esencial de estas plantas es el timol. Por ello, *Th. zygis* subsp. *gracilis*, con quimiotipo timol, es el tomillo español más apreciado, ya que esta planta presenta una elevada concentración de este compuesto fenólico en su aceite esencial (Norma UNE 84303), y es el equivalente español del *Th. vulgaris* de origen francés.

Sáez (1995a) analiza las variaciones en la composición del aceite esencial de poblaciones silvestres de *Th. zygis* localizadas en el Sudeste de España, para determinar si dicha composición se ve afectada por las condiciones ambientales. Este autor no encuentra correlación alguna entre los componentes del aceite esencial y variables del medio como altitud, temperatura o pluviometría anual, a un nivel de confianza del 99%. Fijando este porcentaje al 95%, si se aprecian correlaciones, en función de las cuales se puede deducir que la producción de compuestos fenólicos se ve favorecida por la baja altitud, y los climas cálidos y poco lluviosos. Para *Thymus zygis* subsp. *gracilis*, con quimiotipo timol, los datos obtenidos en este estudio muestran un contenido en dicho componente que oscila entre 29,93 y 71,84% cuando las plantas se recolectan en plena floración. Las concentraciones relativas halladas para otros componentes en estas plantas se sitúan entre 2,95–36,41% para el precursor p-cimeno, 0,36–9,29% para  $\gamma$ -terpineno, 2,48–7,89% para linalol, 0,13–1,60% para terpinen-4-ol, 1,63–4,87% para borneol y 1,47–3,34% en el caso de carvacrol. También se identifica un quimiotipo mixto timol/carvacrol, con cantidades de 25,45 y 22,79% respectivamente para ambos constituyentes. En cuanto a las plantas con quimiotipo linalol analizadas por este autor, la concentración de dicho compuesto se encuentra entre 28,64 y 91,40%, siendo esta última cantidad la correspondiente a un quimiotipo linalol puro. Otros constituyentes del aceite esencial de estas plantas son mirceno (0,08–3,14%), limoneno (0,04–3,40%), p-cimeno (0,32–13,44%), acetato de linalilo (0,68–1,63%), terpinen-4-ol (0,22–17,02%) o borneol (0,75–2,38%).

Estos resultados corresponden a plantas silvestres, pero el ensayo experimental de cultivo de tomillo en secano llevado a cabo por Sotomayor (1998) en dos puntos distintos de la Región de Murcia (Moratalla y Torre Pacheco), presenta para *Th. zygis* subsp. *gracilis*, unos resultados para el período 1991–1993 que se resumen en la Tabla I-5, en la que se muestran las cantidades máxima y mínima encontradas para los constituyentes más representativos del quimiotipo timol de esta

subespecie, tras al análisis cromatográfico del aceite esencial. Los datos se refieren a plantas obtenidas de semillas espontáneas procedentes de Liétor (Albacete), recolectadas en floración-fructificación, estado que, como indica este autor, es el más adecuado tanto para el rendimiento como para la calidad del aceite esencial de estas labiadas.

Tabla I-5. Composición porcentual del aceite esencial de *Th. zygis* subsp *gracilis* (quimiotipo timol)

Componentes	Cantidad (%)	
	Moratalla	Torre Pacheco
$\alpha$ -Pino	1,10 – 3,50	0,20 – 3,10
Canfeno	0,40 – 1,50	0,10 – 1,80
Sabineno	0,10 – 0,20	0,60 – 2,50
Mirceno	1,10 – 2,90	0,20 – 0,70
$\alpha$ -Terpineno	0,50 – 1,30	tr – 0,90
1,8-Cineol	1,70 – 3,10	0,40 – 4,40
$\gamma$ -Terpineno	2,90 – 9,70	3,90 – 6,50
p-Cimeno	24,70 – 40,90	24,90 – 48,10
Linalol	3,50 – 4,20	3,60 – 5,40
Terpinen-4-ol	1,10 – 3,50	0,90 – 1,40
$\alpha$ -Terpineol	1,00 – 3,10	1,00 – 1,50
Óxido de cariofileno	0,40 – 1,00	0,30 – 1,20
Timol	22,30 – 43,30	14,90 – 50,80
Carvacrol	1,50 – 2,70	1,20 – 3,50

tr = trazas

Por otra parte, en este mismo estudio se identifica un quimiotipo mixto linalol/*trans*-hidrato de sabineno, en plantas procedentes de la Sierra de Filabres (Almería), alcanzándose en la parcela de Torre Pacheco porcentajes de entre 35,70–38,90% y 16,90–22,70% para ambos componentes, respectivamente. En Moratalla, la concentración de linalol se sitúa entre 36,00–47,20%, y el contenido en *trans*-hidrato de sabineno oscila entre 4,70–9,30%.

El cultivo de la subespecie *gracilis* se ha iniciado durante los últimos cuatro o cinco años en el sureste de España (Murcia), obteniéndose plantas ricas en timol.

En la Península Ibérica se dan también las condiciones adecuadas para el desarrollo de *Th. zygis* subsp *sylvestris*. Esta planta presenta igualmente diferentes quimiotipos, siendo los más representativos aquellos en los que aparecen como componentes mayoritarios timol, 1,8-cineol y linalol (Sáez, 1995a).

En el trabajo realizado en Portugal por Moldão-Martins *et al.* (1999) acerca de la variación en la composición del aceite esencial de la subespecie *sylvestris* en diferentes fases del ciclo vegetativo, los constituyentes que se presentan en niveles más elevados son p-cimeno,  $\gamma$ -terpineno, timol, geraniol y acetato de geranilo, todos los cuales muestran variaciones durante el ciclo de vida de la planta. Antes de entrar en el período de floración, la concentración de timol comienza a aumentar hasta alcanzar su nivel máximo coincidiendo con el inicio de dicho período, en tanto que el contenido en p-cimeno experimenta una evolución inversa. Del mismo modo, el geraniol presenta un máximo en época de floración y su valor mínimo aparece durante la parada vegetativa. Los resultados de este estudio aparecen resumidos en la siguiente tabla, en la que se muestran las cantidades relativas que los autores determinan para los componentes cuando el aceite esencial se extrae por destilación mediante un sistema Clevenger:

Tabla I-6. Composición porcentual del aceite esencial de *Th. zygis* subsp *sylvestris*.

Componentes	Cantidad (%)	
	Floración	Post-floración
$\alpha$ -Tujeno	1,00	1,50
$\alpha$ -Pino	1,00	1,70
Canfeno	1,40	2,80
Mirceno	1,40	1,70

Tabla I-6 (continuación)

Componentes	Cantidad (%)	
	Floración	Post-floración
Limoneno	1,60	1,70
p-Cimeno	13,60	13,60
1,8-Cineol	0,40	0,70
γ-Terpineno	13,60	11,20
Terpinen-1-ol	0,70	0,70
Linalol	2,40	2,40
Borneol	2,10	2,10
Geraniol	18,20	21,90
Timol	23,80	21,00
Carvacrol	1,30	1,00
Acetato de geranilo	16,30	16,50
β-Cariofileno	3,60	3,50

*Th. zygis* subsp. *zygis* es un endemismo de la mitad norte peninsular, encontrándose en regiones interiores de Lérica a Portugal. Su aceite esencial muestra una abundante presencia de acetato de terpenilo (Morales, 1986). El quimiotipo timol es también muy común en esta subespecie (Salgueiro *et al.*, 1993).

### I. 5. 1. 3. *Thymus hyemalis* Lange.

Arbusto endémico del Sudeste Ibérico, encontrándose en el sur de Alicante, Murcia y Almería (Figura I-10), y al parecer se presentan formas muy parecidas en el norte de África.

Se conoce como tomillo de invierno, ya que esta es su época de floración en estado silvestre.



Fig. I-10. Distribución en la Península Ibérica de *Th. hyemalis* (Fuente: Sotomayor, 1998).

Planta termófila, perfectamente adaptada a las condiciones áridas del SE Ibérico, cuya fenología invernal no le permite instalarse en lugares con inviernos muy fríos. El hecho de que la estación natural de floración de esta especie sea el invierno demuestra la amplia gama de adaptaciones que presentan los tomillos, cuya finalidad es favorecer la polinización al existir menor competencia, ya que el número de especies que florecen en esta época del año es menor (Morales, 1989).

*Th. hyemalis* es una planta de tendencia basófila que crece principalmente sobre calizas, margas, suelos yesosos y rocas volcánicas. Vive desde el nivel del mar hasta 400–700 m.s.n.m.

Una característica morfológica de esta especie son los cilios que presenta en la base de las hojas (Figura I-11).

Diversos autores han estudiado la gran variabilidad que presenta la composición química del aceite esencial de esta planta (Adzet *et al.*, 1976b; Cabo *et al.*, 1986; Sáez, 1995b). Los quimiotipos más comunes son timol, carvacrol, linalol y borneol.

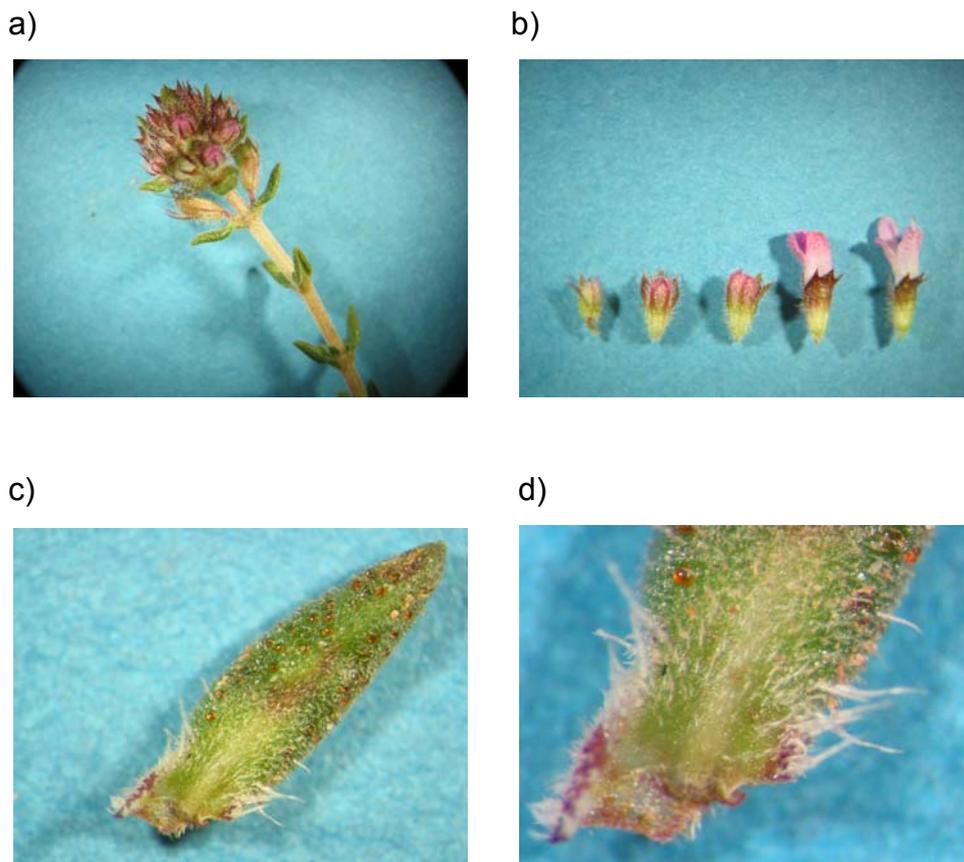


Fig. I-11. Detalle de inflorescencia (a), flores (b), y hojas ciliadas en su base (c y d) de *Th. hyemalis*.

Sotomayor (1998) encuentra, en el ensayo realizado en Murcia, plantas que presentan mayoritariamente quimiotipo timol, variando la concentración de este compuesto de 24,70 a 15,40% en el período 1991-1993.

Plantas con borneol como principal constituyente muestran una cantidad relativa de hasta el 17,76% para este alcohol (Jiménez *et al.*, 1989). Estos mismos autores cuantifican para una de las poblaciones de *Th. hyemalis* objeto de estudio un porcentaje de timol que alcanza el 52,33%, indicando que debe existir una ruta biosintética preferente, que conduce a la formación de fenoles, y una segunda ruta que culminaría con la síntesis de borneol.

Otros autores (Cabo *et al.*, 1987), en plantas recolectadas en la sierra de Alfacar en Granada, encuentran como componentes más importantes 1,8-cineol, mirceno y alcanfor, con concentraciones máximas de 26,80%, 31,30% y 19,00% respectivamente.

Martínez *et al.* (2005) realizan un estudio para comprobar el efecto de distintas condiciones edafoclimáticas sobre el rendimiento y la calidad del aceite esencial de esta especie. Para ello se analizan plantas cultivadas en dos puntos de la Región de Murcia: Torre Pacheco (finca experimental Torreblanca), a 45 m.s.n.m., y La Paca (Lorca), a 690 m.s.n.m. Las plantas se recolectan en estado de floración-fructificación, no encontrando los autores diferencias significativas en cuanto al rendimiento en aceite esencial obtenido en las dos localidades estudiadas. Sin embargo, los análisis cromatográficos efectuados a dichos aceites muestran perfiles volátiles distintos en función de la zona, siendo los aceites de La Paca más ricos en componentes alcohólicos de bajo peso molecular, así como en compuestos fenólicos, si bien no se aprecian diferencias significativas en cuanto al contenido en timol. No obstante, los valores medios obtenidos en La Paca para este fenol definitorio de calidad tienden a ser mayores que los obtenidos en Torreblanca.

Los resultados que se exponen a continuación representan la media y la desviación estándar relativa (RSD) encontradas para los principales componentes identificados en ambas zonas de cultivo.

Tabla I-7. Composición porcentual del aceite esencial de *Th. hyemalis* en dos localidades de Murcia.

Componentes	La Paca		Torreblanca	
	Media	RSD	Media	RSD
$\alpha$ -Pino	1,63	47	0,98	79
Mirceno	0,81	21	0,84	20
$\alpha$ -Terpineno	1,29	23	1,71	36
p-Cimeno	23,73	18	24,38	26

Tabla I-7 (continuación)

Componentes	La Paca		Torreblanca	
	Media	RSD	Media	RSD
Limoneno	1,08	31	1,01	57
1,8-Cineol	1,28	152	1,35	149
$\gamma$ -Terpineno	11,10	38	14,11	30
Linalol	1,44	54	1,46	59
Alcanfor	0,74 <sup>a</sup>	45	0,35 <sup>b</sup>	46
Borneol	2,15 <sup>a</sup>	81	0,25 <sup>b</sup>	96
Verbenona	3,70	50	2,98	45
Éter metílico de timol	0,55 <sup>a</sup>	85	0,08 <sup>b</sup>	125
Éter metílico de carvacrol	0,11 <sup>a</sup>	100	0,03 <sup>b</sup>	167
Timol	32,59	19	25,79	24
Carvacrol	1,69	27	1,39	29
$\beta$ -Cariofileno	0,87	38	1,02	58

<sup>a, b</sup> Valores con distinto superíndice en la misma línea presentan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ).

#### I. 5. 1. 4. *Thymus baeticus* Boiss ex Lacaita.

Es un arbusto ampliamente distribuido en el sudeste de la Península Ibérica (Murcia, Almería, Granada, Málaga, Cádiz y Jaén). Florece desde finales de marzo hasta mediados de julio y se encuentra desde el nivel del mar hasta 1.500 m.s.n.m. En esta planta se han identificado varios quimiotipos en estudios realizados por diferentes autores.

Elena-Roselló (1984) identifica mayoritariamente quimiotipos mixtos en poblaciones de Granada y Almería.

Cabo *et al.* (1989), estudiando la composición del aceite esencial de este tomillo mediante distintas técnicas, destacan la práctica ausencia de compuestos fenólicos con cualquiera de los métodos empleados.

Por su parte, Castillo *et al.* (1991) llevan a cabo un estudio de esta especie en Granada, encontrando plantas con quimiotipos geraniol, terpinen-4-ol, borneol y  $\alpha$ -terpineol. También determinan una fuerte presencia de 1,8-cineol en la mayoría de las muestras analizadas.

Sáez Soto (1996) observa, en el sudeste peninsular, una tendencia predominante a la formación de terpinen-4-ol, aunque con frecuencia encuentra plantas con otros constituyentes mayoritarios como fenoles, borneol, linalol y otros compuestos. Esto último puede deberse a interacciones genéticas con otras especies que presentan habitualmente estos quimiotipos, siendo especialmente importante la formación de híbridos con *Thymus hyemalis*.

En un estudio sobre *Thymus x aradanus*, Soriano *et al.* (1997) determinan una composición para *Th. baeticus* (uno de sus parentales) de *trans*-hidrato de sabineno (18,20%), linalol (6,20%), terpinen-4-ol (6,50%), borneol (13,70%) y verbenona (7,30%).

Sotomayor (1998) encuentra los quimiotipos *trans*-hidrato de sabineno, linalol,  $\alpha$ -terpineol y alcanfor, así como algunos híbridos con quimiotipo mixto.

Un trabajo sobre *Th. baeticus* recolectado en floración en el sudeste de España realizado por Sáez (1999) muestra una gran variabilidad entre las plantas analizadas, aunque se detecta un elevado número de individuos caracterizados por la presencia de terpinen-4-ol en su aceite esencial. En una de las localidades estudiadas se encontraron muestras con grandes cantidades relativas de 1,8-cineol, pero esto puede ser consecuencia de la formación de híbridos con *Thymus mastichina*, planta que se distingue por la presencia de este componente en su aceite esencial, y que crece en esa misma zona. Las muestras fueron tomadas entre 1990–1993 en diferentes localizaciones, y las concentraciones

relativas halladas para los constituyentes más importantes fueron las siguientes:

Tabla I-8. Composición porcentual del aceite esencial de *Th. baeticus*.

Componentes	Cantidad (%)
$\alpha$ -Pinoeno	0,54 – 10,53
Canfeno	0,14 – 4,98
$\alpha$ -Terpineno	0,04 – 4,14
Limoneno	0,08 – 4,83
1,8-Cineol	0,33 – 56,23
$\gamma$ -Terpineno	0,07 – 9,96
p-Cimeno	1,88 – 37,60
<i>trans</i> -Hidrato de sabineno	0,11 – 20,18
Alcanfor	0,07 – 2,43
Linalol	0,61 – 24,58
Terpinen-4-ol	1,07 – 28,82
Neral	0,40 – 2,07
$\alpha$ -Terpineol	1,75 – 15,21
Borneol	1,17 – 53,62
Geranial	0,18 – 14,95
Acetato de geranilo	0,20 – 14,08

#### I. 5. 1. 5. *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link.

Planta que suele vivir sobre terrenos arenosos en dunas estabilizadas, arenas asentadas sobre calizas o calizas arenosas. Se encuentra cerca del mar, y puede formar grandes tomillares. Florece de finales de marzo a junio, sobre todo en abril y mayo (Morales, 1986). Esta especie es un endemismo de Portugal.

Salgueiro *et al.* (1997d) realizan un estudio acerca de la composición y variabilidad del aceite esencial de esta planta, recolectando muestras en siete poblaciones de las regiones del Algarve y Bajo Alentejo cuando las plantas se encuentran en floración. Los resultados obtenidos

por estos investigadores, detallados en la Tabla I-9, muestran importantes diferencias en los principales constituyentes encontrados, como borneol, 1,8-cineol, linalol, *trans*-hidrato de sabineno y terpinen-4-ol, los cuales oscilan en un amplio rango.

Tabla I-9. Composición porcentual del aceite esencial de *Th. camphoratus*.

Componentes	Cantidad (%)
$\alpha$ -Pino	7,00 – 11,00
Canfeno	0,50 – 10,30
Sabineno	0,90 – 5,30
Limoneno	1,00 – 2,00
$\gamma$ -Terpineno	0,20 – 3,90
<i>trans</i> -Ocimeno	0,20 – 3,00
1,8-Cineol	3,90 – 20,00
<i>trans</i> -Hidrato de sabineno	0,10 – 10,80
Alcanfor	0,20 – 6,80
Linalol	3,00 – 21,00
Acetato de linalilo	0,10 – 8,00
Acetato de bornilo	0,10 – 3,80
Terpinen-4-ol	1,40 – 10,20
<i>trans</i> -Verbenol	1,10 – 2,90
$\alpha$ -Terpineol	1,00 – 5,50
Borneol	0,60 – 24,00
Acetato de geranilo	tr – 6,70
<i>cis</i> - $\alpha$ -Bisaboleno	tr – 4,50
$\beta$ -Óxido de Cariofileno	0,40 – 3,50
T-Cadinol	tr – 8,30
Intermedeol	tr – 6,50

*tr* = trazas

#### I. 5. 1. 6. *Thymus mastichina* (L.) L.

Se trata de una planta endémica de la Península Ibérica, con excepción de Cataluña y Levante. Florece de mayo a junio, y vive desde el nivel del mar hasta 1.800 m.s.n.m. La Sección *Mastichina* incluye tres

taxones: *Th. mastichina* (L.) L. subsp. *mastichina*, *Th. mastichina* (L.) L. subsp. *donyanae* R. Morales y *Th. albicans* Hoffmanns y Link.

García Vallejo *et al.* (1984), y Velasco Negueruela y Pérez Alonso (1986) identifican tres quimiotipos en la Península Ibérica para la subespecie *mastichina*: 1,8-cineol, linalol y el mixto linalol/1,8-cineol. En cuanto a los estudios realizados en el Sudeste Ibérico, Sánchez-Gómez *et al.* (1991) encuentran los quimiotipos 1,8-cineol y el híbrido 1,8-cineol/alcanfor, mientras Soriano *et al.* (1997), determinan la presencia en la Región de Murcia del quimiotipo mixto 1,8-cineol (42,60%)/linalol (32,80%).

Sotomayor (1998) encuentra este mismo quimiotipo en un ensayo realizado igualmente en Murcia, siendo los porcentajes determinados para los constituyentes principales identificados en este estudio, cuando las plantas se encuentran en estado de floración-fructificación, los siguientes:  $\alpha$ -pineno (1,70–3,60%),  $\beta$ -pineno (2,60–4,70%), sabineno (1,70–3,20%), mirceno (0,80–1,30%), limoneno (2,30–2,90%), 1,8-cineol (46,10–52,20%), p-cimeno (0,70–1,90%), linalol (20,10–29,00%), y  $\alpha$ -terpineol (1,90–4,70%).

Salgueiro *et al.* (1997a) analizan la composición y variabilidad de los aceites esenciales de los tres taxones de la Sección *Mastichina* en Portugal, identificando y cuantificando como componentes mayoritarios los reflejados en la Tabla I–10.

Tabla I–10. Composición porcentual del aceite esencial de *Th. mastichina*.

Componentes	Cantidad (% valores medios)		
	A	B	C
$\alpha$ -Pineno	3,60	4,00	4,30
Canfeno	1,60	5,20	2,60
$\beta$ -Pineno	4,00	3,80	5,00
Sabineno	2,80	2,20	3,00

Tabla I-10 (continuación)

Componentes	Cantidad (% valores medios)		
	A	B	C
Mirceno	1,60	1,20	1,70
Limoneno	1,50	1,10	0,40
1,8-Cineol	53,30	38,40	34,90
<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimeno	1,10	0,10	0,60
$\gamma$ -Terpineno	0,50	1,00	0,70
Alcanfor	1,40	1,20	1,20
Linalol	5,50	2,60	14,20
Terpinen-4-ol	1,40	1,40	1,80
$\beta$ -Cariofileno	1,30	1,00	0,90
$\delta$ -Terpineol	2,00	1,70	2,40
$\alpha$ -Terpineol	4,40	4,80	8,50
Borneol	2,60	15,30	4,60
Viridiflorol	0,20	1,30	1,00

A = *Th. mastichina* ssp *mastichina*

B = *Th. mastichina* ssp *donyanae*

C = *Th. albicans*

El elevado contenido en 1,8-cineol es una característica común a los tres taxones de la Sección *Mastichina*.

#### I. 5. 1. 7. *Thymus piperella* L.

Se trata de una planta endémica de la provincia de Valencia, norte de Alicante, este de Albacete y norte de Murcia, que florece de junio a octubre, especialmente en septiembre y octubre. Vive generalmente sobre suelos pedregosos, en conglomerados, calizas o margas, desde una altitud próxima al nivel del mar hasta 1.100 m.s.n.m. (Morales, 1986).

Los trabajos realizados sobre la composición del aceite esencial de esta especie han permitido establecer la existencia de tres quimiotipos: p-cimeno/carvacrol/ $\gamma$ -terpineno, p-cimeno/timol y p-cimeno/carvacrol.

Sotomayor (1998), en un cultivo realizado en Murcia, identifica como componentes mayoritarios p-cimeno (34,30–48,40%),  $\gamma$ -terpineno (11,90–23,40%) y carvacrol (13,80–14,50%). Otros componentes encontrados por este autor son  $\alpha$ -pineno (2,10–3,30%), canfeno (0,50–1,20%),  $\alpha$ -terpineno (1,70–1,90%), limoneno (0,80–1,60%), 1,8-cineol (1,50–2,00%), linalol (2,50–3,50%), terpinen-4-ol (1,50–3,80%) y  $\alpha$ -terpineol (1,10–1,60%).

En un ensayo desarrollado para determinar la variabilidad en la composición química del aceite esencial de esta especie, Blanquer *et al.* (1998) reconocen los tres quimiotipos mencionados anteriormente en muestras tomadas en Albacete, Alicante y Valencia. Los componentes mayoritarios de los aceites esenciales analizados por estos autores son p-cimeno, carvacrol,  $\gamma$ -terpineno y timol. Estos compuestos están relacionados biosintéticamente. Los valores de media y desviación estándar (SD) obtenidos para estos y otros constituyentes del aceite esencial de *Th. piperella*, son:

Tabla I-11. Composición porcentual del aceite esencial de *Th. piperella*.

Componentes	Quimiotipo A		Quimiotipo B		Quimiotipo C	
	Media (%)	S. D.	Media (%)	S. D.	Media (%)	S. D.
$\alpha$ -Pineno	2,64	1,15	2,10	0,80	1,78	1,20
Mirceno	1,33	0,45	1,36	0,57	0,79	0,45
p-Cimeno	43,27	9,14	44,82	10,64	52,10	16,22
Limoneno	3,15	1,74	1,66	0,87	1,86	1,14
1,8-Cineol	1,25	0,99	0,60	0,52	1,37	1,40
$\gamma$ -Terpineno	13,98	4,41	4,34	3,99	4,29	3,62
Linalol	2,88	2,04	1,40	1,50	2,40	1,24
Borneol	1,84	0,67	2,54	0,87	2,80	1,65
Timol	1,51	2,75	22,96	8,98	1,28	1,22
Carvacrol	15,76	5,48	1,70	0,91	18,10	7,62
$\beta$ -Cariofileno	3,10	0,98	2,22	0,72	1,54	0,89

A = p-cimeno/carvacrol/ $\gamma$ -terpineno

Tabla I-11 (continuación)

B = p-cimeno/timol

C = p-cimeno/carvacrol

Igualmente, Boira y Blanquer (1998) estudian la relación entre las condiciones ambientales y la variabilidad en la composición química del aceite esencial de *Th. piperella* en las mismas localizaciones, determinando que los principales componentes fenólicos de dicho aceite esencial están relacionados con el índice de aridez y otras variables.

#### **I. 5. 1. 8. *Thymus caespitius* Brot.**

Es esta una especie endémica del noroeste de la Península Ibérica y de los archipiélagos de Azores y Madeira, aunque Blanco *et al.* (2007) localizan poblaciones de este tomillo al norte de la provincia de Cáceres, en las estribaciones de la Sierra de Gata. Su período de floración abarca desde finales de mayo hasta comienzos de agosto. Para desarrollarse necesita cierta humedad ambiental y no tolera bien las heladas. Crece desde el nivel del mar hasta 1.200 m.s.n.m. (Morales, 1986).

En muestras recolectadas en el NO de Portugal, Salgueiro *et al.* (1997c) encuentran como característico de esta zona un quimiotipo  $\alpha$ -terpineol, mientras timol y carvacrol son los constituyentes mayoritarios en plantas recolectadas en Azores. Estas diferencias estarían relacionadas con las distintas condiciones climáticas y de suelo que caracterizan ambas zonas. La Tabla I-12 especifica la concentración relativa hallada por estos autores para los componentes que se encuentran en mayor proporción.

Tabla I-12. Composición porcentual del aceite esencial de *Th. caespititius*.

Componentes	Cantidad (%)	
	NO Portugal	Azores
$\alpha$ -Tujeno	0,30 - 1,10	2,60
$\alpha$ -Pino	0,30 - 1,20	1,90
Mirceno	1,00 - 2,50	0,00
p-Cimeno	6,00 - 9,10	6,80
Limoneno	1,10 - 2,00	0,40
$\gamma$ -Terpineno	3,70 - 6,90	1,70
Borneol	1,00 - 2,50	0,10
Terpinen-4-ol	0,90 - 2,00	0,90
$\alpha$ -Terpineol	30,60 - 40,50	5,10
Timol	tr - 0,20	16,10
Carvacrol	tr - 0,10	36,30
$\beta$ -Cariofileno	0,80 - 3,60	0,00
$\gamma$ -Cadineno	2,00 - 3,70	0,50
<i>trans</i> -Dihidroagarofurano	1,00 - 3,00	1,70
$\beta$ -Elemol	0,60 - 2,00	0,40
Epímero de guaiol	1,40 - 2,50	2,40
T-Cadinol	6,20 - 8,70	1,30

*tr* = trazas

Pereira *et al.* (2000), restringiéndose a la isla de San Jorge (Azores), analizan plantas recolectadas en diferentes localizaciones durante la época de floración. *Th. caespititius* es el único representante del género *Thymus* en el archipiélago de Azores, siendo además una de las pocas plantas de este archipiélago que puede crecer en un amplio rango de altitudes. Estos autores observan un gran polimorfismo químico en el aceite esencial de estas plantas, que parece ser debido a la variabilidad genética o a la influencia de factores edáficos. Entre los componentes identificados en este estudio destacan sabineno (0,10–40,90%),  $\alpha$ -terpineol (trazas–68,30%), timol (1,40–57,90%) y carvacrol (0,50–52,30%).

### I. 5. 1. 9. *Thymus pulegioides* L.

Planta que vive en hábitats con gran cantidad de agua, lugares de escorrentía o bordes de arroyos (Morales, 1986). En la Península Ibérica sólo se encuentra en la mitad septentrional.

Presenta una gran variabilidad en la composición química de su aceite esencial, como se desprende del trabajo realizado por Ložienė *et al.* (2003), los cuales, en un estudio desarrollado en Lituania, describen cinco quimiotipos para esta especie:

- 1) linalol
- 2) geranial/geraniol/neral
- 3) timol
- 4) carvacrol/ $\gamma$ -terpineno/p-cimeno
- 5) timol/carvacrol/p-cimeno/  $\gamma$ -terpineno

Mockute y Bernotiene (1999) analizan el aceite esencial de estas plantas que crecen en estado silvestre en Lituania, encontrando en la mayor parte de las localidades investigadas los quimiotipos citral/geraniol y carvacrol. Los componentes más importantes identificados en el quimiotipo citral/geraniol son: geraniol (14,90–30,80%), geranial (*trans*-citral, 9,70–19,70%),  $\beta$ -cariofileno (6,00–11,40%), nerol (4,10–11,80%) y neral (*cis*-citral, 0,10–9,50%). Los aceites esenciales que presentan quimiotipo carvacrol contienen mayoritariamente este fenol (16,00–22,20%), además de  $\beta$ -bisaboleno (11,10–20,20%),  $\beta$ -cariofileno (11,10–19,10%),  $\gamma$ -terpineno (5,80–16,20%), p-cimeno (5,50–0,40%), timol (3,30–9,80%) y éter metílico de carvacrol (5,60–8,60%).

Estos mismos autores llevan a cabo un estudio de los dos quimiotipos de *Thymus pulegioides* anteriores y un tercer quimiotipo, acetato de  $\alpha$ -terpenilo, durante 1996–1997 (Mockute y Bernotiene, 2001), obteniendo los siguientes resultados:

Tabla I-13. Composición porcentual del aceite esencial de *Th. pulegioides*.

Componentes	Cantidad (%)		
	acetato de $\alpha$ -terpenilo	citral/geraniol	carvacrol
p-Cimeno	0,10 – 2,60	0,10 – 1,80	5,50 – 10,10
$\gamma$ -Terpineno	0,20 – 1,50	0,10 – 1,60	5,90 – 14,50
Linalol	tr – 0,10	0,40 – 13,70	0,40 – 0,60
Nerol	tr	4,20 – 5,70	tr
Neral ( <i>cis</i> -citral)	tr – 0,10	1,10 – 9,50	tr
Éter metílico de carvacrol	tr – 2,50	tr – 1,10	5,90 – 8,90
Geraniol	0,10 – 4,90	16,30 – 29,20	1,30 – 5,70
Geranial ( <i>trans</i> -citral)	tr – 0,10	9,70 – 16,10	1,10 – 3,10
Timol	0,10 – 0,50	0,30 – 1,10	4,30 – 8,30
Carvacrol	0,20 – 5,60	1,90 – 5,60	16,00 – 25,50
Acetato de $\alpha$ -terpenilo	49,50 – 70,40	tr	0,10 – 1,20
$\beta$ -Cariofileno	6,20 – 11,50	7,40 – 9,60	11,40 – 15,80
$\beta$ -Bisaboleno	2,80 – 5,10	3,40 – 6,90	11,10 – 12,20
Óxido de cariofileno	0,90 – 2,30	2,40 – 8,10	2,60 – 5,40

tr = trazas

#### I. 5. 1. 10. *Thymus villosus* L.

Esta especie florece de mayo a agosto y se encuentra distribuida en la mitad sur de Portugal, Cáceres, Ciudad Real y Toledo. Es una planta esporádica que no forma grandes tomillares (Morales, 1986), para la que se han descrito dos subespecies: *Th. villosus* subsp. *villosus* y *Th. villosus* subsp. *lusitanicus* (Boiss.) Coutinho. Ambas subespecies pueden ser fácilmente diferenciadas por la composición de sus aceites esenciales.

Respecto a *Th. villosus* subsp. *villosus*, Salgueiro *et al.* (1997b) identifican varios quimiotipos en su aceite esencial, siendo p-cimeno un constituyente importante (10,90–28,00%) para casi todas las muestras analizadas. Así, los quimiotipos identificados para esta planta son: p-cimeno/alcanfor/linalol, p-cimeno/borneol, linalol/geraniol/acetato de geraniol y  $\alpha$ -terpineol/alcanfor/mirceno.

Este mismo equipo de investigación realiza un estudio quimiotaxonómico de *Th. villosus* subsp. *lusitanicus* (Salgueiro *et al.*, 2000b), determinando los siguientes quimiotipos: linalol, linalol/terpinen-4-ol/*trans*-hidrato de sabineno, linalol/1,8-cineol, acetato de geranilo/geraniol y acetato de geranilo/geraniol/1,8-cineol. Los principales componentes hallados en el aceite esencial de esta subespecie presentan importantes diferencias, oscilando su cantidad relativa en un rango bastante amplio. La Tabla I-14 resume los resultados de este trabajo.

Tabla I-14. Composición porcentual del aceite esencial de *Th. villosus*.

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad (%)</b>
$\alpha$ -Pino	0,60 – 1,10
Mirceno	0,80 – 4,20
Limoneno	1,10 – 2,00
1,8-Cineol	1,00 – 5,00
$\gamma$ -Terpineno	1,00 – 5,50
p-Cimeno	1,60 – 5,00
<i>trans</i> -Hidrato de sabineno	1,60 – 3,80
Alcanfor	0,10 – 2,00
Linalol	9,00 – 24,50
<i>cis</i> -Hidrato de sabineno	0,50 – 2,00
Terpinen-4-ol	5,00 – 15,20
Neral	0,20 – 1,80
$\alpha$ -Terpineol	0,80 – 2,60
Geranial	0,30 – 2,00
Acetato de geranilo	11,50 – 23,90
Geraniol	7,20 – 18,00
$\beta$ -Elemol	0,40 – 2,00

Estos autores comentan que el polimorfismo químico que aprecian en sus resultados también se presenta en plantas recolectadas en España, distinguiéndose las plantas portuguesas de las españolas porque éstas poseen mayor cantidad de alcanfor, borneol y 1,8-cineol que las

portuguesas, y sin embargo no tienen acetato de geranilo ni geraniol, que están presentes en elevadas concentraciones en las plantas lusas.

#### I. 5. 1. 11. *Thymus lotocephalus* G. López & R. Morales.

Planta endémica del Algarve portugués. Vive preferentemente sobre suelos ácidos, pero también sobre arcillas y calizas descarbonatadas, desde 50 hasta 450 m.s.n.m. Florece de abril a junio (Morales, 1986).

En un estudio publicado por Salgueiro *et al.* (2000a) se evidencian importantes diferencias entre los componentes mayoritarios de esta planta, especialmente linalol y acetato de geranilo, incluso cuando las muestras se toman en localizaciones relativamente próximas. Cinco quimiotipos han sido determinados por estos autores en plantas recolectadas en el mismo estado de desarrollo: linalol, 1,8-cineol, linalol/1,8-cineol, acetato de linalilo/linalol y acetato de geranilo, demostrando así la elevada variabilidad intraespecífica que presenta el aceite esencial de esta planta, que se considera una especie poco común. Los análisis cromatográficos que llevan a cabo proporcionan los siguientes resultados:

Tabla I-15. Composición porcentual del aceite esencial de *Th. lotocephalus*.

Componentes	Cantidad (%)
$\alpha$ -Pino	5,00 – 9,00
Limoneno	1,20 – 2,00
1,8-Cineol	6,90 – 12,70
p-Cimeno	0,50 – 1,30
<i>trans</i> -Hidrato de sabineno	0,50 – 3,00
Alcanfor	1,60 – 6,50
Linalol	3,70 – 16,50
Acetato de linalilo	0,10 – 3,00

Tabla I-15 (continuación)

Componentes	Cantidad (%)
Acetato de bornilo	0,50 – 2,30
Terpinen-4-ol	0,90 – 3,90
$\beta$ -Cariofileno	0,90 – 2,00
<i>trans</i> -Verbenol	1,90 – 3,30
Borneol	2,10 – 3,80
Acetato de geranilo	0,20 – 15,00
$\beta$ -Óxido de Cariofileno	3,50 – 5,90
Ledol	1,40 – 3,40
Viridiflorol	2,20 – 7,00
Intermedeol	0,20 – 9,50

En este mismo trabajo, estos investigadores se refieren también a *Thymus x mourae*, un híbrido natural entre *Th. lotocephalus* y *Th. mastichina* subsp. *donyanae*, cuyos principales constituyentes son 1,8-cineol (23,50%) y borneol (14,70%).

#### I. 5. 1. 12. *Thymus serpylloides* Bory subsp. *gadorensis* (Pau) Jalas.

En un trabajo realizado por Sáez (2001) sobre plantas silvestres recolectadas en el Sudeste de España, muchos de los individuos analizados muestran un quimiotipo fenólico, en tanto que otro importante grupo de plantas presentan linalol como principal constituyente. También son identificados otros componentes como geraniol, mirceno, óxido de cariofileno, terpinen-4-ol y 1,8-cineol. Las concentraciones relativas detectadas para estos componentes oscilan en función de las localidades en las que se recolectan las plantas, tal como se muestra en la Tabla I-6.

Tabla I-16. Composición porcentual del aceite esencial de *Th. serpylloides*.

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad (%)</b>
Mirceno	0,13 – 39,39
1,8-Cineol	0,12 – 10,52
γ-Terpineno	0,31 – 11,70
p-Cimeno	1,08 – 30,85
Linalol	0,06 – 29,38
Terpinen-4-ol	0,13 – 11,71
Geraniol	0,26 – 79,99
Óxido de cariofileno	0,31 – 6,28
Timol	0,90 – 18,50
Carvacrol	0,13 – 20,13

## **I. 6. INTERÉS ECONÓMICO DEL GÉNERO *THYMUS*.**

### **I. 6. 1. Materia prima para la industria.**

En los últimos años han aumentado las exigencias por parte de la industria con respecto a los parámetros de calidad de los distintos productos empleados como materias primas, lo que afecta directamente a las plantas de interés comercial, entre las que se incluyen las distintas especies medicinales y aromáticas. Por otro lado, la explotación de la vegetación silvestre, fuente tradicional de este tipo de plantas, puede dar lugar a fraudes, heterogeneidad en el contenido de principio activo según el grado de desarrollo de los individuos, diferentes ecotipos, etc. (Pascual, 2000). Algunas especies están además en peligro de extinción en el medio natural, lo que ha llevado a las distintas Comunidades Autónomas a establecer normas para asegurar la conservación de las poblaciones vegetales, como ha ocurrido en la Región de Murcia con la creación del Catálogo Regional de Flora Silvestre Protegida (Conserjería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente, 2003).

Los parámetros de calidad abarcan cada día más campos, tales como el uso de semillas determinadas, abonos y plaguicidas, así como especificaciones de cosecha y de secado. Cada vez más, las empresas y en especial la industria farmacéutica, están implantando sistemas de aseguramiento de la calidad como los de la serie ISO 9000, lo que implica que necesitan documentar el origen de sus materias primas (Pascual, 2000).

Todo esto propicia la necesidad de fomentar el cultivo de las plantas de utilidad industrial, mediante sistemas de producción integrada, con el fin de conseguir productos de calidad, de forma rentable y respetando el medio ambiente. Sólo a partir de cultivos controlados se pueden garantizar las materias primas libres de contaminantes que exigen las diferentes industrias.

Los aceites esenciales obtenidos de las plantas aromáticas se encuentran entre estas materias primas. Son productos comercialmente importantes debido a sus diversas aplicaciones, cuya demanda va en aumento frente a las sustancias obtenidas por síntesis química, dada la tendencia cada vez más marcada hacia los productos naturales que se aprecia entre los consumidores. La estandarización del sector de estos aceites ha ayudado a determinar cuáles son los usados preferentemente por la industria, y fijar algunos niveles de calidad para ellos, como se desprende del trabajo del comité técnico ISO para aceites esenciales (ISO/TC 54), en el cual se establecen métodos de análisis y especificaciones de calidad para estos productos, determinándose las características físico-químicas y organolépticas, así como el perfil cromatográfico de los diferentes aceites esenciales.

Dado que la calidad y el precio de algunos aceites se basan a menudo en la cantidad relativa de un determinado componente, la separación y cuantificación de los constituyentes individuales es muy importante, por lo que las técnicas empleadas para el análisis de estas sustancias han evolucionado y mejorado paralelamente a los

requerimientos de calidad exigidos para estos y otros productos. Con ello se obtienen mejores resultados, pudiéndose identificar compuestos que se encuentran a muy baja concentración al desarrollarse instrumentos con límites de detección más bajos. La aplicación de estos métodos analíticos permite caracterizar y autenticar los diferentes aceites, así como detectar adulteraciones.

El incremento en la demanda de aceites, paralelo al incremento de proveedores, origina el desarrollo de métodos rápidos de control de calidad, pudiéndose emplear técnicas como la Espectroscopia Raman, que permite medidas directas sobre secciones de la planta para analizar el aceite esencial sin necesidad de extraerlo. Se trata de una técnica rápida y no destructiva, que proporciona una caracterización aproximada de los aceites, siendo necesarias la Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas para conseguir una caracterización detallada (Strehle *et al.*, 2006).

La normalización de este sector adquiere gran importancia ya que permite facilitar el comercio a nivel mundial. En este sentido, con datos obtenidos en 1994, la producción global estimada para estas sustancias se sitúa por encima de las 42.000 toneladas (t), con un volumen de comercio que supera los 600 millones de dólares. En la Figura I-12 se detalla cómo se distribuye, por países, esta producción (ISO/TC 54, 2004).

Estados Unidos produce casi un 24% del aceite esencial que se comercializa en todo el mundo, seguido de China, que aporta un 18% a este mercado. La producción de aceite esencial en España se sitúa en el 1,6% del total, lo que se traduce en unos 10 millones de dólares.

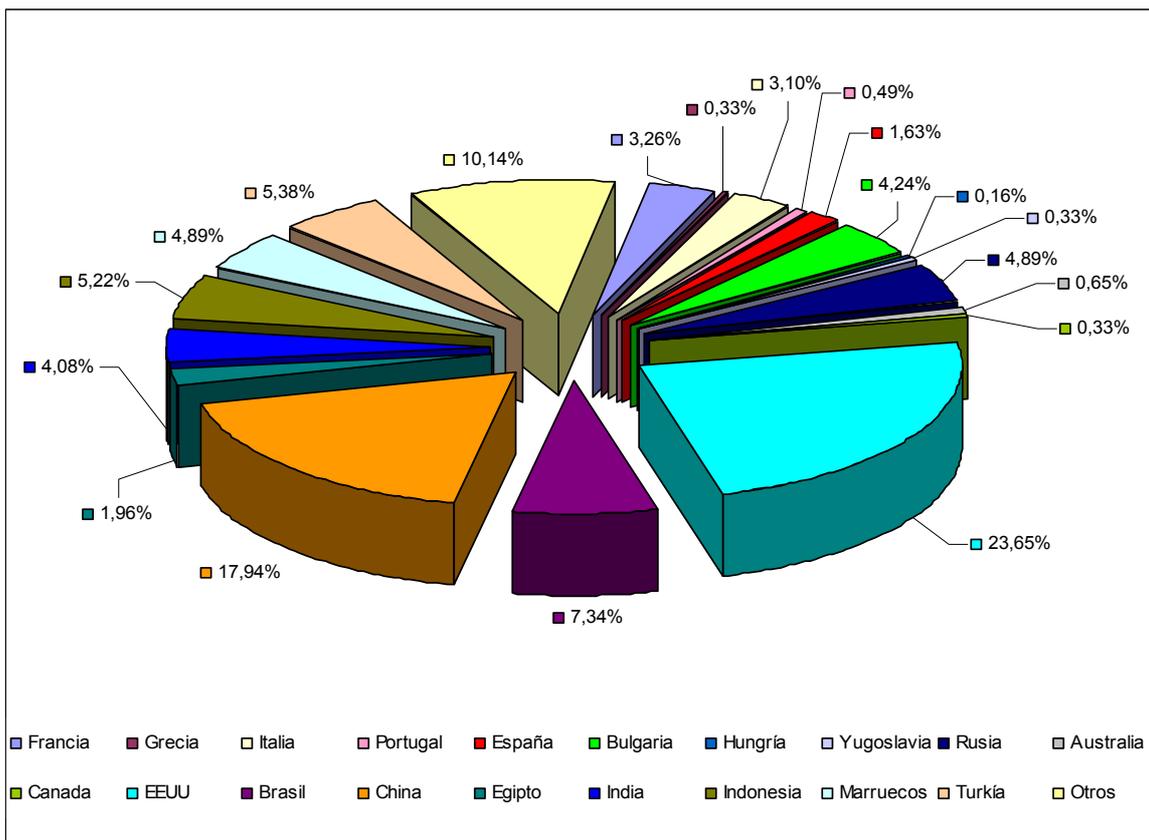


Fig. 1-12. Producción mundial estimada de aceites esenciales (%).

Con datos más recientes, extraídos de las Estadísticas de Comercio Exterior, ESTACOM, del Instituto Español de Comercio Exterior (ICEX), y concernientes a las exportaciones españolas de aceites esenciales, encontramos un volumen de comercio que se acerca a los 40 millones de euros en 2006 (Tabla I-17):

Tabla I-17. Comercio exterior de aceites esenciales.

	2003	2004	2005	2006
<i>Toneladas</i>	2.936	2.803	2.960	3.048
<i>Millones de euros</i>	29,98	32,10	39,43	39,76

### 1. 6. 2. Importancia del tomillo en la economía española.

España es un país con una amplia variedad de condiciones edafoclimáticas, y ello conduce a una gran biodiversidad. Esto convierte a este país en uno de los de mayor riqueza florística de Europa, con una abundante flora aromático-medicinal espontánea, formada por más de un millar de especies, con numerosos endemismos (Muñoz, 1987). Muchos autores de tratados botánicos ponen de manifiesto esta alta especificidad de nuestra flora, donde las especies se desdoblán a su vez en numerosas subespecies como adaptación a los distintos hábitats que ofrece el territorio español.

Esa misma diversidad, que botánicamente es muy deseable, juega en contra de la homogeneidad necesaria para la explotación comercial de las plantas aromáticas y medicinales, que deberían conseguir, al igual que el resto de productos agroalimentarios, un estándar de producción, reproducible en el tiempo en cuanto a cantidad y calidad. Transformar esa biodiversidad en una producción agrícola racionalizada permitiría a la producción aromático-medicinal española tener un alto grado de competitividad (Gómez Orea *et al.*, 1999).

El cultivo de plantas aromáticas puede resultar especialmente interesante para la economía murciana. El microclima de esta región, caracterizado por un clima cálido en las comarcas cercanas a la costa, la mediana altitud y el clima continental del interior, y las sierras que limitan la región, ofrece diferentes y variadas condiciones ambientales, climáticas y ecológicas que son especialmente favorables para el establecimiento de cultivos. El clima y el suelo de esta zona proporcionan una flora aromática silvestre muy diversificada y de imagen apreciada en el mercado internacional, entre la que destacan tomillo, mejorana, romero, salvia española, hinojo y otras especies que suministran materia prima para los envasadores de infusiones y para las industrias de destilación (Gómez Orea *et al.*, 1999).

Emplear esta riqueza en plantas officinales para establecer explotaciones agrícolas también puede repercutir positivamente en el desarrollo industrial de esta región, considerando que las primeras empresas del sector químico y farmacéutico en la Región de Murcia surgieron a partir de la extracción de compuestos procedentes de materias vegetales, como aceites esenciales.

El establecimiento de este tipo de cultivos constituye, por lo tanto, un recurso de desarrollo más en las áreas donde se ubican (Morales, 2002).

El género *Thymus*, cuyo creciente interés se pone de manifiesto con los numerosos estudios sobre sus constituyentes químicos, mejora genética y ampliación de sus áreas de aplicación, tiene uno de los condicionantes más importantes para su desarrollo comercial en la gran variabilidad intraespecífica que encontramos en estas plantas, lo que, como se ha comentado en la justificación de esta memoria, origina un inconveniente añadido al daño ecológico causado por la recolección tradicional de la flora silvestre, ya que la heterogeneidad de los productos obtenidos de esta forma repercute en la comercialización del material recolectado. Por lo tanto, es un hecho que el aprovechamiento industrial de estas plantas debe basarse en el cultivo de especies y ecotipos seleccionados, tanto por el rendimiento y calidad de sus aceites esenciales y producción de material seco, como por su adaptación a las condiciones climáticas o resistencia a plagas. Igualmente, sería necesario introducir especies seleccionadas de interés industrial que no existan espontáneas y cultivarlas en zonas de ecología adecuada (Muñoz, 1987).

Con todo ello se consigue la estandarización de la producción, lo que permite presentar productos homogéneos y asegurar una calidad controlada y adecuada a las expectativas del cada vez más exigente mercado actual.

Es de resaltar, como se indica anteriormente, que la importancia económica del género *Thymus* radica tanto en su aceite esencial como en la producción de hoja seca.

Las sustancias de procedencia natural han experimentado un auge importante en los últimos años, imponiéndose cada vez más entre los consumidores frente a los productos sintéticos. El aceite esencial que contienen las distintas especies de tomillo es por ello un producto con grandes perspectivas para las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria, ya que su composición química le confiere propiedades beneficiosas que responden a esta creciente demanda de productos naturales por parte de la sociedad. Todo ello explica el incremento en el uso de estos aceites en los últimos años, siendo España el productor del 90% del aceite esencial de tomillo que se comercializa en todo el mundo (McGimpsey, 1993). *Thymus zygis* es la especie más utilizada en España por su alto contenido fenólico. No obstante, durante los últimos años se está comercializando en gran cantidad *Th. hyemalis*, dado que su temprana floración (durante la época invernal) le permite ser el primero en estar a disposición del mercado de plantas aromáticas.

A nivel mundial, la producción de aceite esencial de tomillo (*Th. zygis* y *Th. vulgaris*) representa una cantidad de 29 t, con un valor de 1,5 millones de dólares (Gómez Orea *et al.*, 1999), siendo la industria alimentaria la principal receptora de estos productos (ISO/TC 54, 2004).

Igualmente, es importante señalar el desarrollo creciente del comercio de material seco, especialmente hoja, destinado a la obtención de aditivos naturales para la industria alimentaria. Las plantas con usos culinarios, como el tomillo, pueden contener altas concentraciones de antioxidantes, por lo que su inclusión en la dieta contribuye a aumentar la ingesta diaria de estas sustancias (Dragland *et al.*, 2003).

España es uno de los principales productores de hoja seca de tomillo, observándose en la década de los 90 un incremento en la

exportación de este producto, pasando de 855 t en 1992 a 1.600 en 1995, como consecuencia del aumento en la demanda de esta planta. La Región de Murcia exportó más de 1.500 t de hoja de tomillo en 1995, lo que supone el 93% del total nacional. El comercio exterior de este producto en el período 1990–2000 presenta el balance que se muestra en la Figura I-13, realizada según datos de las Estadísticas de Comercio Exterior, ESTACOM (ICEX), en la que se puede apreciar que en el año 2000 las cantidades se sitúan alrededor de las 1.500 t de hoja, lo que da idea de la gran trascendencia que tiene el comercio de esta planta.

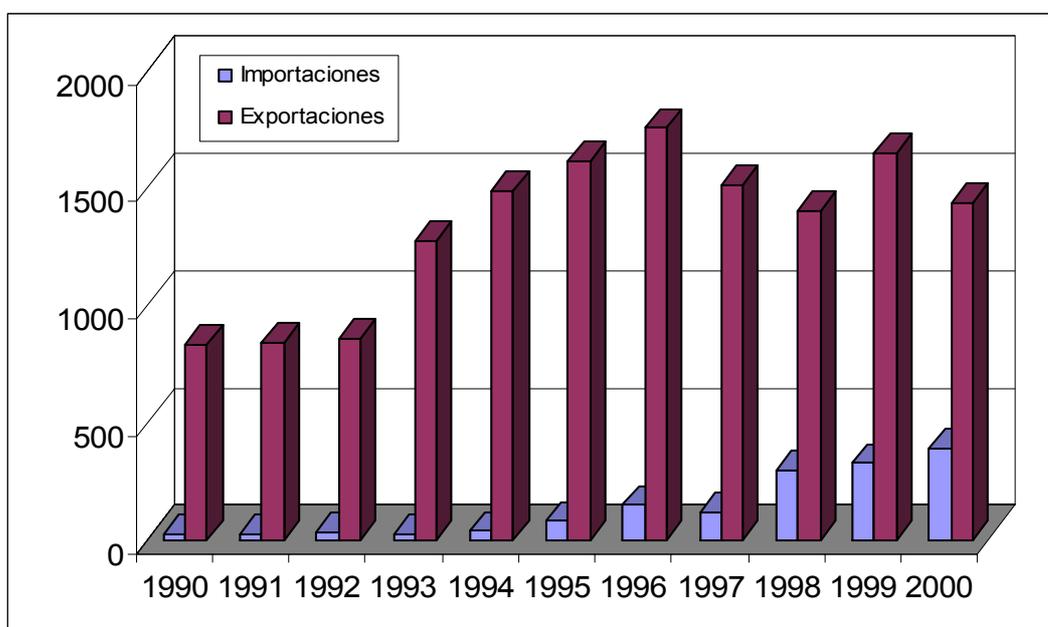


Fig. I-13. Balance del comercio exterior de tomillo sin triturar (toneladas de hoja).

Estados Unidos y Europa, especialmente Francia, Alemania y Reino Unido, son los principales consumidores de tomillo a nivel mundial (Sotomayor, 1998). Es destacable el comercio con el primero, por ser un país con una exigente legislación en materia agroalimentaria. Estados Unidos importa alrededor de 1.000 t de planta seca anualmente, con 1.333 t en el año 2000. España es el proveedor líder de tomillo para este

país y continúa aumentando su cuota de mercado, con un 59% en el año 2000, como queda de manifiesto en la Tabla I-18 (Gil García, 2001).

Tabla I-18. Procedencia y valor de las importaciones de tomillo en EEUU.

País	Millones de dólares			% Cuota		
	1998	1999	2000	1998	1999	2000
España	2,120	3,130	3,049	50,65	58,90	59,20
Turquía	1,262	1,260	1,362	30,16	23,71	26,46
Marruecos	0,222	0,326	0,394	5,32	6,15	7,65
Israel	0,027	0,247	0,122	0,66	4,66	2,38
Francia	0,317	0,158	0,100	7,58	2,98	1,95
Jamaica	0,139	0,099	0,043	3,34	1,86	0,85
China	0,000	0,000	0,028	0,00	0,00	0,56
Polonia	0,000	0,000	0,025	0,00	0,00	0,50
Perú	0,009	0,004	0,008	0,24	0,08	0,17
Méjico	0,000	0,002	0,007	0,00	0,05	0,15
Resto	0,800	0,090	0,010	2,05	1,61	0,13
Total	4,185	5,313	5,151	100	100	100

Fuente: World Trade Atlas

Actualmente, el tomillo continúa siendo una mercancía de gran valor comercial y la demanda de material seco procedente de esta planta sigue creciendo. Las exportaciones españolas se han mantenido en los últimos años cerca de las 1.500 t anuales de hoja, y Murcia ha exportado entre 1.200 y 1.400 t, es decir, alrededor del 95% del total de la producción nacional.

Las importaciones, tanto nacionales como regionales, muestran unos valores mucho más bajos. Tales importaciones encuentran su explicación en la posible insuficiencia del producto nacional para

satisfacer la demanda comercial externa, por lo que serían un medio para complementar los requerimientos del mercado.

La Figura I-14, realizada a partir de la información obtenida de la base de datos de ESTACOM, del ICEX, refleja estas cantidades.

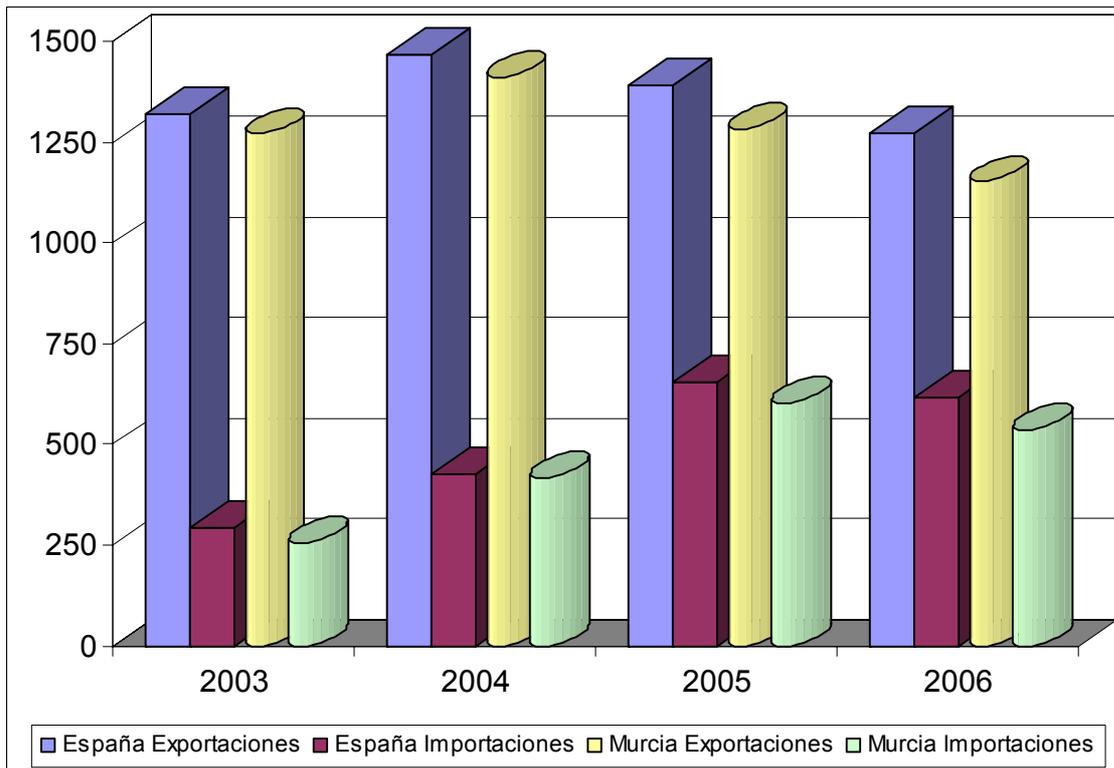


Fig. I-14. Balance del comercio exterior de tomillo sin triturar (toneladas de hoja).

Además, se evidencia cada vez más que los compradores se interesan por especies concretas, con unas características específicas, lo que está obligando a las empresas exportadoras a promover el cultivo de tomillos.

### I. 6. 3. Aplicaciones. Propiedades del tomillo.

La importancia de este género es conocida desde la antigüedad, siendo el tomillo una planta comúnmente utilizada en medicina popular.

Sus propiedades, que determinan las posibles aplicaciones de este género, se deben mayoritariamente a su aceite esencial. El género *Thymus* se caracteriza, como se ha visto en apartados anteriores, por el alto contenido en compuestos fenólicos del aceite esencial de muchas especies, componentes aromáticamente activos, y con propiedades terapéuticas.

Considerando que la composición química de los aceites esenciales es determinante para su actividad biológica, realizar análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas de estos aceites es indispensable para la evaluación de dicha actividad (Daferera *et al.*, 2000).

Entre sus muchos usos, los tomillos se emplean para tratar la dispepsia y otros problemas gastrointestinales (WHO, 1999), ya que tienen propiedades eupépticas, coleréticas, carminativas y antihelmínticas.

Tradicionalmente es una planta muy empleada en las afecciones del aparato respiratorio (tos, bronquitis, laringitis) gracias a su capacidad para actuar como espasmolítico y antitusivo (WHO, 1999), características que se suelen atribuir a los compuestos timol y carvacrol, fenoles simples que se encuentran en el aceite esencial de muchas de estas plantas (Reiter y Brandt, 1985). Pero, si bien estos componentes presentan actividad antiespasmódica, parece que esta propiedad del tomillo se debe a la presencia de flavonas polimetoxiladas en este género (Van den Broucke y Lemli, 1983).

Tanto el aceite esencial de tomillo como su constituyente timol se emplean como antisépticos. Este aceite presenta, además, acción

tonificante y estimulante del sistema inmunológico, del apetito y de la memoria, y favorece la circulación sanguínea.

El timol tiene también actividad antiinflamatoria, ya que disminuye la liberación de metabolitos como prostaglandinas, interleuquinas y leucotrienos (Skold *et al.*, 1998; Yucel-Lindberg *et al.*, 1999).

Un trabajo relativamente reciente (Priestley *et al.*, 2003) sugiere que este compuesto fenólico potencia los receptores del ácido gamma-aminobutírico (GABA), y se ha comprobado igualmente que puede actuar como inhibidor de la agregación plaquetaria (Okazaki *et al.*, 2002).

Algunos agentes terapéuticos, como el anestésico volátil halotano, incluyen timol en su composición como estabilizante, para prevenir su descomposición espontánea.

Aydin *et al.* (2005), llevan a cabo un estudio sobre el efecto de los principales componentes volátiles del aceite esencial de tomillo, incluyendo timol, carvacrol y  $\gamma$ -terpineno, sobre el ADN. Estos autores aplican agentes inductores de alteraciones en el material genético a linfocitos humanos, y comprueban que timol y  $\gamma$ -terpineno a bajas concentraciones reducen significativamente los daños causados en el ADN por estas sustancias, pero elevando la concentración de ambos constituyentes hasta 0,2 mM se observa un incremento en estas alteraciones. El carvacrol, isómero del timol, protege a los linfocitos de la acción de los agentes genotóxicos a concentraciones por debajo de 0,05 mM, pero con una concentración de 0,1 mM este componente causa por sí mismo daños en el genoma.

Una importante aplicación de estas plantas es su utilización como suplemento en alimentación animal. En este sentido, actualmente se está desarrollando en el IMIDA un Proyecto de Investigación basado en el empleo de material destilado procedente de distintas plantas aromáticas, entre las que se encuentra el tomillo, como fuente natural de antioxidantes

endógenos. Se pretende sustituir en parte la alimentación de cabras y ovejas con dicho material, con el fin de comprobar la transferencia a la carne y la leche de las sustancias antioxidantes presentes en el mismo.

Asimismo, la sustitución de los antibióticos usados normalmente en la alimentación de animales de granja por plantas con capacidad antimicrobiana, es otra interesante aportación a las utilidades de estas plantas. Urbanczyk *et al.* (2002) analizan el efecto de una mezcla de dichas plantas, entre las que se encuentra *Thymus vulgaris*, como suplemento alimentario. Los resultados muestran que los animales a los que se suministra esta mezcla presentan el mejor promedio de ganancia de peso corporal, sin que se vea afectada la calidad de la carne, lo que confirma la posibilidad de usar estas plantas como una alternativa a los antibióticos como promotores del crecimiento en alimentación animal.

El timol, componente mayoritario del aceite esencial de *Th. vulgaris*, se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal cuando es ingerido, siendo una pequeña cantidad oxidada a timohidroquinona. Alrededor del 50% de la sustancia absorbida se excreta por el riñón, tanto en forma conjugada como no conjugada, en 24 horas. La timohidroquinona también se excreta vía renal. Por lo tanto, el timol es pronto metabolizado y eliminado tras su ingestión, por lo que los posibles residuos que pudieran quedar en animales tratados con esta sustancia no se consideran tóxicos para los seres humanos (EMEA, 1996).

Es importante destacar que el timol, así como el aceite esencial y la hoja seca de tomillo, están catalogados por la FDA (Food and Drug Administration, EEUU) como alimentos aptos para el consumo humano, y también como aditivos alimentarios. Asimismo, el timol fue evaluado por el Comité de Expertos en Sustancias Aromatizantes del Consejo de Europa en 1992, y se encuentra entre las sustancias cuyo uso como condimento está permitido. La cantidad máxima de timol que se puede incluir en los alimentos como agente aromatizante está establecida en 50 mg/kg, y en bebidas en 10 mg/kg.

Otra de las aplicaciones que merece ser resaltada es el cultivo de plantas clonadas de tomillo y romero para la descontaminación, por métodos biológicos, de suelos, aguas residuales o lodazales contaminados con colorantes portadores de grupos azo, compuestos carcinogénicos generados como residuos por industrias textiles, farmacéuticas, imprentas, y otras explotaciones que suelen emplear tintes y colorantes en sus procedimientos de fabricación. La capacidad de estas plantas de actuar como descontaminantes ha sido estudiada por Zheng y Shetty (2000) con excelentes resultados, observándose que estos colorantes estimulan la respuesta defensiva de los clones a través del incremento de la actividad peroxidasa, lo cual facilita la conversión de los compuestos fenólicos presentes en estas plantas en ligninas. El proceso de lignificación ayuda a polimerizar los colorantes sobre la pared celular, con lo que se eliminan del medio.

A pesar de sus propiedades, es igualmente importante tener en cuenta la potencial toxicidad del aceite esencial de estas plantas. Por ello, cuando se emplea este producto con fines terapéuticos, se debe aplicar a las dosis adecuadas. Por ejemplo, la LD<sub>50</sub> oral en ratas para el aceite esencial de *Th. vulgaris*, con una cantidad relativa de timol de 30–50%, es de 2,8 a 4,7 gr/Kg de peso corporal. Para el timol puro, la LD<sub>50</sub> es de 980 mg/Kg de peso corporal (EMEA, 1998).

Por otra parte, un estudio realizado sobre personas que trabajan habitualmente en la manipulación de material vegetal sugiere que el polvo procedente de las plantas, especialmente tomillo, puede ocasionar obstrucción aguda de las vías respiratorias, lo que indica la necesidad de tomar las medidas profilácticas adecuadas cuando se realiza este trabajo (Golec *et al.*, 2005).

Un uso racional de estos recursos es imprescindible para conseguir el efecto positivo que los productos naturales pueden ofrecer. Las propiedades beneficiosas de las plantas aromáticas quedan patentadas en los numerosos trabajos publicados al respecto, en los que se comprueba

la capacidad del aceite esencial obtenido de las diversas especies del género *Thymus* para actuar como bactericida y antioxidante, e igualmente como antifúngico, antiparasitario y plaguicida. Todo esto resulta particularmente importante en un momento en el que la sociedad demanda, principalmente en lo referente a la industria alimentaria, productos seguros ante los problemas que una manipulación o conservación inadecuadas pueden ocasionar.

A continuación se expone un breve repaso de algunas de estas publicaciones, que sumadas a las ya mencionadas, ponen de manifiesto el interés que despiertan estas plantas en la comunidad científica.

#### **I. 6. 3. 1. Actividad antibacteriana.**

En la actualidad, existe un notable interés por el uso de compuestos antimicrobianos derivados de plantas como conservantes naturales de los alimentos, coincidiendo con los interrogantes acerca de la salubridad de los compuestos sintéticos usados con este fin. El Diccionario de la Real Academia Española define como “natural” aquello “perteneciente o relativo a la naturaleza”. Si bien esta definición engloba sustancias de distinta procedencia, es en el Reino Vegetal donde encontramos la mayor variedad de productos potencialmente útiles, aplicables especialmente a afecciones causadas por microorganismos (Domingo y López-Brea, 2003).

Entre estos productos se encuentran los aceites esenciales, cuyo posible uso por parte de la industria alimentaria justifica los diversos estudios llevados a cabo para determinar las propiedades antimicrobianas de estas sustancias. En este sentido, el aceite esencial de tomillo se encuentra entre aquellos que presentan los mejores resultados (Kalemba y Kunicka, 2003; Singh *et al.*, 2003), siendo especialmente efectivos los compuestos fenólicos presentes en muchos de estos aceites (Rasooli y Mirmostafa, 2003; Rasooli, 2005). Se ha comprobado además que existe

un efecto sinérgico entre distintos componentes del aceite esencial, como ocurre, por ejemplo, entre el carvacrol y su precursor p-cimeno (Ultee *et al.*, 2000). Por ello es importante mencionar que, si bien la efectividad frente a bacterias de los aceites esenciales que contienen compuestos fenólicos, especialmente timol y carvacrol, se suele atribuir a la presencia de dichos compuestos, también es necesario tener en cuenta otros constituyentes de estos aceites por sus posibles efectos sinérgicos o antagonicos (Vardar-Ünlü *et al.*, 2003).

Las condiciones físicas que mejoran la actuación de estos aceites son pH bajo, baja temperatura y bajos niveles de oxígeno (Burt, 2004). Los ambientes anaerobios favorecen la acción tanto del aceite esencial de tomillo como del timol frente a microorganismos como *Salmonella typhimurium* o *Staphylococcus aureus* (Juven *et al.*, 1994).

Por otra parte, las bacterias Gram-positivas parecen ser ligeramente más sensibles a la acción de los aceites esenciales que las Gram-negativas. (Burt, 2004).

Debido a la interacción entre los componentes del aceite esencial y los constituyentes de los alimentos, la eficacia antimicrobiana de estas sustancias se reduce cuando se emplean sobre productos alimenticios, por lo que es necesaria una mayor concentración de aceite para alcanzar resultados similares a los obtenidos "in vitro" (Singh *et al.*, 2003).

En un estudio realizado por Shapiro y Guggenheim (1995) sobre bacterias que afectan a la cavidad bucal, se observa que la perforación de la membrana plasmática de la célula bacteriana, que provoca una rápida salida de los constituyentes intracelulares, parece ser el principal mecanismo de acción del timol, fenol de importancia contrastada en muchos aceites. Este compuesto induce un descenso en el ATP intracelular como consecuencia directa de la infiltración, y además, en algunas bacterias también inhibe las rutas de síntesis de esta

biomolécula. Los efectos del timol sobre el potencial de membrana son probablemente resultado de la infiltración de sustancias que provoca este compuesto.

Evans y Martin (2000) comprueban igualmente la efectividad del timol como inhibidor del crecimiento de microorganismos ruminales, como *Streptococcus bovis* o *Selenomonas ruminantium*.

Por su parte, el carvacrol, compuesto fenólico isómero del timol, puede actuar contra el patógeno *Bacillus cereus* (Ultee *et al.*, 2002). Este componente muestra un marcado carácter hidrofóbico, por lo que se acumula en la membrana plasmática de la célula bacteriana, lo que, al igual que ocurre con el timol, afecta a su integridad y origina una disminución del potencial de membrana. De este trabajo se desprende que el carvacrol actúa como intercambiador de protones, con lo que reduce el gradiente de pH a través de la membrana plasmática. Este compuesto, que presenta un radical hidroxilo en posición *orto* (Figura I-15), difunde a través de dicha membrana hacia el citoplasma de la célula, donde libera su protón. Posteriormente, vuelve al exterior celular transportando un ión potasio (u otro catión) desde el citoplasma. El catión es liberado y el carvacrol capta un nuevo protón, repitiendo el ciclo. El resultado es el agotamiento de los depósitos de ATP de la célula, lo que conduce a un deterioro de los procesos vitales y finalmente a la muerte de la bacteria.

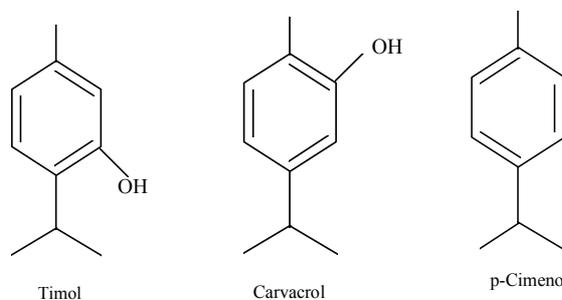


Fig. I-15. Estructura química de timol, carvacrol y p-cimeno.

De esta forma, timol (con el radical hidroxilo localizado en posición *meta*) y carvacrol presentan una fuerte acción antibacteriana. Sin embargo, p-cimeno, precursor biológico de estos dos constituyentes del aceite esencial de tomillo, carece de grupo hidroxilo y muestra una menor actividad, lo que sugiere que este radical está relacionado con la toxicidad frente a microorganismos.

En este trabajo se observa también un efecto sinérgico entre carvacrol y p-cimeno, que puede ser debido a que este precursor contribuye a la desestabilización de la membrana plasmática de la bacteria, con lo que se favorece la entrada de carvacrol en la célula.

Para estos autores, la posición que ocupa el grupo hidroxilo no parece afectar a la actividad antimicrobiana.

Timol y carvacrol se muestran también activos frente a bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus* (Lambert *et al.*, 2001). Dichos componentes muestran un efecto aditivo que provoca la inhibición del crecimiento de estos microorganismos, al dañar la integridad de la membrana plasmática, afectando al pH y al equilibrio de iones inorgánicos.

Una reciente publicación remarca el carácter lipofílico de timol y carvacrol, así como de otros constituyentes que se pueden encontrar en el aceite de tomillo, como limoneno o eugenol, cualidad que permite a estas moléculas interactuar con las membranas bacterianas, alterando su estructura y haciéndolas más permeables (Di Pasqua *et al.*, 2006). Estos autores han analizado las variaciones que se producen en la composición de los ácidos grasos de dichas membranas como un mecanismo de estrés adaptativo de las bacterias inducido por concentraciones subletales de estos compuestos activos. Las células responden a estos agentes incrementando la concentración de ácidos grasos insaturados, lo que favorece la fluidez de la membrana bacteriana.

En un trabajo publicado en 2005, Di Pasqua *et al.* comprueban la actividad bactericida y bacteriostática de aceites esenciales obtenidos de diversas plantas sobre bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* y bacterias del ácido láctico, siendo el aceite de tomillo uno de los que actúa con mayor efectividad y frente al mayor número de microorganismos testados.

*Escherichia coli* es una bacteria sobre la que se han realizado diversos ensayos, ya que se trata de un patógeno que se puede encontrar en una amplia variedad de alimentos, ocasionando enfermedades que afectan a humanos y animales (Buchanan y Doyle, 1997). Tanto el aceite esencial obtenido de *Thymus vulgaris* como el procedente de *Origanum vulgare* (orégano) ejercen una fuerte acción sobre este microorganismo, que se observa en un amplio rango de temperaturas (Burt y Reinders, 2003). Un estudio más reciente (Burt *et al.*, 2005) analiza el efecto de los aceites esenciales de tomillo y orégano y sus cuatro componentes mayoritarios (timol, carvacrol, p-cimeno y  $\gamma$ -terpineno) sobre esta bacteria, comprobando que timol y carvacrol presentan una clara acción bactericida, siendo su efectividad frente a *E. coli* muy similar. La actividad antimicrobiana del aceite esencial depende de estos dos componentes, que tienen un efecto aditivo, y no se ven influenciados en este caso por los otros constituyentes mayoritarios de dicho aceite, los precursores p-cimeno y  $\gamma$ -terpineno, que aparentemente no actúan contra esta bacteria. La ausencia de sinergismo entre carvacrol y p-cimeno contrasta con lo expuesto por otros autores (Ultee *et al.*, 2000; Ultee *et al.*, 2002). Esto podría deberse a las diferencias fisiológicas existentes entre las bacterias empleadas en cada uno de los estudios, ya que la estructura de la pared celular de *E. coli* y otras bacterias Gram-negativas puede inhibir la acción del p-cimeno.

Al igual que en trabajos anteriores, se ha demostrado también sobre *E. coli* que el timol destruye la integridad y afecta al potencial eléctrico de la membrana plasmática de la célula bacteriana, lo que

finalmente conduce a la lisis celular (Vasala *et al.*, 1999). La ruptura ocurre en los cinco minutos siguientes a la adición de timol.

Investigando la actividad de diversos agentes antimicrobianos obtenidos de plantas, Dorman y Deans (2000) determinan que el aceite esencial de tomillo es el que presenta un mayor espectro de actuación, y, al estudiar los componentes por separado, estos autores confirman la mayor efectividad de los compuestos fenólicos presentes en estos aceites, especialmente timol y carvacrol, siendo p-cimeno el constituyente menos activo. En este ensayo queda también patente la importancia del grupo hidroxilo en la estructura fenólica, ya que se puede apreciar una gran diferencia entre la actividad antibacteriana del carvacrol y la de su metil éter, que es un componente relativamente poco efectivo, siendo también importante para los autores la posición que ocupa dicho grupo en el anillo bencénico, contrariamente a lo reflejado con anterioridad en este apartado. Coinciden, sin embargo, con lo expuesto por Domingo y López-Brea (2003), que afirman que la presencia de grupos hidroxilo en los compuestos fenólicos está relacionada con la toxicidad de dichos compuestos, además de plantear que la posición de estos radicales influye en la efectividad de los fenoles para actuar contra bacterias.

El género *Shigella* incluye bacterias responsables de patologías intestinales serias (disentería bacilar). Bagamboula *et al.* (2004) estudian la actividad del aceite esencial de tomillo y sus constituyentes fenólicos timol y carvacrol sobre *S. sonnei* y *S. flexneri*, constatando su efectividad en la inhibición del crecimiento de estas bacterias.

Se puede afirmar que el timol previene la putrefacción y la detiene cuando ha comenzado. En este sentido se ha ensayado con éxito la acción de timol y carvacrol contra microorganismos del género *Erwinia* (Horváth *et al.*, 2002), capaces de degradar fermentativamente polisacáridos complejos como la pectina, pudiendo de esta forma causar enfermedades en plantas. Especies de este género de importancia en

patología vegetal frente a las que actúan estos fenoles son *E. carotovora*, bacteria del suelo que infecta cultivos de zanahoria y otros vegetales como patatas, cebollas, tomate, lechuga, etc, tanto en el campo como en el almacén, y que produce enzimas que destruyen el material cementante (de unión) entre las células, dando lugar a una enfermedad llamada *podredumbre blanda*, y *E. amylovora*, causante del llamado *fuego bacteriano*, enfermedad que afecta a frutales de pepita.

Los aceites esenciales ricos en compuestos fenólicos parecen ser los más efectivos ante las infecciones causadas por microorganismos, pero hay estudios que demuestran que aceites con otros componentes mayoritarios, como los de *Thymus albicans* o *Th. mastichina*, con 1,8-cineol como principal constituyente, presentan también resultados positivos frente a bacterias como *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* o *Listeria monocytogenes* (Faleiro *et al.*, 1999). Igualmente, el alcohol terpénico linalol es activo frente a bacterias del género *Leishmania* (Rosa *et al.*, 2003), y otros microorganismos como *Citrobacter freundii*, *Clostridium sporogenes* o *Lactobacillus plantarum* (Dorman y Deans, 2000). Los alcoholes poseen más actividad bactericida que bacteriostática, desnaturalizando las proteínas de los microorganismos frente a los que actúan.

En conclusión, los aceites esenciales son efectivos contra un amplio rango de microorganismos, pudiendo actuar como agentes terapéuticos para el tratamiento de infecciones microbianas en humanos y animales, sustituyendo a los antibióticos usados tradicionalmente; también se pueden emplear como desinfectantes, siendo especialmente útiles en casos de aire contaminado o superficies de difícil acceso, dado su carácter volátil. Pero el uso como conservantes de alimentos es el más importante de estos productos, ya que añadidos en pequeñas cantidades, pueden retrasar la contaminación microbiológica y el deterioro de los mismos, sin que se afecten sus propiedades organolépticas (Dorman y Deans, 2000).

### I. 6. 3. 2. Actividad antioxidante.

La oxidación es un proceso natural tanto en sistemas biológicos como en productos alimentarios.

Se define como antioxidante cualquier sustancia capaz de retrasar o inhibir la oxidación de un sustrato por un radical libre. El antioxidante puede actuar a baja concentración, y ejerce su acción a través de su propia oxidación, ya que su estructura química le permite reaccionar fácilmente con los radicales libres, protegiendo de esta forma a los sustratos potencialmente oxidables de la acción de tales agentes. Dichos sustratos pueden ser los lípidos presentes en las membranas celulares, cuya oxidación tiene lugar como consecuencia de la formación de radicales libres en células y tejidos. Este proceso conduce a un descenso de la fluidez de dichas membranas, afectando a su estructura y función (Slater *et al.*, 1987).

Dado que el uso de antioxidantes sintéticos se ve restringido por los problemas de toxicidad que pueden presentar (Lindenschmidt *et al.*, 1986; Grillo y Dulout, 1997), tanto la medicina como la industria alimentaria muestran un considerable interés por el desarrollo de antioxidantes naturales de origen vegetal, especialmente los procedentes de plantas comestibles, (Haraguchi *et al.*, 1996).

Las plantas medicinales y aromáticas son una fuente potencial de sustancias antioxidantes (Aeschbach *et al.*, 1994; Grassmann *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005). Tales productos naturales tienen capacidad para captar los radicales libres y proteger células y organismos de daños producidos por estrés oxidativo, considerado causa de envejecimiento, enfermedades degenerativas y cáncer (Cozzi *et al.*, 1997), por lo que el empleo de estas plantas puede ser de gran importancia en la salud humana y animal.

En lo que se refiere a la industria alimentaria, la autooxidación de los lípidos es un fenómeno que provoca un descenso en la calidad de los alimentos, afectando a su color, aroma, valor nutritivo y funcionalidad, y por ello, retrasar este proceso es un objetivo importante para este sector.

La importancia de los fenómenos oxidativos explica los numerosos trabajos realizados con el objeto de comprobar el efecto protector de diferentes géneros y especies vegetales frente a estos procesos.

En este sentido, Lee y Shibamoto (2002) realizan un estudio de la actividad antioxidante de los componentes volátiles de varias plantas, siendo el tomillo aquella con la que se consiguen los mejores resultados, con un efecto inhibitorio similar al de  $\alpha$ -tocoferol o BHT (butilhidroxitolueno).

Schwarz y Ernst (1996) publican un interesante trabajo en el que se analizan los compuestos antioxidantes presentes en diferentes especies de tomillo, entre las que se encuentra *Thymus vulgaris*. Estos autores identifican un nuevo componente, p-cimen-2,3-diol, aislado por primera vez de hojas de tomillo, y que parece tener mayor poder antioxidante que timol y carvacrol, mejorando también la actividad de  $\alpha$ -tocoferol y BHA (butilhidroxianisol).

Youdim *et al.* (2002) llevan a cabo un estudio de las propiedades antioxidantes del aceite esencial de *Th. zygis* y sus componentes mayoritarios, constatando una efectividad para estas sustancias que seguiría el siguiente orden:

Aceite esencial > Timol > Carvacrol > $\gamma$ -Terpineno > Mirceno > Linalol > p-Cimeno > Limoneno > 1,8-Cineol > $\alpha$ -Pineno
---

Todas las sustancias ensayadas presentan actividad antioxidante, aunque, como se desprende del trabajo de estos autores, ningún componente en solitario es más efectivo que el aceite esencial en conjunto.

Asimismo, ninguno de los constituyentes testados muestra una actividad prooxidante importante, lo que sugiere que el aceite de esta

especie de tomillo puede ser un producto interesante para ser utilizado en la industria alimentaria y como suplemento dietético.

Se ha comprobado, por ejemplo, que suplementar la alimentación en ratas con aceite esencial de tomillo (*Th. vulgaris*) contribuye a que estos animales conserven una capacidad antioxidante favorable durante toda su vida (Youdim y Deans, 1999a). En otro trabajo, estos mismos autores observan que la ingestión diaria de este aceite (42,5 mg/Kg de peso/día) mantiene elevados niveles de ácidos grasos poliinsaturados en tejidos de rata (Youdim y Deans, 1999b). El timol es el principal constituyente del aceite esencial empleado en este ensayo, con una concentración relativa del 49%. Pero este compuesto fenólico administrado en solitario no tiene un efecto significativamente superior, lo que parece indicar que existen otros componentes en el aceite esencial que también contribuyen a su actividad antioxidante, hecho que se confirma en trabajos posteriores, como el mencionado anteriormente realizado por Youdim *et al.* (2002), y otros estudios efectuados sobre especies distintas de tomillo, también con timol como componente mayoritario (Vardar-Ünlü *et al.*, 2003).

El resultado positivo de incorporar aceites esenciales a la dieta ya se había constatado con anterioridad (Deans *et al.*, 1993), consiguiéndose un incremento en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados y de enzimas claves en el metabolismo lipídico en los animales tratados. Dado que durante el proceso de envejecimiento del animal se produce un descenso en las cantidades de estos componentes, los aceites procedentes de plantas como el tomillo, capaces de invertir esta tendencia, podrían ser de gran interés en medicina.

En la familia *Labiatae*, el timol aparece siempre acompañado de su isómero carvacrol, y ambos son los constituyentes del aceite esencial de tomillo más estudiados en cuanto a su actividad antioxidante. Yanishlieva *et al.* (1999) comparan la efectividad de ambos componentes,

concluyendo que durante la oxidación de los lípidos a temperatura ambiente, el timol es mejor antioxidante que el carvacrol, lo que puede ser debido a la diferente posición del grupo fenólico en el timol respecto al carvacrol.

Como se ha expuesto con anterioridad, la composición química de los aceites esenciales es determinante en su actividad. Tepe *et al.* (2005) analizan el comportamiento antioxidante de dos variedades de *Thymus sipyleus* que presentan diferencias en cuanto a los constituyentes de su aceite esencial, ya que en una de ellas se identifican mayoritariamente alcoholes como borneol (11,2%), en tanto que la otra variedad se caracteriza por la presencia de los fenoles carvacrol (58,1%) y timol (20,5%). Los autores concluyen que los aceites fenólicos se muestran más efectivos en todas las pruebas realizadas.

### **I. 6. 3. 3. Actividad Antifúngica.**

La aplicación de sustancias químicas para tratar las infecciones por hongos puede provocar el desarrollo de resistencia al producto aplicado.

Si se emplean altas concentraciones de estas sustancias para combatir los organismos resistentes, se aumenta el riesgo de que aparezcan altos niveles de residuos tóxicos en los productos tratados. Cuando estos productos son frutas almacenadas, el problema puede ser importante porque a menudo esas frutas se consumen en un corto espacio de tiempo tras la cosecha.

*Penicillium digitatum* es un moho patógeno que afecta comúnmente a cítricos tras la recolección, causando el llamado moho verde de los cítricos, que origina una depreciación del producto y que en muchos casos no se pueda comercializar.

Daferera *et al.* (2000) estudian el efecto de diferentes aceites esenciales y sus constituyentes mayoritarios sobre este hongo,

consiguiendo una inhibición de su crecimiento con concentraciones relativamente bajas de estos aceites. Entre las plantas empleadas se encuentra *Thymus vulgaris*, con una cantidad relativa de timol del 63,6%, y un 2,2% de carvacrol. Comprobando la efectividad de los dos constituyentes por separado, estos autores observan que, si bien ambos presentan actividad antifúngica, se requiere una menor concentración de carvacrol para conseguir una inhibición del crecimiento de *Penicillium digitatum*, por lo que este compuesto sería más efectivo que el timol en el tratamiento de dicho hongo.

Una conclusión interesante de este estudio es el efecto sinérgico que parecen tener ambos componentes. Así, a la misma concentración, el aceite esencial obtenido de *Th. vulgaris* (63,6% de timol + 2,2% de carvacrol = 65,8%) resulta más tóxico para *Penicillium digitatum* que el extraído de otra de las plantas empleadas en este ensayo, *Origanum dictamnus*, con un 78% de timol.

En un trabajo posterior, Daferera *et al.* (2003), evidencian que aceites esenciales ricos en timol y carvacrol inhiben también el crecimiento de otros hongos, como *Botrytis cinerea* o *Fusarium solani*, en tanto que aceites con otros constituyentes mayoritarios, como linalol o eucaliptol, presentan una menor actividad inhibitoria.

*Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* son los causantes de la podredumbre post-cosecha que provoca considerables pérdidas durante el almacenamiento y comercialización de las fresas. Bhaskara Reddy *et al.* (1998) analizan las posibilidades del empleo del aceite esencial de *Th. vulgaris* para combatir esta infección, concluyendo que dicho aceite, con una concentración de timol que oscila entre 9,5–18,1%, y una cantidad relativa de carvacrol de 2,7–8,9%, muestra un importante potencial antimicótico. Las plantas empleadas en este ensayo presentan un contenido en linalol de 3,2–3,3%, que podría actuar sinérgicamente con timol y carvacrol, aunque este componente en solitario sea menos activo que los dos compuestos fenólicos.

Entre distintas plantas, el aceite obtenido de *Th. vulgaris* resulta ser el mejor fungicida frente a *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Fusarium solani* y *Colletotrichum lindemuthianum* (Zambonelli *et al.*, 1996), propiedad que estos autores atribuyen a su contenido en timol, que alcanza el 50,06%. Aceites con concentraciones elevadas de carvacrol, como el de *Th. revolutus*, en el que se puede medir hasta un 43,1% de este fenol, presentan también propiedades antifúngicas (Karaman *et al.*, 2001). Igualmente se ha demostrado la efectividad del aceite esencial de tomillo contra especies de hongos pertenecientes a los géneros *Eurotium*, *Aspergillus* y *Penicillium* (Guynot *et al.*, 2003).

Por otra parte, las infecciones causadas por hongos de importancia clínica para los humanos, como los géneros *Candida*, *Cryptococcus* o *Histoplasma*, además de los ya mencionados *Aspergillus*, *Rhizopus* o *Fusarium*, han mostrado un incremento importante en los últimos años, lo que unido a la resistencia que han empezado a mostrar estos organismos frente a los agentes empleados como antimicóticos, han llevado a la búsqueda de terapias alternativas basadas en productos naturales, con mayor espectro de acción y menores efectos adversos, considerando que la naturaleza proporciona una gran variedad de moléculas bioactivas que podrían ser utilizadas como base para la creación de nuevos medicamentos (Mesa *et al.*, 2004). En este sentido, los aceites esenciales obtenidos de *Th. vulgaris* o *Th. zygis*, ricos en timol, muestran actividad frente a hongos patógenos como *Cryptococcus neoformans*, y especies de *Saprolegnia* y *Zygorhynchus* (WHO, 1999). Igualmente, *Th. pulegioides*, especie capaz de sintetizar altos contenidos de timol y carvacrol, actúa frente a *Candida*, *Aspergillus* y hongos dermatofitos (Pinto *et al.*, 2006). La actividad del aceite esencial de esta planta se basa principalmente en la reducción del contenido en ergosterol de la membrana citoplasmática de las células fúngicas, lo que afecta a su fluidez e integridad.

#### I. 6. 3. 4. Actividad Antiparasitaria y Plaguicida.

El timol es un ingrediente activo en plaguicidas registrado por la EPA (United States Environmental Protection Agency) para ser usado como repelente para bacterias y hongos patógenos que infectan animales domésticos, o como desinfectante médico. También se emplea para combatir plagas causadas por ratas, pájaros, etc.; e igualmente actúa frente a algunos virus, incluyendo el VIH-I (EPA-738-F-93-010, septiembre 1993).

Esta sustancia se considera constituyente de una mezcla de compuestos orgánicos que pueden ser rápidamente degradados en el medio ambiente hasta compuestos elementales por procesos biológicos, físicos y/o químicos normales, que suelen existir en las zonas donde se aplica. Como plaguicida, el timol actúa frente a procesos infecciosos que afectan a animales, de manera que su presencia no resulta tóxica para los animales tratados pero sí para los microorganismos que provocan la infección. Si se emplea de la forma adecuada, el timol no debe provocar efectos adversos sobre los seres humanos ni el medio ambiente. Se sabe que este componente produce irritación cuando es inhalado, o tiene contacto con la piel o los ojos. Según la EPA, la toxicidad causada por el timol es de Categoría III (la Categoría I señala el grado más agudo de toxicidad, y la Categoría IV el más bajo).

El tratamiento con timol es un método muy eficaz para combatir la varroasis de las abejas, causada por el ácaro *Varroa jacobsoni*. Este parásito afecta a estos insectos en todos los estadios de su desarrollo, lo que requiere tratamientos sistemáticos que se deben realizar anualmente. El timol es un compuesto volátil y, por lo tanto, parte del producto se pierde por evaporación. Esto se debe tener en cuenta a la hora de aplicarlo, ya que se ha comprobado que existe una relación directa entre la cantidad de timol evaporada y la eficacia acaricida del tratamiento (Higes y Llorente, 1996). Para que esta sustancia cumpla su función debe

entrar en contacto con las abejas y mantener una concentración lo más homogénea posible dentro de la colmena (Carmona *et al.*, 2002). Es interesante destacar que el timol no resulta especialmente tóxico para las abejas a las dosis apropiadas, y presenta un bajo poder residual en la miel. Tratar las colmenas con este compuesto no altera la condición de miel ecológica.

Se ha estudiado el empleo del aceite esencial de *Thymus vulgaris* como repelente de mosquitos, comprobándose la efectividad de sus constituyentes timol, p-cimeno, linalol, carvacrol y  $\alpha$ -terpineno, siendo los dos últimos especialmente activos (Park *et al.*, 2005).

#### **I. 6. 3. 5. Extractos.**

Por otra parte, al hablar de las propiedades terapéuticas de estas plantas se debe considerar que, además de aceites esenciales, los tomillos poseen componentes químicos no volátiles que presentan cualidades igualmente interesantes. Estos compuestos se extraen bien directamente de la planta o bien a partir de material vegetal destilado con anterioridad, utilizando disolventes apropiados y concentrando posteriormente la solución obtenida.

El extracto de estas plantas es rico en compuestos polifenólicos, los cuales han demostrado tener actividad antivírica y antimutagénica (Ikken *et al.*, 1999). En este sentido se ha comprobado que la luteolina, una flavona constituyente del extracto de *Thymus vulgaris*, suprime la acción mutagénica del carcinógeno Trp-P-2, que se forma durante los procedimientos de cocción de los alimentos (Samejima *et al.*, 1995). Las propiedades anticancerígenas de los polifenoles se ponen igualmente de manifiesto en otros trabajos, como los realizados por Carrol *et al.* (1999) o Kawaii *et al.* (1999).

En cuanto a la actividad antibacteriana, la baicaleína, otra flavona identificada en el extracto de *Th. vulgaris*, potencia el efecto antimicrobiano de la tetraciclina frente a *Staphylococcus aureus* (Fujita *et al.*, 2005). Otros trabajos estudian el potencial antibacteriano de distintos extractos vegetales (tomillo, hinojo, salvia, té y menta), determinando que el de tomillo es el más efectivo contra bacterias patógenas comunes y bacterias del ácido láctico, por lo que estos concentrados se consideran alimentos naturales o aditivos alimentarios que pueden ejercer un efecto beneficioso sobre el aparato digestivo de humanos y animales (Sagdic *et al.*, 2005).

El extracto acuoso obtenido a partir de *Th. vulgaris* se muestra como uno de los más eficaces frente a bacterias como *Helicobacter pylori* (Tabak *et al.*, 1996). También se ha ensayado con éxito la capacidad para actuar contra diferentes microorganismos de los extractos de otras especies de tomillo, como *Th. serpyllum* (Alzoreky y Nakahara, 2003), o *Th. spathulifolius* (Sokmen *et al.*, 2004). En este último artículo, los autores comparan el efecto del aceite esencial de la planta, con timol (36,5%) y carvacrol (29,8%) como constituyentes mayoritarios, con el extracto metanólico obtenido de la misma. El resultado muestra la fuerte actividad antimicrobiana del aceite esencial, tanto frente a bacterias como frente a la mayoría de las especies de hongos testadas por estos autores, en tanto que el extracto actúa de forma moderada frente a bacterias y no es efectivo frente a hongos. En el mismo trabajo se evalúa la capacidad antioxidante de las dos sustancias, con resultados positivos para ambas.

El efecto antioxidante del extracto de tomillo es analizado en otros trabajos, como el realizado por Haraguchi *et al.* (1996), que comprueban las propiedades del extracto de *Th. vulgaris* como protector de la oxidación de los lípidos presentes en las membranas biológicas, identificando en dicho extracto componentes con un importante poder antioxidante. A partir del concentrado de esta planta se han aislado

flavonoides que muestran una actividad comparable a la del BHT, el  $\alpha$ -tocoferol o el ácido L-ascórbico (Miura *et al.*, 2002).

En un estudio realizado por Venskutonis *et al.* (2005) se demuestra que el extracto de tomillo es un inhibidor efectivo de xantina oxidasa, enzima del grupo de las oxido reductasas que produce radicales libres de oxígeno.

Los constituyentes fenólicos parecen ser los principales responsables de las propiedades antioxidantes de estas sustancias (Dorman *et al.*, 2003), aunque estos autores no aprecian una completa relación entre la efectividad como antioxidante de un extracto y el contenido total de compuestos fenólicos que presenta. Sin embargo, Soares *et al.* (1997), evaluando la efectividad como antioxidantes de concentrados obtenidos a partir de *Thymus zygis*, determinan que existe una aparente relación entre el potencial antioxidante del extracto de esta planta y los fenoles totales que contiene.

## **I. 7. ADAPTACIÓN AL CULTIVO.**

El aprovechamiento de la flora aromática y medicinal española se ha basado tradicionalmente en el trabajo de los recolectores locales, conocedores por lo general de las poblaciones más abundantes. Con ello se ha conseguido una producción con una alta calidad en cuanto al contenido en principios activos, pero una escasa presentación y manipulación, por lo que nuestra aportación a este tipo de mercado siempre ha sido proporcionar productos en bruto, con muy poca elaboración y de escaso valor añadido.

La creación de cultivos de plantas officinales aseguraría la obtención de productos con las suficientes garantías de disponibilidad y calidad que requiere el competitivo comercio actual. Sin embargo, el desarrollo de empresas productoras de este tipo de plantas se enfrenta

actualmente a una serie de inconvenientes, entre los que destacan, como citan Gómez Orea *et al.* (1999), los siguientes:

1. Ausencia o déficit grave de material vegetal de multiplicación al no existir ningún centro, oficial o privado, que suministre semillas o plantas con los requisitos que hoy día exigen la producción y el mercado.
2. Desinformación y falta de conocimientos técnicos en los agricultores, que en bastantes ocasiones no abordan estas producciones por ausencia de asesoramiento.
3. Atonía general en las pequeñas empresas que se dedican a la distribución comercial, incluida la exportación, y no se arriesgan a promover cultivos y plantaciones.

Resultaría interesante fomentar la investigación que conduce a la selección y mejora genética de las plantas aromáticas y medicinales, para obtener nuevas variedades de cultivo, más productivas y con elevado rendimiento en principios activos de calidad contrastada.

Tiene gran importancia por ello la generación de *plantaciones experimentales* antes de establecer cultivos a escala comercial, a partir de las cuales se pueden determinar las condiciones más adecuadas para obtener el máximo rendimiento de tales cultivos, dado que se deben considerar distintos parámetros que afectan a la producción de estas plantas, tales como la constitución genética de cada especie, la ecología de la zona de cultivo, la meteorología, o la época y el método de recolección (Muñoz, 1987). Además, estos ensayos se pueden convertir en una fuente de material vegetal selecto, lo que aportaría una solución al problema de carencia de dicho material para su propagación. Es primordial señalar que, sin una selección previa de individuos, poner en cultivo las especies aromáticas y medicinales espontáneas origina cosechas muy heterogéneas, de composición química muy variable y, por lo tanto, de menor calidad e interés comercial, ya que los productos que se obtienen de estos cultivos deben cumplir determinadas

especificaciones en función del mercado al que se destinen. Realizar análisis químicos de los aceites y extractos obtenidos de estas plantas, así como valorar su producción de biomasa, es la forma de asegurar que tales especificaciones se cumplen.

Por otra parte, el desarrollo de una agricultura basada en el cultivo de este tipo de plantas requeriría, como paso previo, la selección de aquellos géneros y especies que resulten más interesantes para ese fin, en base a criterios tales como la presencia en la flora española de dichas especies, dada la necesidad de contar con una fuente de material vegetal a partir del cual elaborar unos planes de posible cultivo, o la perspectiva de mercado potencial para estas plantas.

El tomillo es una de las plantas que se adapta a ambos criterios, considerando que el material desecado procedente de esta labiada es uno de los principales productos de exportación en este campo, representando el 23% de la cantidad total exportada, según datos recogidos por Gómez Orea *et al.* (1999), pertenecientes a 1996.

Trabajos previos acerca de esta labiada permiten establecer los requisitos necesarios para optimizar la producción obtenida a partir de cultivos de tomillo.

#### *A) Condiciones.*

En primer lugar se debe distinguir entre explotaciones de secano y de regadío, extendiéndose estas últimas en superficies más reducidas que requieren un aporte hídrico para incrementar su rentabilidad. Cuando las plantas aromáticas se cultivan en secano, con el fin de rentabilizar al máximo las opciones que el medio ofrece, los cultivos se deben ubicar en zonas favorables para el desarrollo de la planta que se desea cultivar.

Este tipo de cultivos predominan en los pisos meso y supramediterráneo, en ombroclimas secos y en menor medida en los subhúmedos. El tomillo es una planta que puede vivir desde 0 hasta 2.000

m.s.n.m. En la Comunidad Valenciana, por ejemplo, se pueden encontrar plantaciones particulares, en las que se cultiva *Thymus vulgaris*, situadas a altitudes que oscilan entre 240–840 m.s.n.m., con una temperatura media anual de 13–16°C, y una precipitación mínima anual situada entre 480–637 mm (Morales, 2002).

En los cultivos de regadío, la planta recibe el aporte hídrico, además de nutricional, adecuado a sus necesidades, lo que permite establecer estas explotaciones también en zonas menos favorables para el crecimiento espontáneo de tales plantas.

Respecto a la forma de propagación, el tomillo se puede multiplicar por semillas o vegetativamente, por división de pies o esquejes (Muñoz, 1987). Se debe considerar que, a la hora de implantar un cultivo, la selección, tanto de semillas como de plantas madre de calidad, es más importante que el medio ecológico en el que se establezca dicho cultivo.

Realizar una siembra de semillas en vivero es el método más rápido y económico, pero dada la gran variabilidad intraespecífica que presentan estas plantas, se puede obtener una población de individuos muy diferentes. Para asegurar la homogeneidad en la producción, es necesario elegir y separar previamente las semillas más adecuadas. No obstante, las plantas que nazcan de esas semillas deben ser controladas, ya que se pueden producir hibridaciones o mutaciones que originen semillas portadoras de factores genéticos poco deseables, ausentes en la planta de procedencia.

La división de pies proporciona un número restringido de plantas, entre 20–30 por cada pie madre dividido.

En la multiplicación por esquejes, en las especies en que es posible, de cada pie se pueden obtener algunos centenares de estaquillas. El esquejado se realiza cuando el tomillo se encuentra en período de actividad vegetativa. El porcentaje de enraizamiento es del 85%, reduciéndose al 30–40% cuando el proceso se realiza en durante la parada vegetativa de la planta (Muñoz, 1987). Con este tipo de

multiplicación se consigue obtener una descendencia uniforme, un conjunto de individuos clonados a partir de una única planta, los cuales mantienen las características de la planta original. La selección previa de las plantas madre en función de distintos parámetros (tales como resistencia, producción de biomasa y cantidad y calidad del aceite esencial) aseguran la obtención de un cultivo competitivo desde el punto de vista comercial, dada la presencia en el mercado de plantas de distintas procedencias, como las recolectadas en Marruecos o países del Este de Europa, que suponen una fuerte competencia en este sector.

Un trabajo realizado por López Miralles (2003), sobre el estaquillado en tres especies de tomillo (*Thymus hyemalis*, *Th. vulgaris* y *Th. zygis*), determina que *Th. hyemalis* es la especie que mejor se adapta a la propagación por esquejes de las tres ensayadas, consiguiendo los resultados más satisfactorios en cuanto a porcentaje de enraizamiento, longitud y peso de raíces. No obstante, dicho porcentaje de enraizamiento no alcanza el 40%. En este estudio se evidencia también que *Th. zygis* es más fácil de propagar a partir de brotes apicales, ya que el éxito conseguido con esta técnica es significativamente superior al obtenido con tallos leñosos.

Otra alternativa para la propagación vegetativa de estas plantas puede ser la multiplicación *in vitro* o micropropagación, siempre que se disponga de material selecto. Los medios de crecimiento empleados en las técnicas de cultivo *in vitro* deben proporcionar los niveles óptimos de carbohidratos, vitaminas, aminoácidos, nutrientes minerales y reguladores de crecimiento, siendo necesario controlar además los factores ambientales. Con todo ello se consiguen altos porcentajes de regeneración y se facilita un tipo de propagación comercialmente viable, que contribuya a satisfacer los requerimientos de la industria respecto a los principios activos obtenidos de estas plantas (Rout *et al.*, 2000). Investigadores como Mendes y Romano (1999) emplean con éxito esta técnica para obtener clones de *Thymus mastichina*.

El marco de plantación es también un factor importante en estos cultivos, que repercute en su rentabilidad. Para el tomillo cultivado en regadío, se propone una distancia entre filas de entre 60 y 80 cm, y una separación entre plantas de 25 a 30 cm. La densidad de plantación sería de 40.000–50.000 plantas/ha (Muñoz, 1987). El marco de plantación para el cultivo en secano puede ser de 1,0 m x 0,4 m, lo que supone una densidad de 25.000 plantas/ha. Estos marcos se adoptan considerando el desarrollo máximo estimado para cada planta, dejando una distancia entre calles que permita mecanizar las labores de cultivo para la eliminación de malas hierbas (Sotomayor, 1998).

La época más apropiada para realizar estas plantaciones son los meses de invierno cuando se trata de zonas altas, principalmente finales de febrero-principios de marzo, y durante el otoño en zonas costeras.

Cuando las plantas alcanzan un desarrollo adecuado, se procede a su recolección, que en el caso de tomillos cultivados se realiza mediante siega. Por el contrario, los tomillos silvestres que se recogen del monte se suelen arrancar, práctica que termina por agotar su presencia si se practica de forma abusiva. Además, las plantas en muchos casos no se recolectan en el momento más oportuno debido a la fuerte competencia que se establece entre los recolectores habituales (Sotomayor *et al.*, 2001).

Tanto el rendimiento como la composición del aceite esencial de estas plantas se ven afectados por el estado fenológico en el que se encuentran cuando se recolectan (McGimpsey *et al.*, 1994; Jordán *et al.*, 2006). La etapa de desarrollo más conveniente para efectuar la recolección de estas labiadas varía en función de la especie y el tipo de aprovechamiento, ya que los tomillos se pueden destinar a la obtención de hoja seca o aceite esencial.

De los datos obtenidos por Sotomayor (1998), se desprende que el momento óptimo para la siega suele alcanzarse cuando las plantas se encuentran en floración-fructificación, siendo este es el estado fenológico

más adecuado para la producción de aceite esencial en este género, en función de rendimiento y calidad. Esta época varía también con la climatología y la altitud. Por ejemplo, centrándonos en las tres especies objeto de esta Tesis, *Thymus hyemalis*, que en estado silvestre crece en el piso Termomediterráneo de la Región de Murcia, admite llevar su cultivo hasta el Mesomediterráneo cálido, y su recolección en zonas de interior se puede realizar en marzo o llegar incluso a abril; *Th. vulgaris*, que podría cultivarse prácticamente en toda la región, permite usualmente su recolección entre mayo y junio si se sitúa en terrenos elevados; por su parte, *Th. zygis*, con una amplia zona de distribución y de potencial cultivo en nuestra región, retrasaría su cosecha hasta julio en zonas altas. Pero si los cultivos se desarrollan en terrenos próximos a la costa, *Th. hyemalis* se recolecta hacia el final del invierno, en febrero o marzo, seguido de *Th. vulgaris*, habitualmente en mayo y, por último, *Th. zygis* en junio. En estas zonas, por lo general, las cosechas se adelantan, pudiendo variar las fechas entre algunos días y un mes.

#### B) Producciones.

Los rendimientos obtenidos a partir de estas plantas, tanto en lo referente a la producción de hoja seca como a los litros de aceite esencial, varían en función de las condiciones de cultivo.

Sotomayor (1998) lleva a cabo un estudio de cultivo del género *Thymus* en dos parcelas de secano situadas en zonas bioclimáticas distintas de la Región de Murcia, una de ellas en Moratalla, en el interior de la región, y otra próxima a la costa, en el término municipal de Torre Pacheco, y obtiene resultados que apuntan a una mayor producción de hoja seca en las zonas montañosas del interior, en tanto que la síntesis de aceite esencial parece verse favorecida por los climas más templados y la escasez de agua. Si consideramos los litros de aceite esencial por hectárea, los datos muestran, en general, una producción superior en la comarca de interior, debido a que también se obtiene una mayor cantidad

de material vegetal en esta zona. En este trabajo, la plantación se realiza a raíz desnuda, lo que origina un bajo porcentaje de enraizamiento que afecta especialmente a *Thymus hyemalis*, que en la parcela cercana al litoral presenta un elevado número de marras. Por ello, en este ensayo no se recogen datos de producción para esta planta en dicha parcela. En la Tabla I-19 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos por este autor durante tres años de cultivo, empleando el marco de plantación indicado anteriormente para cultivos de secano, con una densidad de 25.000 plantas/ha.

Tabla I-19. Rendimientos medios obtenidos en hoja seca y aceite esencial para distintas especies de tomillo en secano.

	<b>MORATALLA</b>		<b>TORRE PACHECO</b>	
	Kg HS/ha	L AE/ha	Kg HS/ha	L AE/ha
<i>Th. zygis</i>	1.069	38,0	612	16,3
<i>Th. vulgaris</i>	1.258	33,5	731	27,3
<i>Th. hyemalis</i>	584	13,2	–	–
<i>Th. baeticus</i>	1.697	92,7	678	39,5

HS = Hoja Seca

AE = Aceite Esencial

En los cultivos de regadío se puede duplicar el número de plantas por hectárea, duplicándose también las producciones. En un trabajo llevado a cabo por Sotomayor *et al.* (2001), se diseña una parcela experimental con una densidad próxima a las 89.000 plantas/ha, aportando agua mediante riego localizado. Trascurridos siete meses desde el inicio del cultivo, se realiza la primera cosecha de la plantación, comprobándose que los rendimientos alcanzados en un período de tiempo tan corto son bastante altos (Tabla I-20), lo que hace pensar a estos autores en la posibilidad de realizar dos recolecciones al año.

Es interesante mencionar que esta plantación se lleva a cabo en la misma finca experimental de Torre Pacheco (Murcia) mencionada anteriormente, aunque en este caso el procedimiento empleado para la siembra ha sido diferente, lo que ha mejorado el arraigo de las plantas, y ha permitido cultivar también con éxito *Th. hyemalis*.

Tabla I-20. Rendimientos medios obtenidos en hoja y aceite esencial para distintas especies de tomillo en regadío.

	<b>Kg MF/ha</b>	<b>Kg HS/ha</b>	<b>L AE/ha</b>
<i>Th. zygis</i>	5.564	1.263	55,7
<i>Th. vulgaris</i>	8.068	1.598	32,0
<i>Th. hyemalis</i>	7.059	1.214	68,5

MF = Materia Fresca

El interés por estos cultivos se puede apreciar igualmente en otros países. Así, también se han establecido cultivos de *Th. vulgaris* en Colombia, donde se considera un cultivo altamente rentable. Se siembran hasta 100.000 plantas/ha y se pueden obtener 4 cortes al año, con rendimientos de unas 18 t/ha en fresco y unas 3 t/ha de tomillo seco, y cerca de 50 kg/ha de aceite esencial; o en Guatemala, donde estos cultivos se encuentran distribuidos en el altiplano del país, en huertos y áreas pequeñas. Se desarrollan en climas templados y fríos, a 1.000–2.500 m.s.n.m., con temperaturas medias de 15–20°C y precipitaciones de 1.000 a 1.500 mm anuales. El rendimiento obtenido en estas plantaciones es de 5.000 kg de materia verde/ha en el primer corte, lo que produce unos 2.000 kg de materia seca. En cultivos de 3 años se obtienen unos 8.500 kg de producto fresco/ha como promedio (ICTA. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas. <http://www.icta.gob.gt>).

Como se ha podido observar en el desarrollo de esta Introducción, el género *Thymus* representa una buena opción en lo que respecta a la implantación de cultivos, ya que se trata de una fuente de importantes materias primas, de probada utilidad, y altamente demandadas por las diferentes industrias implicadas en el aprovechamiento de estas plantas.