

II. MATERIAL Y MÉTODOS

II. 1. PARCELA EXPERIMENTAL.

Este ensayo agronómico se realiza en la finca experimental Torreblanca del IMIDA, situada en Torre Pacheco (Murcia), próxima al litoral murciano, a 37° 47' latitud Norte, 0° 53' longitud Oeste, y a una altitud de 45 m.s.n.m (Figura II-1).



Fig. II-1. Parcela de Torreblanca.

II. 1. 1. Características edafoclimáticas.

Se trata de una zona cuya escasez de agua determina la marginalidad de las tierras de cultivo, al igual que ocurre en áreas del Campo de Cartagena y Sudeste de la región (Sotomayor, 1998).

El suelo es aluvial cuaternario, con una alta proporción de arcilla. Su composición, en los primeros 30 cm, es la siguiente:

Arcilla	51,61%
Limo	33,98%
Arena	14,41%

Las características edafológicas de la parcela son:

C.E. (dS/m)	1,38
ph	7,80
C.C.C. (meq/100 g)	18,90
Caliza activa (%)	28,16
Carbonatos totales (%)	46,68
Materia orgánica (%)	0,64
Nitrógeno total (%) "Kjeldahl"	0,07
Fósforo asimilable (ppm) "Olsen"	28,80
Potasio asimilable (meq/100 g)	1,00

Este suelo muestra una Capacidad de Campo del 39% (por volumen) y un Punto de Marchitez del 21%.

Los valores termométricos de la finca experimental muestran una temperatura media anual de 18,2 °C, una temperatura media de las máximas del mes más frío (enero) de 16,4 °C, y una temperatura media

de las mínimas del mes más frío de 5,5 °C. En base a estos parámetros se calcula el índice de termicidad (It), cuyo valor es de 401, lo que sitúa esta zona en el horizonte bioclimático del Termomediterráneo superior (Alcaraz *et al.*, 1989). Este índice es de gran utilidad, ya que ofrece una medida de la intensidad del frío, factor limitante para el desarrollo de muchas plantas y comunidades vegetales (Rivas-Martínez, 2004).

La Tabla II-1 muestra las temperaturas mensuales y la radiación solar medidas en la parcela en los tres años de ensayo que abarca la presente memoria, según datos del Servicio de Información Agraria de Murcia (SIAM) del IMIDA, Consejería de Agricultura y Agua, a través de su página web (<http://wsiam.carm.es>).

Tabla II-1. Valores de temperatura y radiación en Torreblanca.

	2002				2003				2004			
	T (°C)			Radiación	T (°C)			Radiación	T (°C)			Radiación
	MED	MAX	MIN	(W/m ²) MED	MED	MAX	MIN	(W/m ²) MED	MED	MAX	MIN	(W/m ²) MED
ene	10,0	11,9	7,5	118,7	9,5	12,9	4,6	127,5	10,9	17,0	6,2	139,6
feb	10,6	13,8	8,0	182,1	9,8	13,1	5,0	137,5	10,3	12,9	7,2	139,8
mar	13,0	17,6	9,6	206,5	12,7	18,3	10,5	193,6	11,8	15,9	5,2	175,1
abr	14,1	18,9	10,3	250,4	14,6	18,2	10,4	246,7	13,3	16,4	7,2	243,8
may	17,4	21,5	11,7	290,1	18,0	21,6	14,0	308,6	16,2	21,1	12,1	267,6
jun	22,4	25,2	19,7	306,7	23,7	27,0	19,8	313,9	22,2	25,9	18,6	326,3
jul	23,9	25,7	21,7	310,0	25,5	28,5	23,7	315,6	23,9	27,5	21,5	306,1
ago	24,2	26,2	22,0	257,8	26,4	28,0	23,8	288,0	25,4	27,2	23,9	277,4
sep	22,2	23,7	19,7	226,8	22,9	26,1	20,7	224,4	23,0	27,1	19,3	207,2
oct	18,3	21,3	15,5	160,7	18,1	23,6	13,1	146,2	18,7	22,5	13,0	173,5
nov	14,3	19,8	10,7	120,2	13,8	16,3	10,7	111,0	12,4	16,8	7,8	131,3
dic	11,7	15,1	8,7	100,0	10,5	14,5	6,5	113,6	10,8	15,5	5,1	95,5

La pluviometría media de esta zona es de 308,3 mm/año, lo que señala un ombroclima semiárido.

II. 1. 2. Diseño experimental de la plantación.

En el presente trabajo se estudia como variable el efecto de distintas dosis de riego sobre las plantas, con el fin de determinar las mejores condiciones de desarrollo en cultivo de tres especies distintas de tomillo.

Para ello, la plantación se realiza con bloques al azar, para prevenir posibles gradientes de productividad dentro del área de los ensayos. En concreto, se establecen cuatro bloques o repeticiones (B1, B2, B3, B4), tal como se aprecia en la Figura II-2.

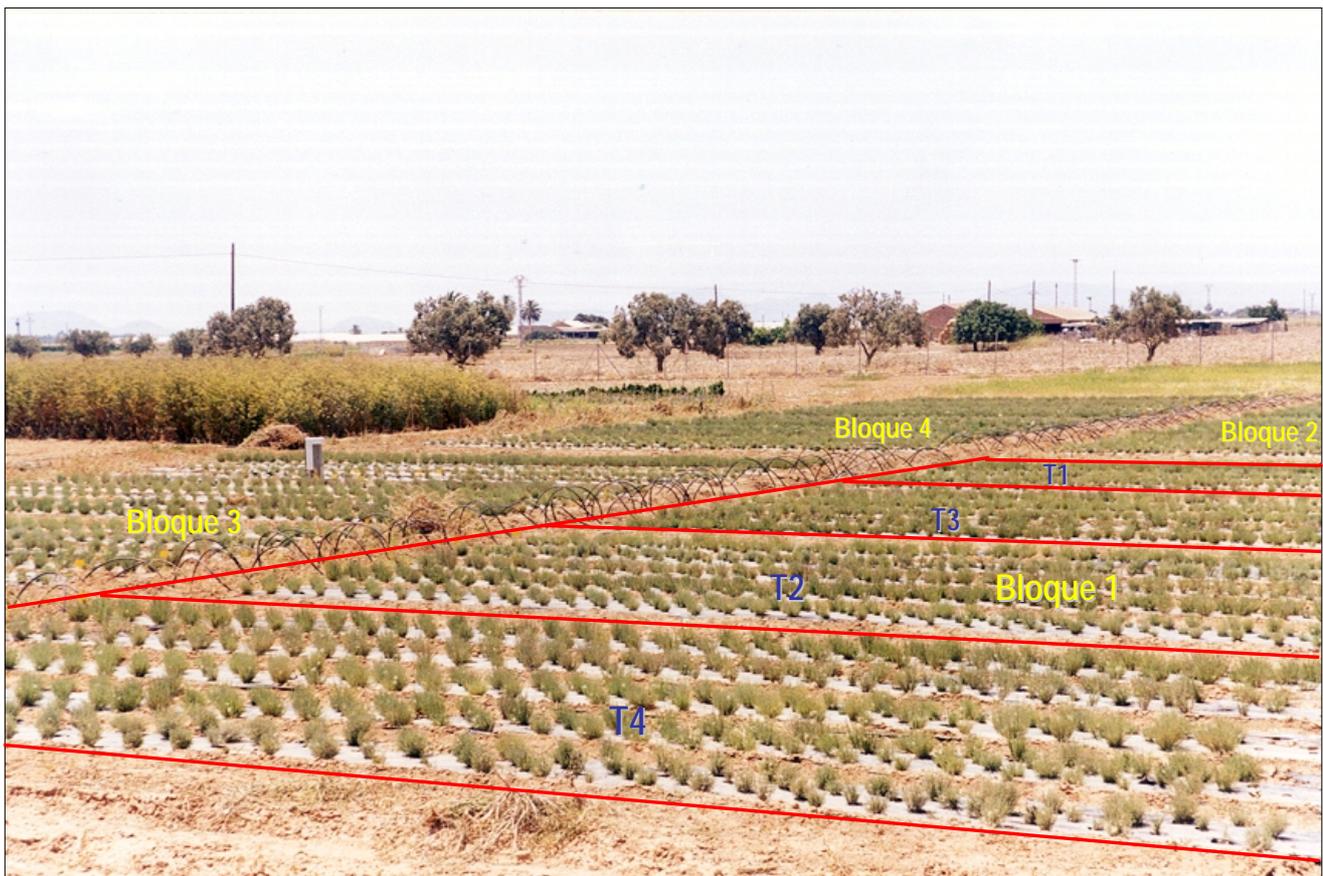
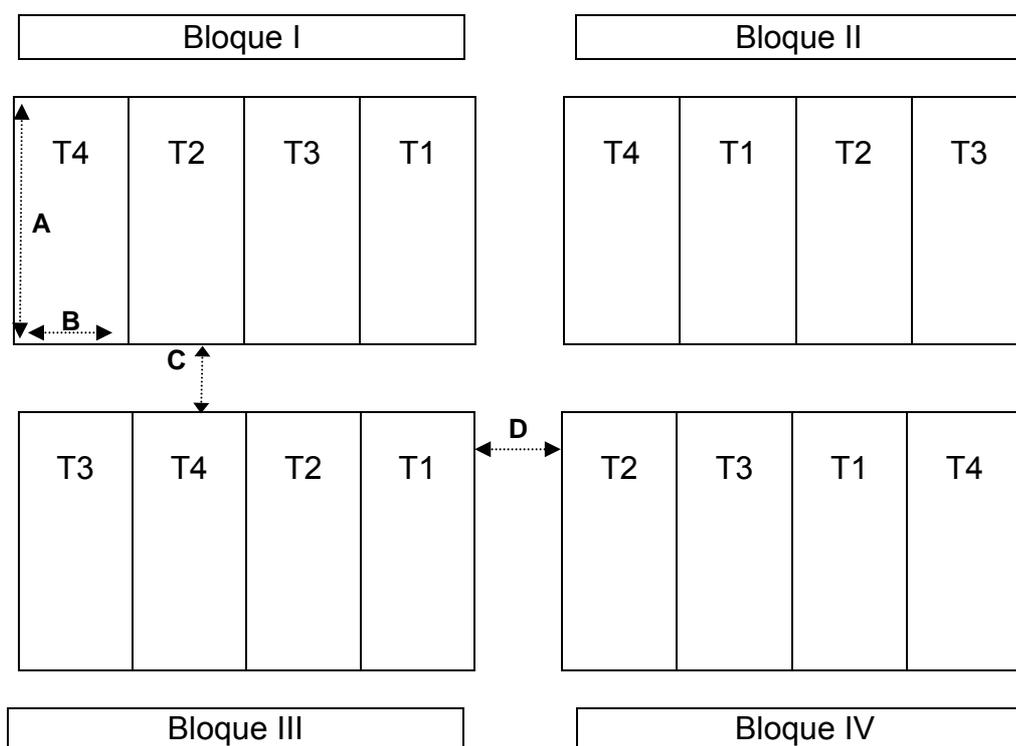


Fig. II-2. Disposición de las repeticiones en la parcela.

Cada bloque se divide en cuatro parcelas que se corresponden con cuatro tratamientos de riego localizado (T1, T2, T3, T4), los cuales se distribuyen igualmente al azar, representando cada uno de ellos un aporte hídrico concreto que permitirá dilucidar la dosis de agua óptima para el desarrollo y productividad de cada una de las plantas consideradas.

Esquemáticamente, el diseño de la parcela sería el siguiente:



A = 10,8 m

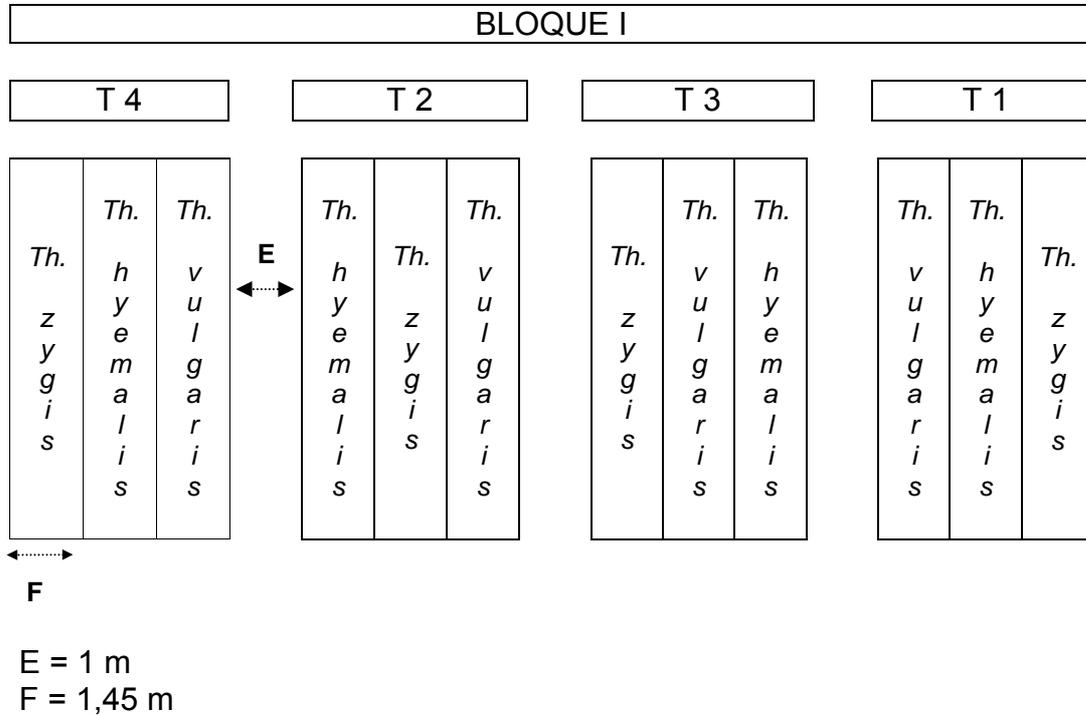
B = 7,25 m (incluidos los espacios necesarios para la maquinaria agrícola)

C = 3 m

D = 2 m

Todas las parcelas-tratamiento se subdividen a su vez en tres subparcelas de 15,66 m², cultivándose en ellas las tres especies objeto de esta Tesis. Los distintos tipos de tomillo se disponen aleatoriamente en las diferentes subparcelas.

De esta forma, y considerando un solo bloque, el esquema que refleja la disposición de las plantas es el que aparece a continuación:



En cada una de las subparcelas se colocan dos líneas de tuberías de polietileno con goteros integrados a 30 cm, y enterradas a 15–20 cm de profundidad, para el suministro de agua. Las tuberías están separadas 35 cm, y el caudal nominal a través de los goteros, a 1 bar, es de 1,7 litros/hora. Las subparcelas son protegidas con cubiertas de plástico situadas directamente sobre el terreno, con el fin de evitar en lo posible la proliferación de malas hierbas. Todo esto se realiza con un apero igual a los utilizados para plantar pimiento de bola, al cual se le practican las modificaciones necesarias para que la colocación de las tuberías y la extensión del plástico se pueda realizar de forma simultánea (Figura II-3).



Fig. II-3. Apero utilizado para la colocación de tuberías y plásticos.

En el momento de realizar la plantación se practican orificios en el plástico para colocar las plantas. Éstas se disponen a ambos lados de cada línea de goteros, al tresbolillo, separadas 10 cm de las tuberías, y con una separación entre plantas de 30 cm (Figura II-4). El número de plantas que se deposita en cada subparcela es de 140, lo que constituye una densidad de 89.400 plantas/ha (Figura II-5).

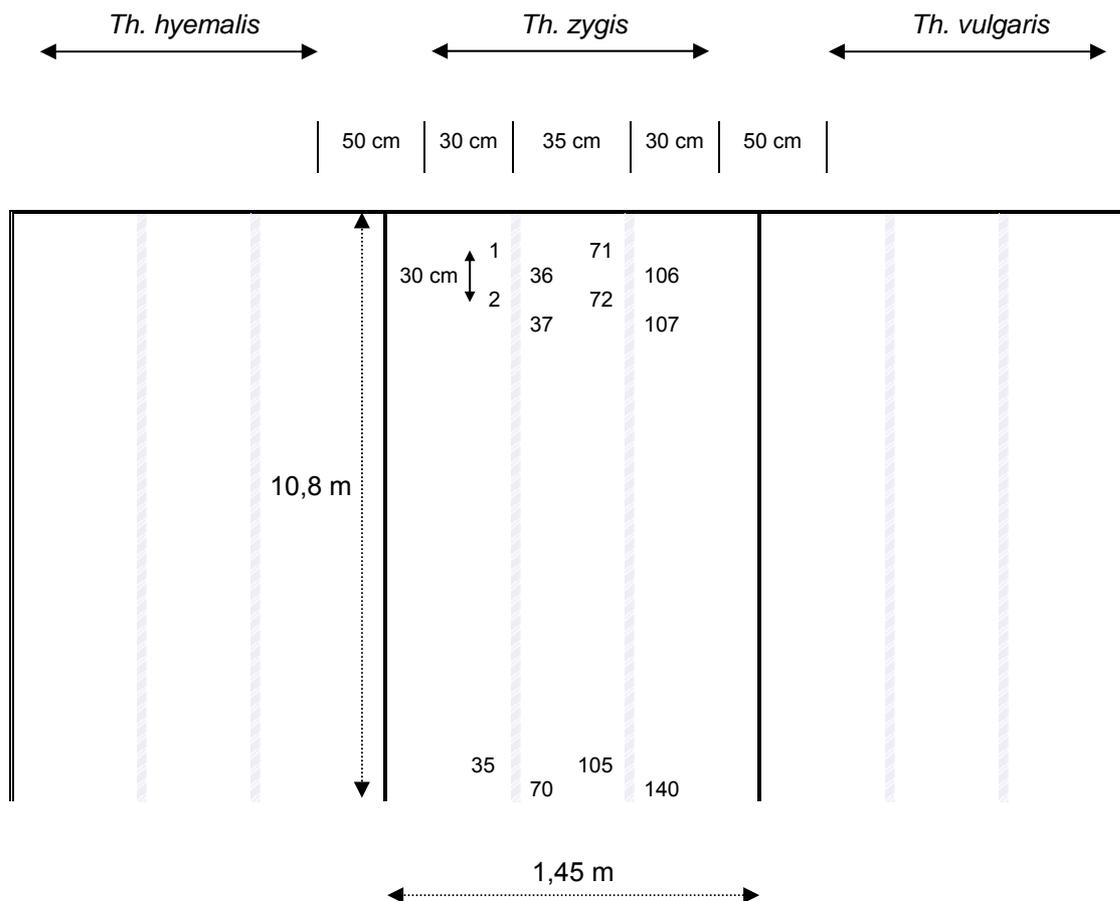


Fig. II-4. Vista esquemática de la disposición de las plantas. Los trazos azules representan las líneas de goteos, y los espacios de 50 cm que separan cada especie de tomillo serían los necesarios para el paso de la maquinaria agrícola.

Para preparar el terreno, se realiza un abonado de fondo sobre la parcela con el fin de que el suelo contenga las Unidades Fertilizantes que recomienda Muñoz (1987) para el cultivo de tomillos:

- 75–80 U. F. de nitrógeno en la preparación del suelo.
- 50–60 U. F. de fósforo en la preparación del suelo.
- 100–120 U. F. de potasio en la preparación del suelo.

En años posteriores se llevan a cabo análisis de minerales en plantas, y se aplican las dosis de abonado necesarias para restituir al terreno los macro y micronutrientes extraídos por los tomillos, de forma

que las plantas dispongan de las mismas cantidades de nutrientes durante todo el ensayo. El abono se suministra disuelto en el agua de riego (fertirrigación).

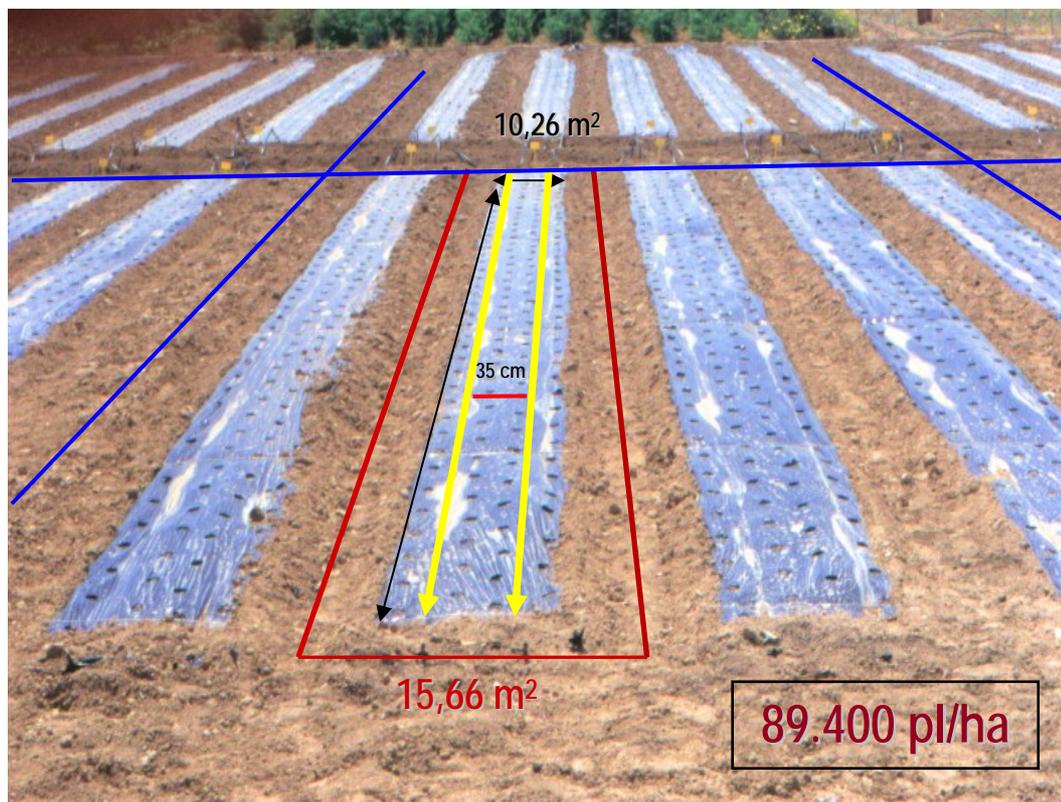


Fig. II-5. Vista real de la distribución de las plantas en las subparcelas. Las flechas amarillas indican la disposición de las tuberías de riego. El espacio ocupado por las plantas, sin considerar el terreno necesario para la separación entre especies, determina un área de 10,26 m².

II. 1. 3. Cálculo de las dosis de riego.

En este apartado se detalla la cantidad de agua que han recibido las plantas. Estos aportes hídricos se han establecido con el fin de abarcar un amplio rango de respuestas por parte de las mismas frente a las diferentes dosis de agua, buscando la mayor producción de fitomasa y el máximo rendimiento y calidad del aceite esencial.

Para ello se suministra a todas las especies estudiadas cuatro tratamientos básicos que consisten en cuatro dosis de riego diferentes, estimadas en función de la Evapotranspiración Potencial (ETP) anual de la zona de cultivo. Dado que la ETP difiere según el tipo planta, con el fin de facilitar valores reproducibles se emplea la correspondiente Evapotranspiración de referencia de gramíneas (ETo), que en la zona de estudio es de 1.234 mm anuales.

En mayo de 2000, fecha en la que se realiza la plantación, se proporciona a toda la parcela un riego inicial para facilitar la supervivencia de las plantas, con una dosis de agua de aproximadamente 20 litros/m².

Posteriormente, y hasta julio de 2001, el agua aportada al cultivo es la necesaria para compensar el 60% de la ETo.

A partir de dicha fecha, comienzan a aplicarse los tratamientos de riego diferenciados, cuyos resultados se analizan en esta memoria.

La cantidad de agua que reciben las plantas se programa para atender las siguientes necesidades hídricas:

- Tratamiento de riego para compensar el 80% de la ETo (T1).
- Ídem al 60% de la ETo (T2).
- Ídem al 40% de la ETo (T3).
- Ídem al 20% de la ETo (T4).

Los valores, calculados según el modelo Penman-Monteith, han sido facilitados por el SIAM (<http://wsiam.carm.es>).

Los riegos se programan semanalmente teniendo en cuenta la ETo de la semana anterior y las precipitaciones caídas en la parcela, regulándose así el total de agua suministrado a las plantas. En la práctica, el aporte hídrico varía ligeramente respecto a los valores propuestos,

determinándose que los niveles reales de agua que reciben las plantas se corresponden con lo especificado en la Tabla II-2.

Tabla II-2. Tratamientos de riego aplicados.

% ETo propuesto	% ETo real (Promedio anual)	Equivalencia ETo (mm/año)*
80	81	1.000
60	63	777
40	44	543
20	30	370

* *Cantidades calculadas en base a la ETo real.*

Como se puede observar, el aporte hídrico equivalente al 30% de la ETo es sólo ligeramente superior a las precipitaciones medias de la zona de cultivo, que se sitúan en 308 mm/año.

II. 2. MATERIAL VEGETAL.

Los datos reflejados en la presente memoria se refieren a un cultivo experimental de tres especies del género *Thymus*, las cuales se han elegido en base a los resultados obtenidos en ensayos previos realizados en el IMIDA (Sotomayor, 1998), considerando su respuesta al cultivo en cuanto a producción de biomasa, rendimiento en aceite esencial y composición química de dicho aceite. En este último caso, se ha prestado especial atención al contenido fenólico, ya que compuestos como timol y carvacrol son los más interesantes desde el punto de vista comercial.

Teniendo esto en cuenta, fueron seleccionadas para su estudio dos especies espontáneas en el Sudeste Ibérico, y una tercera comercial de origen francés, empleándose esta última como referencia agronómica (Tabla II-3).

Tabla II-3. Especies objeto de investigación.

Especies espontáneas	Procedencia
<i>Thymus hyemalis</i>	(Campo de Cartagena, Murcia)
<i>Thymus zygis</i> subsp. <i>gracilis</i>	(Puerto Lumbreras, Murcia)
Especie comercial	
<i>Thymus vulgaris</i>	(Cultivar de Provenza, Francia)

El material vegetal empleado en este ensayo, excepto en el caso del tomillo común, proviene de semillas recolectadas en zonas donde estas plantas crecen espontáneamente. Estas semillas pueden dar origen a individuos muy heterogéneos, ya que proceden de tomillares naturales en los que encontramos una gran variabilidad (Sáez, 1995 a y b). Para conseguir una población uniforme se requeriría una selección clonal previa.

Las semillas comerciales de *Th. vulgaris* fueron compradas a la empresa francesa Vilmorin.

Tras la obtención de las semillas, se realiza una siembra en bandejas de poliestireno expandido, con alvéolos troncopiramidales de 2,5 x 2,5 cm de base y 5 cm de altura. El semillero se elabora en febrero de 2000, y la germinación se produce a las 3 semanas. Las plantas se repican cuando alcanzan una altura de 6 a 8 cm.

Después de la germinación, las plántulas obtenidas se mantienen en invernadero durante tres meses.

Transcurrido ese tiempo, todas las plantas fueron extraídas y trasladadas a la parcela experimental (mayo de 2000).

En el trabajo realizado por Sotomayor (1998) se observa una alta tasa de mortalidad cuando los tomillos se siembran en el terreno definitivo a raíz desnuda, especialmente en el caso de *Th. hyemalis*. Por ello, en el presente ensayo las plantas fueron transplantadas con cepellón,

cubriendo y protegiendo así la raíz, con el fin de mejorar los resultados obtenidos en cuanto a supervivencia en cultivo.

La recolección se realiza cuando las plantas se encuentran en período de floración-fructificación, ya que este ha demostrado ser el estado fenológico más adecuado en cuanto a producción de material vegetal, así como en rendimiento y calidad del aceite esencial (Sotomayor, 1998; Jordán *et al.*, 2006).

Cuando se procede a la recolección del tomillo, se deben tener en cuenta algunos factores que pueden afectar a las plantas y, por lo tanto, al rendimiento de la parcela: en primer lugar, se debe segar sólo la parte aérea de cada individuo, realizando el corte a una altura que permita a la planta conservar la suficiente masa vegetal para facilitar el rebrote; por otra parte, es importante sujetar correctamente el tomillo en el momento de la siega, con el fin de moverlo lo menos posible para evitar descalzar la planta.

II. 2. 1. Recolecciones.

Los muestreos y siegas realizados a lo largo de los años 2002, 2003 y 2004 de las tres especies proporcionan los resultados que se muestran en esta Tesis. En 2002 y 2003 se analiza el efecto de las distintas dosis de riego sobre los parámetros considerados, y en 2004 se lleva a cabo un estudio en profundidad de la variabilidad intraespecífica encontrada en estas plantas, con objeto de realizar una selección de las más adecuadas para su posterior multiplicación.

La plantación, como se menciona anteriormente, se realiza en mayo del año 2000, y entre noviembre y diciembre de ese año se practica una primera recolección de todas las plantas. Los sucesivos muestreos y recolecciones, que tienen lugar a partir de 2001, se detallan por especies

en la Tabla II–4. Los datos correspondientes a 2001 no se han incluido en esta memoria de Tesis, ya que, como se indica en el apartado precedente, los tratamientos de riego específicos comenzaron en julio de 2001, no siendo apreciables sus efectos hasta las recolecciones de 2002. Este diferente aporte hídrico es el fundamento del presente estudio, aunque se señalan las recolecciones de 2001 con el fin de conocer el número de siegas que han experimentado las plantas.

Tabla II–4. Calendario de recolecciones.

	<i>Th. hyemalis</i>		<i>Th. vulgaris</i>		<i>Th. zygis</i>
	1ª recolección	2ª recolección	1ª recolección	2ª recolección	Única recolección
2001	marzo	julio	abril	junio	junio
2002	febrero	mayo	febrero	mayo	junio
2003	marzo	junio	mayo	—	junio
2004	marzo	junio	mayo	—	junio

⇒ De *Th. hyemalis* se obtienen dos cosechas anuales en condiciones de cultivo. En 2003, sin embargo, la segunda recolección se vio afectada por el exceso de calor que tuvo lugar durante la segunda quincena de mayo y el mes de junio, lo que provocó una floración rápida, con un escaso crecimiento de las plantas, especialmente en los tratamientos con menor aporte hídrico. Por este motivo, en 2003 sólo se ha considerado la primera recolección, ya que los datos de la segunda son poco relevantes.

⇒ *Th. vulgaris* produjo igualmente dos cosechas en 2002, pero en 2003 y 2004 las plantas no alcanzaron un momento óptimo de desarrollo hasta principios de mayo, por lo que se realizó una única recolección en esa fecha. Las condiciones climatológicas a las que se vieron expuestas las plantas durante los meses de mayo y junio de 2003 originaron un

rebrote de las plantas casi inmediatamente después de la siega, pero sólo en aquellas que recibieron un mayor aporte de agua.

⇒ *Th. zygis* produce una única cosecha anual, en la primera quincena de junio.

II. 2. 2. Número y procesado de las muestras vegetales.

Para estudiar si un diferente aporte hídrico puede repercutir en el rendimiento y la calidad del aceite esencial, en 2002 y 2003 se recolectan al menos 48 plantas de cada especie (3 plantas x tratamiento x 4 tratamientos = 12 plantas x 4 bloques = 48 plantas). Siempre que ha sido posible, se procurado coger los mismos tomillos en cada recolección, para lo cual, tras segar cada planta seleccionada para ser destilada, ésta es marcada con etiquetas identificativas.

En 2004, para examinar la variabilidad intraespecífica y determinar cuáles de estas plantas resultan más interesantes, especialmente en lo referente a la composición química de sus aceites esenciales, se plantea la necesidad de aumentar el número de individuos recolectados para su análisis. Por ello, este año se toma un número considerablemente superior de ejemplares respecto a los años anteriores, recolectándose al menos 96 plantas de cada una de las especies consideradas (6 plantas x tratamiento x 4 tratamientos = 24 plantas x 4 bloques = 96 plantas), excepto de *Thymus vulgaris*, ya que este tomillo, en nuestro caso, es de origen comercial y está sometido a una selección previa, por lo que se considera innecesario tomar un número tan elevado de individuos, y sólo se ha realizado un análisis de la evolución del cultivo tras someterlo a una nueva siega.

Todas las plantas muestreadas se introducen en bolsas de plástico perforadas para evitar condensaciones debidas a la humedad, y son pesadas en fresco inmediatamente después de su recolección.

Seguidamente, se secan con calor artificial en estufa a 35 °C durante 48 horas, hasta alcanzar peso constante, para la posterior extracción de su aceite esencial. En este sentido, Venskutonis (1997) comprueba que los constituyentes de estos aceites no ven alterada su concentración si los tomillos se desecan a 30 °C, con resultados similares a los obtenidos de la planta fresca. Si la temperatura se eleva hasta los 60 °C, se produce una reducción del 43% en el contenido en compuestos volátiles de la planta.

Cuando se han tomado las muestras necesarias, se procede a la siega de toda la parcela, con lo que se posibilita el rebrote de las plantas y la obtención de nuevas cosechas. Las siegas, que se realizan a mano dado el tamaño de la parcela y la necesidad de conseguir resultados precisos y reproducibles, aportan el material vegetal necesario para expresar los datos de producción de fitomasa. Para ello, dicho material vegetal es separado por bloques y tratamientos, e inmediatamente después de ser recolectado se pesa en fresco. A este peso se debe sumar el correspondiente a las muestras recolectadas para su análisis. Obtenidos los pesos totales, se calcula el promedio alcanzado entre los cuatro bloques para cada una de las dosis de agua. Así se determina la producción de materia fresca (MF) en función del riego recibido por las plantas.

Para calcular la proporción de materia seca (MS) que corresponde a esos kg de tomillo obtenidos en fresco, se seleccionan muestras representativas de material vegetal de todos los tratamientos en el momento de la siega, hasta alcanzar 2 kg de producto verde por tratamiento. Estas muestras son igualmente desecadas en estufa a 35 °C. Una vez obtenido el peso seco, se puede calcular el porcentaje de

materia seca que proporcionan las distintas dosis de riego considerando el peso fresco del material vegetal que se había separado en cada caso:

$$\% \text{ MS} = (\text{Ps}/\text{Pv}) \times 100$$

Ps = Peso seco.
Pv = Peso verde.

Seguidamente, se obtiene el porcentaje de hoja seca (HS) separando hojas y tallos de cada muestra empleada para determinar la proporción de materia seca. Se usan para ello tamices de mayor a menor paso de luz (3 a 0,2 mm de luz), por los que se hace pasar sucesivamente el material vegetal desecado hasta conseguir aislar las hojas. A continuación, se pesan éstas, y se determina su porcentaje respecto al peso seco para todos los tratamientos de riego:

$$\% \text{ HS/MS} = (\text{PHs}/\text{Ps}) \times 100$$

PHs = Peso hoja seca.

Conocidos ambos porcentajes, resulta sencillo precisar los kg de material vegetal en seco y de hoja producidos por el cultivo en función del aporte hídrico, y extrapolar los resultados a hectáreas considerando nuestro marco de plantación.

$$\begin{aligned} \text{Kg MS} &= (\text{Kg MF} \times \% \text{MS}) / 100 \\ \text{Kg HS} &= (\text{Kg MS} \times \% \text{HS/MS}) / 100 \end{aligned}$$

II. 3. EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL.

Es importante señalar que el método empleado para la obtención de estos aceites puede afectar a su rendimiento y composición, siendo la

destilación la técnica más utilizada para la separación de los constituyentes volátiles de una muestra.

El objeto de este ensayo es determinar la influencia de la dosis de riego sobre el rendimiento en aceite esencial, rendimiento que se calcula respecto al peso seco de cada planta.

Para ello, las plantas muestreadas se someten individualmente a destilación con agua o hidrodestilación con un sistema tipo *Clevenger* (European Pharmacopeia, 1990) como el que aparece en la Figura II-6.

El sistema consta de manta calefactora, matraz esférico de 2 L de capacidad, tapa para matraz, tubo colector de esencias con escala de 2 ml, y refrigerante.

El material vegetal procedente de cada ejemplar recolectado, tras ser desecado y pesado, se deposita en el interior del matraz de destilación, añadiendo 1 L de agua destilada. Se sitúa el matraz en la manta calefactora y se cubre con la tapa, sellándose la unión entre ambos utilizando silicona y una abrazadera metálica para evitar pérdidas de sustancias volátiles. El tubo colector se acopla al cuello de la tapa, y finalmente, en la parte superior del colector de esencias se coloca el refrigerante, a través del cual circula agua fría. Cuando la manta calefactora calienta el agua del matraz y ésta entra en ebullición, el vapor de agua arrastra el aceite esencial de la muestra, de naturaleza volátil, y ambos condensan en el refrigerante. La diferencia de densidad entre las dos fases (agua y aceite esencial) permite la separación de ambas sustancias. La fase acuosa se va reciclando al matraz de destilación, con lo que se reduce la posibilidad de que pequeñas cantidades de componentes del aceite puedan quedar retenidas en el agua. Este proceso se prolonga durante 3 horas, para asegurar la extracción de todos los constituyentes volátiles de la planta.



Fig. II-6. Sistema Clevenger empleado en la extracción del aceite esencial.

Transcurrido ese tiempo, el aceite esencial se recupera directamente del tubo colector, y su volumen es medido en una probeta. Para eliminar los restos de agua de la muestra se emplea sulfato sódico anhidro, y finalmente, los aceites se depositan en viales ámbar de 2 ó 4 ml, y se conservan a 4 °C para su posterior análisis cromatográfico.

El porcentaje de aceite esencial obtenido de cada planta se calcula considerando el volumen de aceite producido (en ml) y el peso seco de la muestra (en gr). Teniendo en cuenta los porcentajes de aceite y los kilos de materia seca alcanzados con cada tratamiento, se puede determinar la producción por hectárea de esta sustancia.

II. 4. ANÁLISIS DE COMPONENTES.

El control de calidad de los aceites esenciales obtenidos tras la destilación se realiza mediante Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas, para identificar y cuantificar los componentes volátiles de dichos aceites en las distintas especies cultivadas de tomillo.

II. 4. 1. Cromatografía de Gases (GC).

Los componentes volátiles presentes en cada muestra de aceite esencial son identificados y cuantificados mediante cromatografía gaseosa capilar, empleando para ello un cromatógrafo Agilent 5890 Serie II, equipado con un detector de ionización de llama (FID). La cromatografía de gases es la técnica más adecuada para el estudio de estos aceites, ya que presenta una elevada sensibilidad y una gran eficacia en la separación de los distintos constituyentes de estas sustancias.

Se analizan muestras de 0,1 μ L de aceite esencial, y la separación se realiza en una columna capilar HP-5 (5% Fenil Metil Siloxano entrecruzado) de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μ m de espesor de fase estacionaria.

El detector y el inyector se mantienen a 280 y 250 °C respectivamente. Se emplea helio como gas portador, con un flujo a

través de la columna de 1 mL/min, que se mantiene constante durante todo el análisis. Dada la elevada concentración a la que se encuentran los constituyentes volátiles de estos aceites, la inyección se realiza con una relación de división de flujo (split ratio) de 100:1.

La rampa de temperatura aplicada al horno es la siguiente:

Temperatura inicial	60 °C
Tiempo inicial	4 minutos
Programa	1 °C/min, hasta 64 °C
Programa	2,5 °C/min, hasta 155 °C
Programa	5° C/min
Temperatura final	250 °C

II. 4. 2. Espectrometría de Masas (MS).

La identificación rigurosa de los diferentes constituyentes del aceite esencial detectados mediante Cromatografía de Gases (FID), se complementa con análisis por Espectrometría de Masas de los perfiles volátiles de dichos aceites.

Para ello, las muestras se inyectan en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N, acoplado a un espectrómetro de masas 5973 *inert* como detector. En este caso, se emplean dos columnas distintas que separan los componentes en función de diferentes características: una columna HP-5 igual a la descrita anteriormente, de naturaleza ligeramente polar, que separa los componentes en base a su punto de ebullición, y una columna DB-WAXETR (polietilenglicol ligado) de 30 m de longitud, 0,32 mm de diámetro interno y 1 µm de espesor de fase estacionaria, capaz de separar los constituyentes de los aceites considerando también su polaridad.

Las condiciones cromatográficas, en el caso de la columna HP-5, son idénticas a las ya expuestas para el cromatógrafo de gases equipado con FID.

Con la columna DB-WAXETR, el volumen de muestra inyectado fue igualmente de 0,1 μL , usándose una relación de división de flujo de 100:1. El gas portador es también helio, con un flujo constante de 1 mL/min en columna. Las temperaturas de inyector y detector coinciden con las detalladas en el apartado anterior.

El programa de temperatura en el horno, en este caso, es el siguiente:

Temperatura inicial	60 °C
Programa	2,5 °C/min
Temperatura final	220 °C, 15 minutos

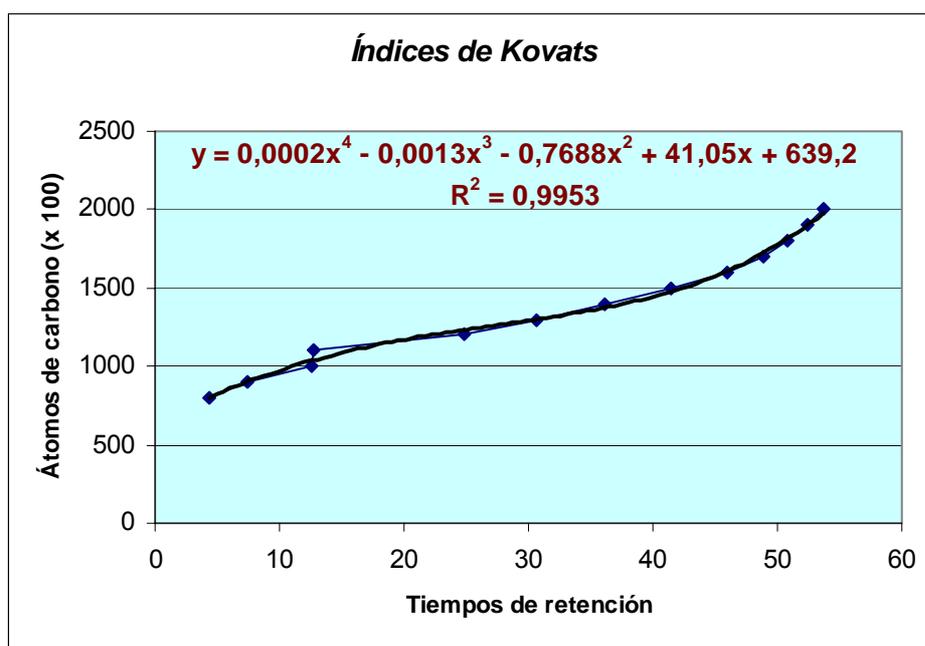
II. 4. 3. Análisis cualitativo y cuantitativo.

Los componentes individuales son identificados mediante la comparación de sus tiempos de retención y sus índices de retención (Índices de Kovats) con los de los componentes puros empleados como patrones de referencia, inyectados en las mismas condiciones cromatográficas que los aceites, y por la semejanza de los espectros de masas de los componentes a identificar con aquellos que se encuentran recogidos en la biblioteca NIST98 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD), así como con los espectros obtenidos para los componentes puros.

El índice de retención de Kovats expresa el número de átomos de carbono (multiplicado por 100) de un hipotético alcano que tendría un tiempo de retención igual al del componente de interés cuando se

analizan bajo idénticas condiciones. Estos valores se obtienen por interpolación, relacionado el tiempo de retención del constituyente a identificar con los tiempos de retención de dos alcanos que eluyen inmediatamente antes y después de él.

Para calcular los índices de Kovats se han empleado hidrocarburos alifáticos de 6 a 17 átomos de carbono, obteniéndose para cada uno de ellos su correspondiente tiempo de retención. El punto de ebullición de estos hidrocarburos se incrementa a medida que aumenta la longitud de su cadena, representándose gráficamente los tiempos de retención que corresponden a cada hidrocarburo en función de su número de átomos de carbono.



Algunos componentes son identificados tentativamente teniendo en cuenta la biblioteca de espectros NIST y sus correspondientes índices de retención, ya que no disponemos de los patrones de referencia. Esos componentes son:

- *Hydrocarburos terpénicos*: triciclono, α -tujeno, verbeneno, (*E*)- β -ocimeno, α -gurjeneno, germacreno, elemeno, β -selineno, α -muuroleno y γ -cadineno.
- *Alcoholes*: 3-penten-2-ol, 3-metil-2-buten-1-ol, (*Z*)-hidrato de sabineno y (*E*)-verbenol.
- *Aldehído*: (*E*)-2-butenal.
- *Cetonas*: 3-heptanona y pinocarvona.
- *Ésteres*: 2-Metilbutirato de metilo y acetato de timilo.

La valoración cuantitativa de todos los constituyentes se realiza considerando el porcentaje de área asignado a cada pico cromatográfico.

II. 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para comprobar si la producción de biomasa, el rendimiento en aceite esencial y las cantidades relativas de los componentes identificados en dicho aceite para las tres especies consideradas se ven afectados por los distintos tratamientos hídricos, se emplea un test de Análisis de la Varianza (ANOVA), con un nivel de confianza del 95%, tras verificar la homocedasticidad de las varianzas atendiendo al estadístico de Levene con el paquete estadístico SPSS.

Si tras realizar la prueba ANOVA se concluye que existen diferencias significativas entre los tratamientos de riego aplicados, o dicho de otro modo, que los distintos aportes hídricos no tienen el mismo efecto sobre la característica en estudio, el paso siguiente es conocer cuál o cuáles de esos tratamientos tiene un efecto significativamente diferente respecto a los demás, y para ello se usan los Test de Rango Múltiple, pruebas que comparan las medias obtenidas para los distintos parámetros en función del riego, considerándolas dos a dos.

Estos test se eligen estimando los objetivos propuestos por el investigador. En nuestro caso, el procedimiento empleado ha sido la

Menor Diferencia Significativa de Fisher (Fisher's LSD), ya que si bien esta prueba puede cometer errores de Tipo I (rechazar la hipótesis nula cuando es cierta), este riesgo se minimiza al aplicar este test únicamente después de haber rechazado la hipótesis nula usando el ANOVA.

Los resultados de esta prueba se expresan en las correspondientes tablas mediante letras minúsculas que aparecen en forma de superíndice junto a cada valor, indicando la misma letra la pertenencia a grupos homogéneos, en tanto que letras distintas señalan la presencia de diferencias significativas.