

**EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE TIMOL Y CARVACROL EN ORÉGANO (*Lippia graveolens* Kunth) PARA SU EVALUACIÓN BIOLÓGICA SOBRE SEMILLAS DE MAÍZ CEBÚ (*Zea mays* L.) Y SORGO (*Sorghum bicolor* L. Moench) COMO FITORREGULADOR NATURAL**

Gámez González H<sup>a\*</sup>., Solís Flores V<sup>a</sup>., Escamilla Victorino M<sup>a</sup>., Hernández Fernández E<sup>b</sup>., Francisco Zavala García<sup>c</sup>., Moreno Limón S<sup>a</sup>.

<sup>a b c</sup> Universidad Autónoma de Nuevo León,<sup>a</sup> Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Botánica, <sup>b</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Síntesis Orgánica, <sup>c</sup> Facultad de Agronomía Av. Universidad s/n Cd. Universitaria, C.P. 66451. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

\* [hilda.gamezgn@uanl.edu.mx](mailto:hilda.gamezgn@uanl.edu.mx).

## RESUMEN

México es el principal exportador a nivel mundial de orégano mexicano; debido al contenido de aceite esencial. Su contenido de metabolitos secundarios se relaciona con el proceso de germinación y actividad biológica de muchas plantas dependiendo de la dosis. Los cereales juegan un papel primordial en la vida alimenticia del hombre por la fuente de nutrientes que proporciona, así como la gran importancia económica, en México se hace necesario estudiar el Maíz Cebú y Sorgo, los cuales por sus características agronómicas y nutricionales pudieran aportar grandes beneficios en la alimentación, a nivel mundial. Se evaluó el efecto de timol y carvacrol durante la germinación de semillas de maíz y sorgo. Se colocaron 20 semillas por caja petri en cuatro grupos de 15 cajas para cada tratamiento: 2, 1, 0.1 (ppm) y el control. A los 9 días se cortó por separado radícula, coleoptilo y endospermo. Los resultados para peso seco de coleoptilo y radícula mostraron diferencias significativas entre los tratamientos pero no entre las especies, mientras que para el peso seco del endospermo las diferencias son significativas tanto entre genotipos como entre tratamientos. A menor concentración existe un estímulo en el crecimiento. Los extractos de orégano podrían funcionar como estimulantes naturales.

## ABSTRACT

Mexico is the leading world exporter of Mexican oregano; due to the content of essential oil. Secondary metabolite content is related to the process of germination and biological activity of many plants depending on the dose. Cereals play an important role in the life of man food source nutrients it provides, as well as the great economic importance, in Mexico it is necessary to study the Cebu Corn and Sorghum, which for their agronomic and nutritional characteristics could provide large benefits in food global. The effect of thymol and carvacrol on a dry weight during germination of seeds of maize and sorghum were evaluated. 20 seeds per petri dish were placed into four groups of 15 cases for each treatment: 2, 1, 0.1ppm and the control. At 9 days separately cut radicle, coleoptile and endosperm. The results for radicle and coleoptile dry weight showed significant differences between treatments but not between species, whereas the dry weight of endosperm both are significant differences between genotypes and between treatments. A lower concentration there is a growth stimulus. Oregano extracts could act as natural stimulants.

**Palabras clave:** cereales, orégano, extractos

**Área:** Desarrollo de nuevos productos.

## INTRODUCCIÓN

La agricultura en México puede concebirse hoy en día como una actividad que proporciona un medio de subsistencia, brindando la principal fuente de alimentos, ingresos y empleo a sus poblaciones rurales. Los cereales sorgo y maíz constituyen un cultivo estratégico para el desarrollo agropecuario del país. Sin embargo, su producción en México, resulta insuficiente para cubrir las necesidades nacionales.

El orégano, es una planta originaria de México; que recientemente ha adquirido importancia económica debido a que el 90 % de la producción de su materia seca útil es exportada a los Estados Unidos de América y en menor grado a Italia y Japón. Las sustancias como timol (Lambert *et al.*, 2001), carvacrol, (Turgut-Dunford y Silva-Vázquez (2005)) que se encuentran en especies como orégano (*Poliomintha longiflora* Kunth) estimulan o inhiben el crecimiento de plantas, dependiendo de la dosis, por lo que este efecto puede utilizarse para beneficio de la agricultura al ser usadas como pesticidas o estimuladores naturales. En las plantas timol y carvacrol cumplen muchas funciones primarias como: Favorecer el crecimiento de las células, especialmente la elongación del tallo, Interviniendo en el proceso de germinación de muchas plantas (Cseke *et al.*,2006).

Para el presente estudio, se evaluó la actividad biológica de Maíz Cebú (*Zea mays* L.) y Sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) tratados con timol y carvacrol extraídos de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) mediante métodos químicos, con el fin de obtener fitorreguladores naturales e implementar esta alternativa para minimizar efectos negativos ocasionados por la utilización de compuestos químicos perjudiciales para el hombre en las siembras de cereales de importancia nacional e internacional.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Biológico

Se realizó una colecta de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) en el ejido Mina, Nuevo León. El cual se secó a temperatura ambiente separando las hojas para preparar los extractos, se utilizaron semillas de Maíz Cebú (*Zea mays* L.) y Sorgo (*Sorghum bicolor* L.Moench) suministrados por el Banco de Germoplasma de la Facultad de Agronomía de la UANL.

### **Preparación de extractos y extracción de metabolitos secundarios.**

Los extractos se obtuvieron a partir de hojas secas de orégano, las cuales se molieron y el polvo así obtenido se utilizó para la preparación de un extracto etanólico, el cual de consistencia viscosa se convirtió en polvo, agregando sílica gel y rotavaporado posteriormente se le realizó una cromatografía en columna con sílica gel, utilizando diferentes sistemas de solventes para fraccionar y separar por polaridad los metabolitos. Se repitió la cromatografía en columna y en capa fina las veces necesarias para de esta manera lograr aislar y extraer timol y carvacrol.

### **Evaluación *in vitro* de la germinación y movilización de reservas en Maíz Cebú (*Zea mays* L.) y Sorgo (*Sorghum bicolor* L.Moench) por acción de extractos timol y carvacrol.**

Se utilizaron un total de 800 semillas, 400 pertenecientes a Maíz Cebú (*Zea mays* L.) y 400 a Sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) respectivamente; cada grupo de semillas se sumergieron durante 24 horas en 200 mL de cada una de las cuatro concentraciones (2ppm, 1ppm, 0.1 ppm) y agua destilada como control. Después se colocaron 20 semillas por caja Petri, obteniendo así un total de 40 cajas: 20 de sorgo y 20 de maíz, con cinco repeticiones cada uno. Se mantuvieron a temperatura ambiente en una cámara bioclimática durante nueve días. Posteriormente se cortaron por separado la radícula, el talluelo y el endospermo colocándolos en bolsitas de papel para secarse en estufa marca Felisa a 40° C durante 48 h para obtener los pesos secos.

### **Diseño experimental y Análisis de datos**

El diseño estadístico utilizado fue completamente al azar con arreglo factorial AxBxC siendo A= semillas, B=extracto y C= concentración del extracto. Los resultados se procesaron mediante el paquete estadístico de Diseños Experimentales FAUANL Versión 2.5 (Olivares, 1994), y se analizaron mediante un análisis de varianza y además de realizar una Comparación múltiple de Medias (Tukey) elaborándose cuadros estadísticos y figuras.

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

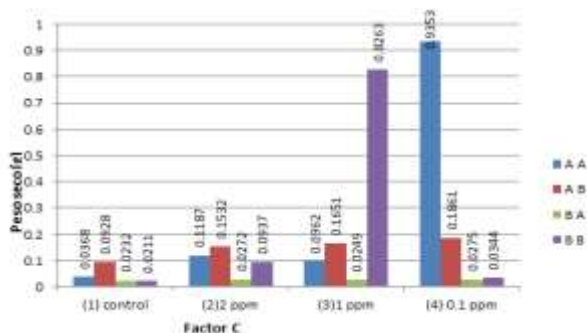
Los valores de F calculada para el peso seco (g) (Tabla I) presentan diferencias altamente significativas ( $P < 0.01$ ) para los genotipos (Factor A) de acuerdo a los tipos de semillas con respecto a los pesos secos del talluelo (PST), de la raíz (PSR) y del endospermo (PSE). Se presentaron diferencias significativas entre los extractos (Factor B) para el peso de tallo y radícula. Asimismo para las concentraciones de los extractos (Factor C) solo hubo diferencia para el peso del talluelo. De acuerdo a las interacciones entre los factores, en el peso seco del talluelo (PST) y de la radícula, las diferencias significativas se presentan entre las semillas con los tipos de extractos (AxB) mientras que solo el peso seco de talluelo presenta diferencias significativas entre las

interacciones (AxC) que son los genotipos con las diferentes concentraciones de los extractos y entre el tipo de extracto y sus concentraciones (BxC). Estos datos concuerdan con lo reportado por Gámez *et al.*, (2013).

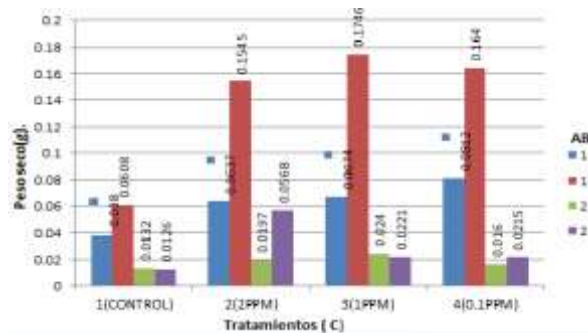
**Tabla I. Valores de F calculada en el Análisis de Varianza durante la germinación de semillas de sorgo y maíz sometidos a diferentes tratamientos de timol y carvacrol.**

	GL	PS(T)	PS R	PS(E)
BLOQUES	4	1.343ns	0.0349ns	0.968ns
FACTOR A	1	45.795**	57.89**	177.99**
FACTOR B	1	5.3384*	17.872*	0.875ns
FACTOR C	3	16.967*	4.08ns	2.5277ns
AxB	1	8.82*	10.508*	0.148ns
AxC	3	17.302*	2.289ns	4.2071ns
BxC	3	13.787*	1.255ns	0.3701ns
AxBxC	3	12.883*	0.797ns	0.2285ns
ERROR	60			
TOTAL	79			
C.V. =		96.32%	73.41%	18.98%

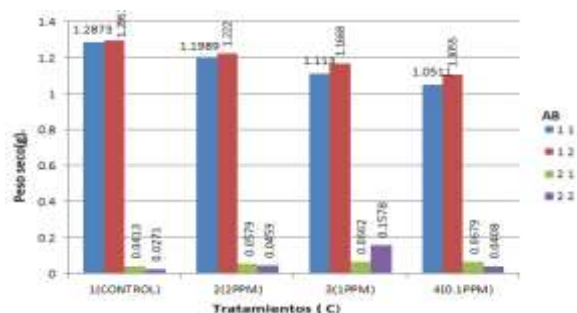
**\*\* (P<0.01): Diferencia altamente significativa; \* (P<0.05): Diferencia significativa; ns Diferencia no significativa. Factores: A = Semilla { 1) maíz, 2) Sorgo. B = extracto { 1) timol, 2) carvacrol}; C = Concentración del extracto: { 1) 2ppm, 2) 1ppm 3) 0.1pm, 4) control}.**



**Figura 1. Valores de Medias calculada para el peso seco (g) de talluelo de Maíz y Sorgo tratados con extractos etanólicos timol y carvacrol en diferentes concentraciones, durante nueve días. A= 1) maíz, 2) sorgo B = 1)timol , 2)carvacrol, C= 1)control, 2) 2ppm, 3)1 ppm, 4) 0.1 ppm.**



**Figura 2. Valores de Medias calculada para el peso seco (g) de radícula de Maíz y Sorgo tratados con extractos etanólicos timol y carvacrol en diferentes concentraciones, durante nueve días. A= 1) maíz, 2) sorgo B = 1)timol , 2) carvacrol, C= 1)control, 2) 2ppm, 3)1 ppm, 4) 0.1 ppm.**



**Figura 3. Valores de Medias calculada para el peso seco (g) de endospermo de Maíz y Sorgo tratados con extractos etanólicos timol y carvacrol en diferentes concentraciones, durante nueve días. A= 1)maíz, 2) sorgo B = 1)timol , 2)carvacrol, C= 1)control, 2) 2ppm, 3)1 ppm, 4) 0.1 ppm.**

### Peso seco de talluelo (PST)

En base a la Figura 1, la interacción entre AB (semillas y extracto) tuvo valores más altos en los tratamientos 2 ppm, 1ppm, 0.1 ppm en comparación con el control, sin embargo los valores altamente significativos fueron la interacción BB (extracto timol-extracto carvacrol) a 1ppm (0.8263 g) y en la interacción AA ( sorgo-maíz) a 0.1ppm (0.9353 g) respectivamente, por lo tanto fueron las que indujeron un mayor estímulo en el crecimiento de las semillas las cuales pudieran ser una propuesta como una alternativa a las estrategias como estimuladoras de crecimiento dependiendo de su concentración. Los productos naturales son una atractiva fuente potencial de obtención de nuevos herbicidas y nuevos bioestimulantes, no sólo por la gran diversidad y lo novedoso de sus fórmulas, sino también por la potencial especificidad de su acción biológica, y por la reducida probabilidad de producir acumulaciones dañinas y residuos perjudiciales en aguas y suelos (Gámez *et al.*, 2010).

### Peso seco de radícula (PSR)

En la Figura 2 se observa que los valores de todos los tratamientos y su interacción AB (semilla-extracto) superaron al control, sin embargo entre los dos tratamientos más altos no existió diferencia significativa. Estas concentraciones mostraron incrementar de una manera significativa el crecimiento de la raíz como lo reportado por Albado *et al* (2001) y Flores (1991) quienes mencionan que terpenos como timol y carvacrol que se encuentran en especies como orégano (*Poliomintha longiflora* A. Gray) estimulan o inhiben el crecimiento de plantas, dependiendo de la dosis, por lo que este efecto puede utilizarse para beneficio de la agricultura al ser usadas como pesticidas a dosis altas o enraizadores naturales a dosis bajas.

### Peso seco de endospermo (PSE)

En base a la Figura 3, se puede notar que en todos los tratamientos existen valores altamente significativos en la interacción AA (semilla-semilla) y AB(semilla-extracto), siendo el control con los valores más altos corroborando de esta manera que se obtuvieron mayores pesos debido al poco desarrollo tanto de la radícula como del talluelo.

## CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos y conforme a las condiciones experimentales en las que se llevó a cabo esta investigación se concluye que los metabolitos secundarios timol y carvacrol extraídos mediante métodos químicos a concentraciones bajas son capaces en semillas de maíz Cebú (*Zea mays* L.) y sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) de estimular la germinación y crecimiento de radícula y talluelo por lo que se podría sugerir su aplicación en otras semillas de interés comercial y alimentario, debido a que los productos naturales son una atractiva fuente potencial de obtención de nuevos bioherbicidas (a altas concentraciones) y nuevos bioestimulantes (a bajas concentraciones), no sólo por la gran diversidad y lo novedoso de sus fórmulas, sino también por la potencial especificidad de su acción biológica.

## BIBLIOGRAFÍA

- Albado E, Saez G, Grabiell S. 2001. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). (Rev Med Hered : 12: 16-19).
- Flores G., J. G. 1991. Selección de una propuesta de manejo para orégano en la zona norte de Jalisco En: Meléndez G., R., S. A. Ortega R. y R. Peña R. (eds.). Estado actual del conocimiento sobre el orégano en México. Unidad Regional de Zonas Áridas, Universidad Autónoma de Chapingo; Bermejillo, Durango, México.
- Gámez González H., Moreno Limón S., Vallejo López WA., Sierra Carrillo S., Soria León HA, Solís Flores V. 2013. Cinética de degradación del almidón durante la germinación de semillas de cuatro genotipos de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) por efecto de extractos foliares de orégano. RESPYN (7): 1-6.
- Gámez González H., Moreno Limón S., Zavala García F. 2010. Plantas con propiedades alelopáticas. En: De la Lechuguilla a las Biopelículas Vegetales. Las Plantas útiles de Nuevo León. 1a. Edición. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. pp: 301-329.
- Cseke, L.J.; Kirakosyan, A.; Kaufman, P.B.; Warber, S.; Duke, J.A. y Brielman, H.L. 2006. Natural products from Plants. Second Edition. CRC press. Boca Raton, USA.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., Nychas, G.-J. E. (2001). A study of minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of applied microbiology. 91, 453-462.
- Turgut-Dunford, N., Silva-Vazquez, R. (2005). Effect of water stress on plant growth and timol and carvacrol concentrations in mexican oregano grown under controlled conditions. Journal of Applied Horticulture 7(1), 20-22.