

# Variabilidad quimiotaconómica del “tomillo salsero” *Thymus zygis* s.l. en Extremadura (España)

José Blanco Salas<sup>1</sup>, Trinidad Ruiz Téllez<sup>2</sup>, Francisco María Vázquez Pardo<sup>3</sup>, María de los Ángeles Cases Capdevila<sup>4</sup> & María José Pérez-Alonso<sup>5</sup>

<sup>1</sup> FOTEX, Grupo de investigación HABITAT. Instituto de Investigaciones Agrarias “Finca La Orden-Valdesequera” (CICYTEX). Consejería de Economía, Competitividad e Innovación. Gobierno de Extremadura. A-5 km 372, 06187 Guadajira (Badajoz-España). E-mail: [pepebsalas@yahoo.es](mailto:pepebsalas@yahoo.es)

<sup>2</sup> Grupo de Investigación en Biología de la Conservación. Área de Botánica. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. Avda. de Elvas s/n. 06071 Badajoz, Spain. E-mail: [truiz@unex.es](mailto:truiz@unex.es)

<sup>3</sup> Grupo de investigación HABITAT. Departamento de Producción Forestal y Pastos. Instituto de Investigaciones Agrarias “Finca La Orden-Valdesequera” (CICYTEX). Consejería de Economía, Competitividad e Innovación. Gobierno de Extremadura. A-5 km 372, 06187 Guadajira (Badajoz-España). E-mail: [frvazquez50@hotmail.com](mailto:frvazquez50@hotmail.com)

<sup>4</sup> Departamento de Medio Ambiente, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Crta. de la Coruña, km. 7,5, 28040 Madrid, Spain. E-mail: [acases@inia.es](mailto:acases@inia.es)

<sup>5</sup> Departamento de Biología Vegetal I. Universidad Complutense 28071 Madrid, Spain. E-mail: [mjpa32@bio.ucm.es](mailto:mjpa32@bio.ucm.es)

## Resumen:

Se estudian químicamente las tres subespecies de *Thymus zygis* s.l., autóctonas de Extremadura, caracterizando material procedente de 7 poblaciones naturales. Se encuentran *Thymus zygis* Loeffl. ex L. subsp. *gracilis* (Boiss.) R.Morales con altos contenidos en timol (41,9-74,0 %) y *T. zygis* Loeffl. ex L. subsp. *zygis* con altos valores de timol, *p*-cimeno y linalol, sólo comparables a alguna población del N de Portugal. *T. zygis* subsp. *sylvestris* (Hoffmanns. & Link) Brotero ex Coutinho tiene en Extremadura dos pautas de variación química: una, similar a la existente en otros lugares de España y Portugal, con altos niveles de *p*-cimeno (16,0-43,5 %) y timol (13,9-51,3 %) y otra, detectada aquí por primera vez para España, muy rica en carvacrol (42,5-61,6 %) y con escaso timol (0,5-0,8 %). El estudio describe las variaciones en rendimiento (0,35%-5,19%) y composición en función de la parte de la planta recolectada, época de recolección y año de cosecha. Todo ello con el fin de facilitar el posible uso agroindustrial de este importante recurso fitogenético.

Blanco, J.; Ruiz, T.; Vázquez, F. M.; Cases, M. A. & Pérez-Alonso, M. J. 2014. **Variabilidad quimiotaconómica del “tomillo salsero” *Thymus zygis* s. l. en Extremadura (España)**. *Folia Bot. Extremadurensis* 8: 55-64.

**Palabras clave:** aceite esencial, composición química, Lamiaceae, Península Ibérica, recurso fitogenético, *Thymus zygis*.

## Summary:

The three subspecies of *Thymus zygis* s.l., native of Extremadura are studied. Material from seven natural populations is studied chemically. *Thymus zygis* Loeffl. ex L. subsp. *gracilis* (Boiss.) R. Morales produces high levels of thymol (41.9 to 74.0 %) and *T. zygis* Loeffl. ex L. subsp. *zygis* presents high values of thymol, *p*-cymene and linalool, which are just comparable to one population from N Portugal. *Thymus zygis* subsp. *sylvestris* (Hoffmanns. & Link) Brotero ex Coutinho in Extremadura has two paths of chemical variation. One has high levels of *p*-cymene (16.0 to 43.5%) and thymol (13.9 to 51.3 %), the same as in other parts of Spain and Portugal. The other, detected for the first time Spain in this paper, is rich in carvacrol (42.5 to 61.6 %) and has low levels of thymol (0.5 to 0.8 %). The study describes variations in yield (0.35% to 5.19 %) and composition, depending on the collected part of the plant, and the station and the year of the harvest. All this, in order to facilitate the possible use of this important agroindustrial plant genetic resource.

Blanco, J.; Ruiz, T.; Vázquez, F. M.; Cases, M. A. & Pérez-Alonso, M. J. 2014. **Chemotaxonomic variability in the “tomillo salsero” *Thymus zygis* s. l. from Extremadura (Spain)**. *Folia Bot. Extremadurensis* 8: 55-64.

**Key words:** essential oil, chemical composition, Iberian Peninsula, Lamiaceae, phylogenetic resource, *Thymus zygis*.

## Introducción

*Thymus zygis* Loefl. ex L., llamado tomillo salsero o sansero entre otros, es un taxón endémico ibero-norteafricano dentro del cual se han reconocido tres subespecies basadas en la morfología e indumento del cáliz, la ecología y el área de distribución: *Thymus zygis* Loefl. ex L. subsp. *zygis*, *Thymus zygis* Loefl. ex L. subsp. *sylvestris* (Hoffmanns. & Link) Brotero ex Coutinho y *Thymus zygis* subsp. *gracilis* (Boiss.) R. Morales (Blanco & al., 2007; Morales, 2010).

*T. zygis* subsp. *zygis* aparece en las regiones interiores de la mitad Norte de la Península Ibérica (280-1.600 msm) y forma tomillares en claros de encinares, sabinars, melojares o pinares. Aguanta bien las bajas temperaturas, pero no tanto la sequía, apareciendo de forma dispersa por el N de Extremadura. *T. zygis* subsp. *gracilis* se distribuye por el SE de la Península Ibérica y N África (20-2.030 msm) aunque de manera dispersa llega a otras localidades, caso de Extremadura, donde aparece puntualmente siendo su límite de distribución occidental. Suele preferir los suelos básicos, y forma matorrales sobre suelos pedregosos calizos, margas, esquistos micacíticos e incluso sobre suelos arenosos en pinares costeros. *T. zygis* subsp. *sylvestris* es el más frecuente en la región extremeña, y vive en el SW de la Península Ibérica (60-1050 msm), sobre suelos básicos o a veces sustratos ácidos, soportando bien tanto las heladas como periodos prolongados de sequedad.

La especie (*s.l.*) es planta de uso etnobotánico bien conocido en las zonas rurales de España y Portugal (Vázquez, 2008; Figueiredo & al., 2008) y se tiene evidencia científica de su potencial antimicrobiano (Pina-Vaz & al., 2004; Figueiredo & al., 2008) y antioxidante (Jiménez & al., 1993; Figueiredo & al., 2008; Jordán & al., 2009; Blanco & al., 2012). Por otra parte, la complejidad taxonómica del género, ha propiciado en la investigación botánica, la búsqueda de caracteres útiles a la hora de usar el dato químico para delimitar especies y subespecies.

En casos como *Th. zygis*, donde la plasticidad morfológica puede justificar el reconocimiento de taxones infraespecíficos, es importante tener en cuenta la importancia práctica que tiene en el campo de la producción comercial de aceites esenciales el que se realice una caracterización precisa de las fuentes que constituyen la materia prima, incluso a nivel de quimiotipo. En principio se cuenta con algunos datos a este respecto.

La variabilidad del aceite esencial de la subespecie *zygis* ha sido estudiada sobre plantas procedentes de Guadalajara y Zaragoza (Velasco-Negueruela & Pérez-Alonso, 1990; Gaviña-Múgica & Tormes-Ochoa, 1974), Madrid (Morales, 1986a) y Norte de Portugal (Salgueiro & al., 1993; Pina Vaz & al., 2004) llegando a identificar entre el material los siguientes quimiotipos y las razas químicas: timol (Velasco-Negueruela & Pérez-Alonso, 1990); linalol (Velasco-Negueruela & Pérez-Alonso, 1990; Gaviña-Múgica & Tormes-Ochoa, 1974; Morales, 1986a); timol/*p*-cimeno (Salgueiro & al., 1993); acetato de terpenilo (Morales, 1986a); y carvacrol (Morales, 1986a).

En el caso de *Th. zygis* subsp. *gracilis*, se dispone de información de aceites procedente de Granada (Mateo & al., 1978; Morales, 1986a), Almería (Morales, 1986a; Sáez, 1995), Albacete (Sáez, 1995), Castellón (Sánchez & al., 1995), Murcia (Sáez, 1995; Sánchez & al., 1995; Sotomayor & al., 2004) Badajoz (Blanco & al., 2010), y en Marruecos (Richard & al., 1985; Tantaoui-Elaraki & al., 1993). La razas químicas descritas en este caso fueron: timol (Mateo & al., 1978); *p*-cimeno/carvacrol (Mateo & al., 1978; Richard & al., 1985); timol/*p*-cimeno (Richard & al., 1985; Morales, 1986a; Blanco & al., 2010); *p*-cimeno (Tantaoui-Elaraki & al., 1993) y linalol (Sánchez & al., 1995).

Por lo que respecta a *Th. zygis* subsp. *sylvestris*, se ha analizado material procedente de Madrid (Mateo & al., 1978; Velasco-Negueruela & Pérez-Alonso, 1984), Ciudad Real y Toledo (Velasco-Negueruela & Pérez-Alonso, 1984), Murcia y Albacete (Sáez, 1995), C de Portugal (Rodrigues & Ribeiro, 1987; Salgueiro & Proença da Cunha, 1987; Proença da Cunha & Salgueiro, 1991; Carvalho, 1994) y Norte de Portugal (Moldao-Martins & al., 1999), encontrándose los quimiotipos/razas químicas siguientes: timol (Mateo & al., 1978); carvacrol (Proença da Cunha & Salgueiro, 1991; Carvalho, 1994); Velasco-Negueruela & Pérez-Alonso, 1984; Carvalho, 1994; Sáez, 1995); timol/1-8-cineol (Mateo & al., 1978; Morales, 1986a); timol/*p*-cimeno/geraniol (Rodrigues & Ribeiro, 1987); timol/geraniol/acetato de geraniol (Moldao-Martins & al., 1999); *p*-cimeno/*g*-terpineno (Carvalho, 1994); citronelol/geraniol (Carvalho, 1994); timol/carvacrol (Carvalho, 1994; Sáez, 1995); carvacrol/*p*-cimeno (Carvalho, 1994); timol/*p*-cimeno/*g*-terpineno (Carvalho, 1994); 1,8-cineol/limoneno (Sáez, 1995) y linalol/1,8-cineol (Sáez, 1995).

A pesar de que se dispone de esta amplia información, se desconoce aun la composición química de *Th. zygis s. l.* en algunas regiones españolas y apenas se ha estudiado las variaciones del aceite esencial

a lo largo del ciclo vegetativo de la planta. Por ello se plantea como objetivo de este trabajo conocer la variabilidad quimiotaconómica de *Th. zygis* s.l. en Extremadura y comparar la producción cuantitativa y cualitativa de los aceites esenciales entre las diferentes subespecies, entre diferentes poblaciones y entre diferentes estados de la planta (floración y fructificación).

## **Material y métodos**

### *Material vegetal*

Se recolectó material vegetal de 7 poblaciones silvestres de *Thymus zygis* s.l. de la Comunidad Autónoma de Extremadura: 1 población de *Th. zygis* subsp. *gracilis* (P1: Badajoz), 5 poblaciones de *Th. zygis* subsp. *sylvestris* (P2: La Albuera; P3: Cabeza de Buey; P4: Guadajira; P5: Los Santos de Maimona; P6: Solana de los Barros) y 1 población de *Th. zygis* subsp. *zygis* (P7: La Garganta) (SO de España) (Apéndice 1). El material se segó en el estado de floración y después en el de fructificación durante 2-3 años consecutivos. El material recolectado se secó en una habitación aireada en oscuridad. Posteriormente se conservó durante 2 meses en bolsas de papel. Testimonios de cada población se depositaron en el herbario HSS (Instituto de Investigaciones Agrarias "Finca La Orden-Valdesequera" Gobierno de Extremadura).

### *Extracción del aceite esencial*

La extracción del aceite esencial se llevó a cabo mediante hidrodestilación de acuerdo con la metodología propuesta por la Farmacopea Europea (Council of Europe, 1996). La muestra de aceite obtenida se usó para estimar el rendimiento en aceite esencial y para determinar los componentes y sus porcentajes respecto al total. Para cada muestra se llevaron a cabo dos extracciones, una con la planta entera (PE) y otra con flores y hojas (FH).

### *Cromatografía de gases (CG)*

La CG se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Varian 3300 equipado con una columna capilar de metil silicona DB-1 (50 m x 0.25 mm, 0.25 µm de espesor de película). La temperatura se programó desde 95 °C hasta 240 °C a 4 °C min<sup>-1</sup>. La inyección se realizó a 250 °C en modo Split (1:100). Como gas portador se empleó nitrógeno (1.5 mL min<sup>-1</sup>). Se usó un detector de ionización de llama (FID) a 300°C. El volumen de inyección en todas las muestras fue de 0.1 µL de aceite puro.

### *Cromatografía de gases – espectrometría de masas (CG - EM)*

La CG-EM fue realizada en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 con una columna de tubo capilar de sílice de SE-30 (50 m x 0.22 mm, 0.25 µm grosor de película), conectado a un detector selectivo de masas CV 5971A. La temperatura de columna fue programada de 70 °C a 220 °C en 4 °C minuto<sup>-1</sup>, y el helio fue el gas portador usado. Los espectros de masa fueron registrados en el modo de exploración a 70 eV.

### *Análisis cualitativo*

La mayor parte de componentes fueron provisionalmente identificados por CG mediante la comparación de sus índices de retención obtenidos con aquellos estándares auténticos y publicados en bibliografía (Adams, 2001; Joulain & König, 1998; Swigar & Silverstein, 1981). Los modelos de fragmentación espectrales de masas fueron comparados con aquellos almacenados en la base de datos de espectrómetro (Wiley biblioteca incorporada).

### *Análisis estadístico*

Los resultados obtenidos en este estudio se analizaron estadísticamente usando los tests de Kruskal Wallis y análisis discriminante (IBM SPSS Statistics 19).

## **Resultados y discusión**

La discusión de los resultados se ha realizado desde dos perspectivas: la primera (Áreas de producción) recoge la composición química y el rendimiento de materiales con diferente procedencia geográfica; la segunda (Diferencias temporales) abarca la influencia del año de cosecha y la época de recolección.

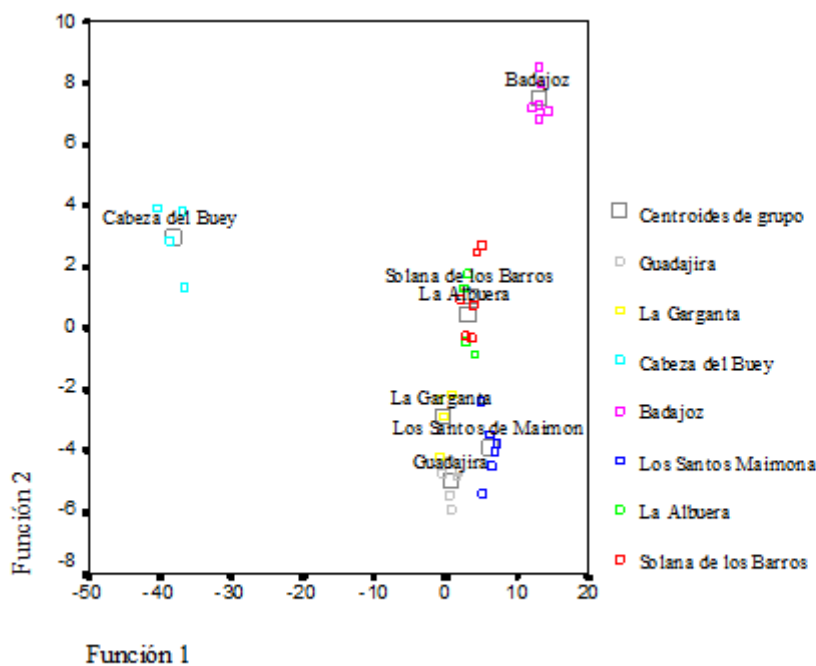
## Áreas de producción

### Composición química

En la tabla 1 se presentan los 40 componentes identificados en los aceites esenciales de *Th. zygis* subsp. *gracilis* (P1), *Th. zygis* subsp. *sylvestris* (P2-P6) y *Th. zygis* subsp. *zygis* (P7) en los estados de floración y fructificación, y los intervalos de valores en % obtenidos para 2-3 años de estudio.

*Th. zygis* subsp. *zygis* fue estudiada en una población, situada en el límite sur de su área de distribución natural (P7: La Garganta). Se caracterizó por tener como componentes principales timol (23,3-30,1 %), *p*-cimeno (16,2-30,8 %) y linalol (11,6-23,7 %). Estos resultados son significativamente diferentes a los obtenidos en otras poblaciones analizadas, a excepción de los datos obtenidos en el N de Portugal por Salgueiro & al. (1993).

*Th. zygis* subsp. *gracilis* fue estudiada en el límite NO de su área de distribución (P1: Badajoz), encontrando unos valores muy altos de timol (41,9-74,0 %), *p*-cimeno (8,8-30,7 %) y *g*-terpineno (3,6-12,9 %). Los valores de timol son los más altos conocidos, y debido al gran interés aplicado de este componente, esta población podría ser de gran valor para ser domesticado para su cultivo, como ya se ha hecho en los casos similares del complejo *Th. zygis* s.l. (Jordán & al., 2009). En la figura que recoge los resultados del análisis discriminante efectuado con los 18 componentes mayoritarios (Fig. 1), esta población ocupa una posición muy desviante, lo que además, avala su segregación taxonómica como subespecie.



**Figura 1** Análisis discriminante de los 18 componentes mayoritarios de los aceites esenciales de las poblaciones silvestres de *Th. zygis* estudiadas con datos de floración y fructificación.

Compuesto	IR	RTM	P1	P2	floración							fructificación						
					P3	P4	P5	P6	P7	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7		
$\alpha$ -tujano	926	4,9	t-0,4	t-0,5	t	t-0,1	0,1-0,4	t-0,2	t-0,2	t-0,2	t-0,1	t-0,2	t-0,3	t-0,1	t-0,5			
$\alpha$ -pineno	933	5,1	t-0,3	0,6-1,1	t	0,8-1,4	0,7-1,1	0,7-0,9	t-0,1	0,7-0,9	0,1	0,6-1,0	0,7-0,9	4,1-5,4	t			
canfeno	949	5,3	0,5-1,3	1,4-2,3	2,2-2,3	0,9-1,3	1,2-2,7	1,2-2,0	t-0,4	1,7-2,0	2,9-3,0	1,8-2,8	1,7-2,4	0,7-1,1	11,6-12,7			
sabineno	976	5,6	t-0,3	t	t	t	t-1,0	t	0,8-1,1	t	0,5-0,7	t	t	1,9-2,5	t-0,4			
1-octen-3-ol	981	5,7	t	0-t	0,3-0,4	t	t-0,1	t	t	1,0-1,7	t	0-t	0,1-0,3	0,8-0,8				
$\beta$ -pineno	985	5,8	0,4-0,5	1,4-3,0	0,7-1,1	0,4-1,7	1,1-2,0	1,3-3,0	0,3-1,0	2,4-3,2	t	3,2-6,2	2,6-4,4	2,6-4,0	1,6-2,2			
mirreno	991	5,9	1,8-3,9	2,1-2,5	t	1,7-2,1	2,2-4,2	2,1-2,4	1,2-2,4	1,9-2,2	0,1-t	1,8-2,3	1,0-2,2	1,9-2,4	t-0,3			
$\alpha$ -felandreno	1005	6,2	0,1	t	0,8-0,9	0,1-0,3	t-0,2	0,1	t-0,4	t-0,1	1,5-2,5	t-0,1	t	t	3,0-3,7			
$\alpha$ -terpineno	1018	6,4	0,2-2,1	0,1-0,8	1,6-2,5	t-0,1	1,1-1,3	0,5	0,1-0,5	t	1,5-2,1	0,4-1,1	t-0,3	t	2,0-2,2			
<i>p</i> -cimeno	1021	6,5	8,8-23,8	21,1-34,0	t	22,5-31,3	16,0-22,9	17,7-25,8	23,8-30,7	37,0-43,2	20,5-43,5	34,9-40,1	37,8-42,4	0,1-0,4				
limoneno	1025	6,6	1,4-2,1	1,4	9,9-13,7	0,6-0,9	0,8-1,0	0,7-1,6	t-0,8	t	0-t	t	t	0,4-0,5	t-0,2			
$\beta$ -felandreno	1025	6,7	0,2-0,6	t	1,3-1,4	0,2-0,5	t-0,4	0,2-0,4	0,1-0,2	t-0,1	18,9-22,8	t-0,1	0-t	t-0,1	28,7-30,8			
1,8-cineol	1025	6,7	t-0,5	t-0,3	t	t-0,2	0,1-0,3	t	t-0,2	t-0,1	0,2-0,4	0,2-0,4	t-0,3	t				
( <i>Z</i> )- $\beta$ -ocimeno	1038	6,9	t	1,2-1,6	0,9-3,37	0,9-6,5	5,0-21,7	1,2-1,8	t	4,5-4,9	1,2-6,9	3,2-5,8	1,2-4,6	t				
$\delta$ -terpineno	1060	7,2	9,6-12,9	10,1-13,8	11,6-12,2	5,8-10,7	8,0-10,7	7,8-13,7	3,6-4,9	3,0-4,7	t	1,9-14,1	2,2-3,0	2,9-4,1	1,0-2,3			
cis-hidrato de sabineno	1066	7,4	t-0,2	t	t-0,4	t-0,1	t	t	t-0,1	t-0,1	7,8-12,4	t-0,2	0,1-0,3	0,1	2,1-3,3			
terpinoleno	1091	7,8	t-0,2	t-0,5	t	t	t	0,2	0,1-0,4	0,1-0,2	0-t	t-0,3	0,1	0,1	t			
linalol	1102	7,9	1,0-2,6	3,7-4,7	2,2-2,3	7,4-18,4	10,2-17,6	5,8-7,1	1,4-2,2	5,3-6,1	2,9-3,0	11,2-12,6	10,8-12,2	4,1-5,4	11,6-12,7			
alcanfor	1148	9	t	t	t	t-0,1	t	0,5-0,9	t-0,1	t	t	t-0,1	t	t-0,4				

**Tabla 1-** Composición química (intervalo de valores en % obtenidos para 2-3 años de estudio) del aceite esencial de 1 población de *Th. zygis* subsp. *gracilis* (P1), 5 poblaciones de *Th. zygis* subsp. *sylvestris* (P2-P6) y 1 población de *Th. zygis* subsp. *zygis* (P7) en los estados de floración y fructificación; IR = Índice de retención de acuerdo con n-parafinas en columna DB-1; RTM = Tiempo de retención en GLC-MS; t = traza (< 0,1%).

Compuesto	IR	RTM	P1	P2	Floración							Fructificación						
					P3	P4	P5	P6	P7	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7		
borneol	1172	9,44	0,3-0,9	t-1,3	t-0,2	1,1-1,8	0,3-1,0	0,9-1,6		0,6-1,4	2,4-2,9	2,9-4,3	2,2-5,7	1,6-1,7				
terpinen-4-ol	1216	9,68	0,6-1,7	2,0-2,9	1,5-2,7	2,3-5,4	1,0-2,3	1,7-3,7	4,6-5,0	0,7-1,2	3,1-4,3	3,5-4,6	5,2-7,5	t-5,1	2,7-5,5			
p-cimeno-8-ol	1218	9,87	t				0-t											
α-terpineol	1221	10	0,2-0,6	t-0,7	t-0,6	t-0,8	t-0,8	t		t-0,1	0,5-0,8	0,6-0,8	0,4-1,2	0,8-0,9	0,8			
citronelol	1228	10,6	t-0,3	t	0,1-0,9	0,9-1,1	0,6-0,8			0,1-0,2	t	0,7-2,1	t-1,3	0,6				
metil eter, timol	1232	10,8	0-t								0-t			t				
geraniol	1255	11,1	t-0,1			t		0,1	0,9-2,1	t					0,2-0,8			
acetato de linalilo	1257	11,2	t			t				0-t								
acetato de bornilo	1282	11,8		t			0-t			t			0,2-0,4					
timol	1290	12	41,9-74,0	28,4-51,3	0,6-0,8	32,4-35,8	22,4-35,4	40,0-49,5	29,1-30,0	50,7-62,2	23,6-30,0	0,5-0,7	13,9-28,9	18,8-27,0	27,2-31,5	23,3-30,1		
carvacrol	1298	12,2	1,0-4,43	1,5-1,7	5,6-2-61,6	1,4-1,6	1,2-1,6	1,9-2,5	1,8-2,6	1,0-3,2	1,6-1,9	42,5-53,5	1,1-1,2	1,9-2,0	2,3-3,6	2,1-2,6		
acetato de timilo	1353	13,6								t								
acetato de geraniol	1383	14	t	0-t	t-0,2		t		t-0,9		t-2,4	t			0,8-2,1			
β-elemeno	1410	14,3								0-t			t-0,1					
(E)-cariofileno	1416	15	0,9-1,8	t	1,1-1,5	t	t-0,1	t-0,83	t-1,1	t	t	1,7-1,0	t-0,7	t	0,8-1,5			
allo-aromadendreno	1462	16,1	t				t								0-t			
β-bisaboleno	1505	16,7	t-0,1					0-t			t							
espatulenol	1575	18,1		t		0-t				t-0,1			0-t		t			
óxido de cariofileno	1578	18,3	t-0,4			t	t	0-t	t	t	t-0,2	0-t	t-0,1	t-0,3	t			
viridiflorol	1585	18,5				t				t					t			
α-cadinol	g	20,4	0-t					t					t	0-t				

Tabla 1.- Continuación

En el caso de *Th. zygis* subsp. *sylvestris*, el más frecuente y más ampliamente distribuido en Extremadura, se estudiaron 5 poblaciones, encontrándose resultados que podrían incluirse en dos grupos: el primero, que hemos denominado raza química carvacrol, aparece en el material procedente de la población Cabeza del Buey (P3). Ocupa una posición claramente desviante en la figura 1, y se caracteriza por un alto contenido en carvacrol (42,5-61,6 %), y mínimo de timol (1 %). Componentes que alcanzan valores importantes son *p*-cimeno (9,9-22,8 %) y *g*-terpineno (7,8-12,4 %). La elevada presencia de carvacrol y escasa de timol no había sido descrita para la subespecie *sylvestris* de procedencia española, aunque sí se había localizado en poblaciones del C de Portugal (Proença da Cunha & Salgueiro, 1991; Carvalho, 1994).

El segundo grupo, constituido por las poblaciones P2, P4, P5 y P6, se caracteriza por una alta presencia de timol (13,9-51,3 %) y *p*-cimeno (16,0-43,5 %). Estos resultados tienen unos intervalos muy grandes lo cual permite incluir en ellos los resultados obtenidos en un número elevado de poblaciones analizadas (Mateo & al., 1978; Velasco-Negueruela & Pérez-Alonso, 1984; Proença da Cunha & Salgueiro, 1991; Carvalho, 1994).

### Rendimientos

En relación con la productividad, los rendimientos para *T. zygis* s.l. fueron similares en el material de las distintas poblaciones de procedencia (Tabla 2). En los análisis (test de Kruskal-Wallis) no se observaron diferencias estadísticamente significativas, ni para el estado de floración en PE (n=13; ns p=0,326) ni para el estado de fructificación (PE n=13; ns p=0,301 y FH n=18; ns p=0,172), pero sí se observaron diferencias en FH (n=18; \* p=0,018).

Los valores de rendimiento oscilaron entre 0,32-3,56 % para PE y entre 1,43-5,19 % para FH para el estado de floración y entre 0,35-2,14 % para PE y entre 0,80-5,05 % para FH en el estado de fructificación. Estos resultados son similares e incluso superiores a lo observado en la bibliografía. El material de mejor rendimiento es el procedente de Badajoz, única población estudiada que pertenece a la subespecie *gracilis* (PE 0,73-3,56 %; FH 1,54-5,19 %), mientras que el resto de las poblaciones obtuvieron unos valores más o menos homogéneos y menores (*Th. zygis* subsp. *zygis*: PE 0,72-1,64 %; FH 1,18-2,28 %) (*Th. zygis* subsp. *sylvestris*: PE 0,32-1,74 %; FH 0,80-3,05 %).

		Floración						Fructificación					
		2002		2003		2004		2002		2003		2004	
		PE	FH	PE	FH	PE	FH	PE	FH	PE	FH	PE	FH
<b><i>T. zygis</i></b> subsp. <b><i>gracilis</i></b>	Badajoz	s.d.	3,31	1,73	3,42	3,56	5,19	s.d.	1,54	0,73	1,84	2,14	5,05
<b><i>T. zygis</i></b> subsp. <b><i>sylvestris</i></b>	La Albuera	s.d.	2,13	1,52	2,19	s,d,	s,d,	s.d.	1,21	0,66	1,33	s.d.	s.d.
	Cabeza del Buey	s.d.	s,d,	0,32	2,45	1,56	3,05	s.d.	s,d,	0,88	1,79	0,93	1,72
	Guadajira	s.d.	1,69	0,90	1,43	1,44	2,16	s.d.	1,05	0,50	0,96	0,84	1,35
	Los Santos de Maimona	s.d.	1,92	1,09	2,25	1,09	2,23	s.d.	0,80	0,35	1,31	0,79	1,40
	Solana de los Barros	s.d.	2,35	1,26	2,27	1,74	2,81	s.d.	1,18	0,93	1,92	0,97	1,81
<b><i>T. zygis</i></b> subsp. <b><i>zygis</i></b>	La Garganta	s.d.	s.d.	1,64	2,23	1,54	2,28	s.d.	s.d.	0,72	1,18	0,77	1,76

**Tabla 2.-** Valores de rendimiento (ml/100 g) obtenidos en 2002, 2003 y 2004 en los estados de floración y fructificación, para las poblaciones a estudio. Se incluye los datos para planta entera (PE) y flores y hojas (FH).

### Diferencias temporales

#### Año de cosecha

Respecto a la comparación de datos de composición del aceite de distintas cosechas (años 2002, 2003, 2004), en *Th. zygis* s.l. no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para cada uno de los componentes del aceite esencial (los 18 componentes mayoritarios) en el 100 % de las comparaciones efectuadas en el estado de floración y en el 83 % en el estado de fructificación (test de Kruskal-Wallis, n=13). Por este motivo no se tuvo en cuenta el factor año en los análisis posteriores. Este aspecto apenas ha sido tratado con anterioridad en la bibliografía, y los resultados obtenidos sugieren que la composición química del aceite esencial es una variable más ligada al origen genético de las plantas que a las condiciones ambientales (climáticas en este caso).

No ocurre lo mismo en la faceta de productividad, que puede depender más de la disponibilidad hídrica y las características climáticas. Fueron comparados los resultados de rendimientos obtenidos en

las cosechas de tres años de estudio 2002, 2003 y 2004 mediante tests de Kruskal-Wallis y se observaron diferencias significativas únicamente en PE para el estado de fructificación ( $n=13$ ;  $*p=0,038$ ). No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los demás casos (Floración: PE  $n=13$  ns  $p=0,193$  FH  $n=18$  ns  $p=0,383$ ; fructificación: FH  $n=18$  ns  $p=0,056$ ).

#### Época de recolección

Sobre la hipótesis de que la fase del ciclo biológico puede afectar la producción y rendimiento de aceites esenciales, Reverth (1975) estudió la variación del contenido y composición en *Th. zygis* subsp. *gracilis* durante el desarrollo de la planta. Este autor comprobó que el contenido aumenta en primavera, alcanzando el máximo en la época de floración. El mínimo corresponde a finales de invierno. Las esencias presentan una constancia de composición cualitativa durante todo el año, variando las cantidades relativas de los diferentes compuestos. Las cantidades de aceite están correlacionadas directamente con la temperatura e inversamente con la humedad. Sin embargo, a mayor insolación, mayor contenido de esencias si esto ocurre durante el periodo que va de mayo a octubre, y menor contenido si es desde octubre a febrero. Resultados similares obtuvo Moldão-Martins & al. (1999). Estos resultados justifican aún más la necesidad de tener más información sobre los aceites esenciales en diferentes momentos del ciclo vegetativo ya que es muy complicado caracterizar nuevos materiales, sin disponer información de otros momentos del ciclo vegetativo, y más si ocurre como en esta especie, donde existe una gran variabilidad química a lo largo del año.

Las características genéticas, unidas a los factores ambientales producen cambios morfológicos y químicos en las plantas. En el caso de *Th. zygis* se observan cambios muy visibles de una estación a otra, porque en los periodos de mayor estrés hídrico, pierde una buena parte de las hojas además de pasar de un verde intenso a unas tonalidades grisáceas o cenicientas (Morales, 1986b). Los aceites esenciales de estas especies son fabricados en las glándulas secretoras, los cuales se sitúan, en su gran mayoría, en las hojas y flores. Por lo tanto una extracción de planta entera (PE) dará unos rendimientos inferiores a los que se puedan obtener en una extracción de únicamente flores y hojas (FH). Esta hipótesis se cumple en nuestro datos ya que la herramienta estadística (test de Kruskal-Wallis), empleada para comparar los rendimientos de planta entera (PE) con los obtenidos para flores y hojas (FH), reflejó diferencias estadísticamente significativas para las muestras de poblaciones estudiadas (floración  $n=30$  \*\*\*  $p=0,000$ ; fructificación  $n=30$  \*\*\*  $p=0,000$ ).

Para el análisis de diferencias de rendimiento por época de recolección se empleó el test de Kruskal-Wallis. Se observaron diferencias entre los estados de floración y el de fructificación tanto en PE ( $n=25$ ; \*\*\*  $p=0,005$ ) como en FH ( $n=36$ ; \*\*\*  $p=0,000$ ). Estos resultados también están relacionados con los cambios drásticos de la morfología arriba mencionados.

La variabilidad de composición del aceite esencial, fue diferente según la época de recolección. Se disponía de información que revelaba estas diferencias que se producen a lo largo del año en lo que se refiere a cada uno de los componentes químicos (Reverth, 1975; Moldão-Martins & al., 1999).

Al comparar los resultados (Tabla 5) del estado de floración con los del estado de fructificación, mediante el test de Kruskal-Wallis ( $n=36$ ), se observaron diferencias significativas en un número considerable de componentes, incluyendo algunos de los que alcanzan unos altos porcentajes de presencia (timol= \*  $0,043$ ; *p*-cimeno= \*\*\*  $0,000$ ;  $\alpha$ -terpineno= \*\*\*  $0,000$ ;  $\beta$ -pineno= \*\*  $0,002$ ). Estas importantes variaciones de una época a otra se deben seguramente a la facilidad de transformación de un compuesto en otro (p.e. *p*-cimeno en timol) como consecuencia de los cambios medioambientales. Buena parte de la bibliografía publicada sobre los aceites esenciales de *Th. zygis*, está basada solamente en la fase de floración, atribuyendo la variabilidad encontrada a razas químicas, de las cuales existen muchas descritas. Es posible que un buen número de ellas no sean más que variaciones como consecuencia del momento concreto de su recolección.

En conclusión, respecto a los años de cosecha se observó diferencia de unos años con otros en rendimientos, pero no en composición química. Sin embargo, respecto a la época de recolección, se encontraron diferencias en ambos aspectos.

#### Agradecimientos

Los autores desean agradecer la ayuda y colaboración de Jesús Sanz (Centro de Química Orgánica "Manuel Lora-Tamayo" (C.S.I.C.). Este trabajo ha sido financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) (RF00-019-C2-2).



### Bibliografía

- Adams, R.P. 2001. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Allured Publishing co., Carol Stream, IL., 464 pp.
- Blanco, J.; Vázquez, F. M. & Ruiz, T. 2007. Revisión de los géneros *Thymbra* L. y *Thymus* L. (Lamiaceae) en Extremadura (España). *Folia Botanica Extremadurensis*, 1: 27-53.
- Blanco, J.; Ruiz, T.; Vázquez, F.M.; Pérez-Alonso, M.J. & Cases, M.A. 2010. The essential oil of *Thymus zygis* subsp. *gracilis* (Boiss.) R. Morales (Lamiaceae) in his limit of western distribution in the Iberian Peninsula. *11th Congress of the International Society of Ethnopharmacology. Revista de Fitoterapia Supl.(BOOK OF ABSTRACTS)*, 10: 121.
- Blanco, J.; Ruiz, T.; Vázquez, F.M.; Cases, M.A.; Pérez-Alonso M.J. & Gervasini, C. 2012. Influence of phenological stage on the antioxidant activity of *Thymus zygis* s.l. essential oil. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 10: 461-465.
- Carvalho, J. 1994. Qualidade fragrante e potencialidades de arbustivas espontâneas das Serras de Aire e Candeeiros. *Silva Lusitânica*, 2: 193-206.
- Council of Europe. 1996. *European Pharmacopoeia*. 3<sup>rd</sup>. Strasbourg, France, 1799 pp.
- Figueiredo, A.C.; Barroso, J.G.; Pedro, L.G.; Salgueiro, L.; Miguel, M.G. & Faleiro, M.L. 2008. Portuguese *Thymbra* and *Thymus* species volatiles: chemical composition and biological activities. *Current Pharmaceutical Design*, 14: 3120-3140.
- Gaviña-Múgica, M. de & Tormes-Ochoa, J. 1974. Aceites esenciales de la Provincia de Guadalajara. Aceite esencial de *Thymus zygis* Loeffl. *Contribución al estudio de los aceites esenciales españoles II*. INIA, 405-420.
- Jiménez, J.; Navarro, M.C.; Montilla, M.P.; Martín, A. & Martínez, A. 1993. *Thymus zygis* oil: its effects on CC14-induced hepatotoxicity and free radical scavenger activity. *Journal of Essential Oil Research*, 5 (2), 153-158.
- Jordán, M.J.; Martínez, R.M.; Martínez, C.; Moñino, I. & Sotomayor, J.A. 2009. Polyphenolic extract and essential oil quality of *Thymus zygis* ssp. *gracilis* shrubs cultivated under different watering levels. *Crops Prod.*, 29: 145-153.
- Joulain, D. & Köning, A.W. 1998. *The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons*. E.B.-Verlag Hamburg, Germany. 658 pp.
- Mateo, C.; Morera, M.P.; Sanz, J.; Calderón, J. & Hernández, A. 1978. Estudio analítico de aceites esenciales procedentes de plantas españolas. 1. Especies del género *Thymus* L. *Rivista Italiana, E.P.P.O.S.*, 11: 621-627.
- Moldão-Martins, M.; Bernardo-Gil, M.G.; Beirão da Costa M.L. & Rouzet, M. 1999. Seasonal variation in yield and composition of *Thymus zygis* L. subsp. *sylvestris* essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 14: 177-182.
- Morales, R. 1986a. Estudio químico de aceites esenciales. In: R. Morales. Taxonomía del género *Thymus* L. excluida la Sect. *Serpyllum* (Miller) Benthem en la Península Ibérica. *Ruizia*. Spain, pp.71-91.
- Morales, R. 1986b. Morfología del género. In: R. Morales. Taxonomía del género *Thymus* L. excluida la Sect. *Serpyllum* (Miller) Benthem en la Península Ibérica. *Ruizia*. Spain, pp.7-10.
- Morales, R. 2010. *Thymus* L. In: R. Morales, A. Quintanar, F. Cabezas, A.J. Pujadas & S. Cirujano (eds). *Flora Iberica XII C.S.I.C.*, Madrid, Spain. pp. 349-409.
- Pina-Vaz, C.; Gonçalves Rodríguez, A.; Pinto, E.; Costa de Olivera, S.; Tavares, C.; Salgueiro, L.; Cavaleiro, C.; Gonçalves, M. J. & Martínez de Olivera, J. 2004. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 18: 73-78.
- Proença da Cunha, A. & Salgueiro, L.R. 1991. The chemical polymorphism of *Thymus zygis* ssp. *sylvestris* from Central Portugal. *J. Essent. Oil Res.*, 3: 409-412.
- Reverth, A. 1975. *Estudio comparativo de diferentes especies del género Thymus L. desde el punto de vista de los aceites esenciales*. Tesis doct. Univ. Granada.
- Richard, H.; Baritoux, O.; Benjilali, B. & Banquour, N. 1985. Study of various essential oils of thyme from Morocco. *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.*, 18: 105-110.
- Rodrigues, O. & Ribeiro, L. 1987. Composição do óleo essencial de *Thymus zygis* L. subsp. *sylvestris* (Hoffmanns & Link) Brot. ex Coutinho da região de Souselas-Coimbra. *Bol. Fac. Farm. Coimbra*, 11: 41-50.
- Sáez, F. 1995. Essential oil variability of *Thymus zygis* growing wild in southeastern Spain. *Phytochemistry*, 40: 819-825.
- Salgueiro, L.M.R. & Proença da Cunha, A. 1987. Chemical composition of the essential oil of *Thymus zygis* subsp. *sylvestris* (Hoffmanns. & Link) Brot. ex. Coutinho from the central region of Portugal. *Bol. Fac. Farm. Coimbra*, 11: 107-118.
- Salgueiro, L.R.; Roque O.R. & Proença da Cunha A. 1993. Contribution to the standardization of a thymol type essential oil of *Thymus zygis* subsp. *zygis* from Portugal. *Acta Horticulturae*, 333: 245-248.
- Sánchez, P.J.; Sotomayor, J.A.; Soriano, M.C. & García Vallejo, M.C. 1995. Chemical composition of the essential oil of *Thymus zygis* subsp. *gracilis* c. v. "Linalool Type", and its performance under cultivation. *J. Essent. Oil Res.*, 7: 399-402.
- Sotomayor, J.A.; Martínez, R.M.; García, A.J. & Jordán, M.J. 2004. *Thymus zygis* subsp. *gracilis*: watering level effect on phytomass production and essential oil quality. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 5418-5424.
- Swigar, A.A. & Silverstein, R.M. 1981. *Monoterpenes*. Aldrich, Milwaukee, WI., 130 pp.
- Tantaoui-Elaraki, A.; Lattaoui, N.; Errifi, A. & Benjilali B. 1993. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus broussonetii*, *Th. zygis* and *Th. satureioides*. *Journal of Essential Oil Research*, 5: 45-53.
- Tormo, R.; Ruiz, T. & Devesa, J.A. 1995. El Clima. En: Devesa, J. A. (ed.) *Vegetación y Flora de Extremadura*. Badajoz. Universitas Editorial, 37-48.
- Vázquez, F. M. 2008. Lamiaceae. In: Vázquez F.M. (coord). *Plantas Medicinales en la Comunidad de Extremadura*. Diputación de Badajoz. Badajoz. Spain. 279-319 pp.
- Velasco-Negueruela, A. & Pérez-Alonso, M.J. 1990. New data on the chemical composition of essential oils from Iberian thyme species. *Botanica Complutensis*, 16: 91-97.

## **Apéndice 1**

### **Material estudiado \***

#### ***Thymus zygis* subsp. *gracilis***

- Badajoz: Ctra. Campo Maior. 29SPD70. Sobre caliza. Mesomediterráneo. 3-06-2002. *J. Blanco & D. Martín.*
- Badajoz: Ctra. Campo Maior. 29SPD70. Sobre caliza. Mesomediterráneo. 21-08-2002. *J. Blanco.*
- Badajoz: Ctra. Campo Maior. 29SPD70. Sobre caliza. Mesomediterráneo. 20-05-2003. *J.J. Barrantes & J. Blanco.*
- Badajoz: Ctra. Campo Maior. 29SPD70. Sobre caliza. Mesomediterráneo. 1-08-2003. *J.J. Barrantes & J. Blanco.*
- Badajoz: Ctra. Campo Maior. 29SPD70. Sobre caliza. Mesomediterráneo. 20-05-2004. *J. Blanco & D. García.*
- Badajoz: Ctra. Campo Maior. 29SPD70. Sobre caliza. Mesomediterráneo. 30-07-2004. *J. Blanco & D. García.*

#### ***Thymus zygis* subsp. *sylvestris***

- Badajoz: La Albuera. 29SPC88. Sobre caliza. Mesomediterráneo. 3-06-2002. *J. Blanco & J. Pozo.*
- Badajoz: La Albuera. 29SPC88. Sobre caliza. Mesomediterráneo. 14-08-2002. *J. Blanco & J. Pozo.*
- Badajoz: La Albuera. 29SPC88. Sobre caliza. Mesomediterráneo. 19-05-2003. *J.J. Barrantes & J. Blanco.*
- Badajoz: La Albuera. 29SPC88. Sobre caliza. Mesomediterráneo. 12-08-2003. *J.J. Barrantes & J. Blanco.*
- Badajoz: Cabeza del Buey. 30SUH08. Sobre pizarras. Mesomediterráneo. 6-06-2003. *J.J. Barrantes & J. Blanco.*
- Badajoz: Cabeza del Buey. 30SUH08. Sobre pizarras. Mesomediterráneo. 6-06-2003. *J.J. Barrantes & J. Blanco.*
- Badajoz: Cabeza del Buey. 30SUH08. Sobre pizarras. Mesomediterráneo. 18-05-2004. *J.J. Barrantes & J. Blanco.*
- Badajoz: Cabeza del Buey. 30SUH08. Sobre pizarras. Mesomediterráneo. 28-07-2004. *J. Blanco & D. García.*
- Badajoz: Guadajira. 29SPD90. Sobre ladera y suelo básico. Mesomediterráneo. 31-05-2002. *J. Blanco.*
- Badajoz: Guadajira. 29SPD90. Sobre ladera y suelo básico. Mesomediterráneo. 12-08-2002. *J. Blanco & D. Martín.*
- Badajoz: Guadajira. 29SPD90. Sobre ladera y suelo básico. Mesomediterráneo. 28-05-2003. *J.J. Barrantes & J. Blanco.*
- Badajoz: Guadajira. 29SPD90. Sobre ladera y suelo básico. Mesomediterráneo. 7-08-2003. *J.J. Barrantes & J. Blanco.*
- Badajoz: Guadajira. 29SPD90. Sobre ladera y suelo básico. Mesomediterráneo. 20/05/2004. *J. Blanco & D. García.*
- Badajoz: Guadajira. 29SPD90. Sobre ladera y suelo básico. Mesomediterráneo. 6-08-2004. *J. Blanco.*
- Badajoz: Los Santos de Maimona. 29SQC25. Sobre calizas. Mesomediterráneo. 13-05-2002. *J. Blanco & D. Martín.*
- Badajoz: Los Santos de Maimona. 29SQC25. Sobre calizas. Mesomediterráneo. 7-08-2002. *J. Blanco & J. Pozo.*
- Badajoz: Los Santos de Maimona. 29SQC25. Sobre calizas. Mesomediterráneo. 19-05-2003. *J.J. Barrantes & J. Blanco.*
- Badajoz: Los Santos de Maimona. 29SQC25. Sobre calizas. Mesomediterráneo. 4-08-2003. *J.J. Barrantes & J. Blanco.*
- Badajoz: Los Santos de Maimona. 29SQC25. Sobre calizas. Mesomediterráneo. 20-05-2004. *J. Blanco & D. García.*
- Badajoz: Los Santos de Maimona. 29SQC25. Sobre calizas. Mesomediterráneo. 16-08-2004. *J.J. Barrantes & J. Blanco.*
- Badajoz: Solana de los Barros. 29SQC18. Sobre caliza. Mesomediterráneo. 19-04-2002. *J. Blanco & F.M. Vázquez.*
- Badajoz: Solana de los Barros. 29SQC18. Sobre caliza. Mesomediterráneo. 14-08-2002. *J. Blanco & J. Pozo.*
- Badajoz: Solana de los Barros. 29SQC18. Sobre caliza. Mesomediterráneo. 28-05-2003. *J.J. Barrantes & J. Blanco o.*
- Badajoz: Solana de los Barros. 29SQC18. Sobre caliza. Mesomediterráneo. 7-08-2003. *J.J. Barrantes & J. Blanco.*
- Badajoz: Solana de los Barros. 29SQC18. Sobre caliza. Mesomediterráneo. 20-05-2004. *J.J. Barrantes & J. Blanco.*
- Badajoz: Solana de los Barros. 29SQC18. Sobre caliza. Mesomediterráneo. 9-08-2004. *J.J. Barrantes & J. Blanco.*

#### ***Thymus zygis* subsp. *zygis***

- Cáceres: La Garganta. 30TTK66. Sobre granitos. Supramediterráneo. 18-06-2003. *J.J. Barrantes & J. Blanco.*
- Cáceres: La Garganta. 30TTK66. Sobre granitos. Supramediterráneo. 11-08-2003. *J.J. Barrantes & J. Blanco.*
- Cáceres: La Garganta. 30TTK66. Matorrales sobre granitos. Supramediterráneo. 7-07-2004. *J. Blanco & D. García.*
- Cáceres: La Garganta. 30TTK66. Matorrales sobre granitos. Supramediterráneo. 12-08-2004. *J. Blanco & D. García.*

\* Procedencia del material silvestre estudiado. Se indica provincia, localidad, coordenadas UTM, tipo de hábitat, clima (vd. Tormo & al., 1995), fecha de siega, legít. Testimonios en el Herbario HSS (Badajoz, España).