

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**  
**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA**

**Master Universitario Oficial de**  
**Agroecología, Desarrollo Rural y Agroturismo**



**PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS Y**  
**ANTIOXIDANTES DEL ACEITE ESENCIAL DE**  
***OREGANUM COMPACTUM* DE CULTIVO**  
**ECOLÓGICO: REVISIÓN**

**TRABAJO FIN DE MASTER**

**Convocatoria – Año: Semptiembre-2016**

**AUTOR: Blanca M<sup>a</sup> Marín Soler**

**DIRECTOR/ES: Esther Sendra Nadal**



## MASTER UNIVERSITARIO OFICIAL DE AGROECOLOGÍA, DESARROLLOR RURAL Y AGROTURISMO

### VISTO BUENO DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

CURSO 2015/2016

Director/es del trabajo
Esther Sendra Nadal

Dan su visto bueno al Trabajo Fin de Máster

Título del Trabajo
Propiedades antimicrobianas y antioxidantes del aceite esencial de <i>Oreganum Compactum</i> de cultivo ecológico. Revisión.
Alumno
Blanca M <sup>a</sup> Marín Soler

Orihuela, a 1 de septiembre 2016.



Firma/s director/es trabajo



**Máster Oficial en Agroecología, Desarrollo Rural y Agroturismo**

Se autoriza a la alumna **D<sup>a</sup>. Blanca M<sup>a</sup> Marín Soler** a realizar el Trabajo Fin de Máster titulado: “Propiedades antimicrobianas y antioxidantes del aceite esencial de *Oreganum Compactum* de cultivo ecológico. Revisión”, realizado bajo la dirección de D<sup>a</sup>. Esther Sendra Nadal, debiendo cumplir las directrices para la redacción del mismo que están a su disposición en la asignatura.

Orihuela, 1 de septiembre de 2016



Fdo.: Esther Sendra Nadal

Directora del Master Universitario en Agroecología, Desarrollo Rural y Agroturismo



**INDICE:** **nº de página**

---

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

<b>Introducción</b>	<b>7</b>
Generalidades de los aceites esenciales	8
Aceites esenciales en el ámbito alimentario	8-10
Actividades que se le atribuyen a los aceites esenciales	11-15
El aceite esencial del <i>Oreganum compactum</i>	16-19
<b>Objetivos</b>	<b>21</b>
<u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	
<b>Materiales y métodos</b>	<b>22</b>
Revisión bibliográfica	22
Ensayo experimental	22
Método de análisis del aceite	23
<b>Resultados y discusión</b>	<b>24</b>
Composición del AE de <i>O. compactum</i>	24-26
Capacidad antioxidante del AE de <i>O. compactum</i> en la literatura científica:	
Revisión de métodos utilizados y resultados.	27
Revisión de métodos para analizar su capacidad antioxidante	27
Métodos basados en la captación de radicales libres por transferencia de electrones	28-30
Métodos basados en la captación de radicales libres por transferencia de átomos de hidrógeno	30-31
Aplicación de métodos basados en la peroxidación lipídica.	31-32
Discusión de métodos	32-33
Capacidad antimicrobiana de AE de OC en la literatura científica: revisión de métodos in vitro, microorganismos estudiados y recopilación de resultado bibliográficos.	34-36
Prueba de inhibición en disco	36
Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC), por el método de dilución en caldo	37-38
Recopilación bibliográfica de los microorganismos que han sido estudiados con O.C como inhibidor o genotóxico.	39-44

## CONCLUSIONES

<b>Conclusiones</b>	<b>45</b>
<b>Propuesta de estudio de capacidad antioxidante de aceite ecológico de alicante</b>	<b>47</b>

## INDICE IMÁGENES Y TABLAS

- **Imagen 1.** Estructuras químicas procedentes de aceites esenciales que presentan capacidad antioxidante.
- **Imagen 2.** *Oreganum Compactum*.
- **Imagen 3.** *Oréganum elongatum*.
- **Imagen 4.** *Oreganum Grossi*.
- **Imagen 5.** Esquema del proceso de hidrodestilación.
- **Imagen 6.** Mecanismo de captación de radicales libres del carvacrol.
- **Imagen 7.** Mecanismo antibacteriano de timol y carvacrol desintegramos la membrana externa, la liberación de componentes citoplasmáticos y, en consecuencia cambio de la permeabilidad pasiva de la célula
- **Imagen 8.** Aplicación del AE, imagen de ensayo de laboratorio.
- **Imagen 7.** Siembra de levaduras, imagen de laboratorio.
- **Imagen 8.** .Esquema del efecto del AE en la célula bacteriana.
- **Imagen 9.** Placas de Petri con diferentes medios de cultivo (leche entera, leche descremada y pda) y el disco estéril con AEs.
- **Imagen 10.** Aplicación del AE y del sustrato usado como medio.
- **Imagen 11.** Siembra de levaduras.
- **Imagen 12.** Microplacas recién sembradas con las levaduras en cada uno de los medios de cultivo.
- **Tabla 1.** Principales constituyentes del aceite esencial de orégano y su correspondiente área en porcentajes totales por cromatografía e índice de Kovats. KI, W significa que las identificaciones se basan en el índice de Kovats y Lit la comparación con la biblioteca.
- **Tabla 2.** Principales constituyentes del AEs del OC según el método de extracción, geografía, estado vegetativo y parte de la planta por diferentes autores.
- **Tabla 3.** Actividad antioxidante del OC (+++ muy oxidante, ++ medianamente oxidante, + escasa capacidad oxidante, - no oxidante).
- **Tabla 4.** Poder de reducción del OC y del ácido ascórbico medido por absorbancia a 700nm.
- **Tabla 5.** Recopilación de datos bibliográficos del efecto inhibitorio y el MIC del OC.

## **RESUMEN**

Debido a la insistencia de los consumidores de alimentos de incorporar alternativas naturales que garanticen una seguridad y calidad alimentaria se están llevando a cabo múltiples estudios que utilizan compuestos naturales de hierbas y especias como alternativa a los aditivos sintéticos asociados con problemas de toxicidad o problemas que derivan en la salud del consumidor. . Los aceites esenciales de origen ecológico y larga tradición de consumo pueden incorporarse en la elaboración de alimentos ecológicos. La presente revisión se centra en el aceite esencial del *Oreganum compactum* de origen ecológico: propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Para poder explicar el porqué de sus actividades antimicrobianas y antioxidantes se estudia primeramente su composición, encontrando como compuestos activos principales más carvacrol y timol, los cuales son además responsables de su olor característico.

El trabajo presenta la composición de aceite esencial de *Oreganum compactum* de cultivo ecológico, procedente de la provincia de Alicante, una revisión bibliográfica de los métodos para determinar la capacidad antimicrobiana y antioxidantes, la revisión de estudios sobre la capacidad antioxidante y antimicrobiana de este aceite encontrados en la bibliografía y finalmente una propuesta de trabajo para la determinación de la capacidad antioxidante del aceite esencial de *Oreganum compactum*.

## PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS Y ANTIOXIDANTES DEL ACEITE ESENCIAL DE *OREGANUM COMPACTUM* DE CULTIVO ECOLÓGICO: REVISIÓN

### JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS:

#### 1. INTRODUCCIÓN

##### 1.1 Generalidades de los aceites esenciales:

Los **aceites esenciales (AEs)** son mezclas de compuestos de bajo peso molecular, extraídos de diversas plantas aromáticas (Raut y Karuppayil, 2014), que generalmente se cultivan en países tropicales y subtropicales, son producidos por más de 17.000 especies de plantas aromáticas comúnmente perteneciente a las familias angiospermas, *Lamiaceae*, *Rutaceae*, *Myrtaceae*, *Zingiberaceae* y *Asteraceae*, y se pueden obtener de varias partes de la planta aromática, incluidas las hojas, flores, frutos, semillas, brotes, rizomas, raíces y cortezas. (Hamdy y col, 2012). Las plantas aromáticas, que contienen AEs, se han utilizado desde la antigüedad para diversos fines incluyendo tratamientos médicos, **conservantes**, saborizantes de alimentos, etc...Hoy en día, aproximadamente 3000 son los aceites esenciales conocidos y de ellos unos 300 están disponibles comercialmente (Hamdy y col, 2012).

Los AEs se sintetizan y se almacenan en estructuras complejas como tricomas glandulares, cavidades y conductos de secreción de resina. Los AEs son el complejo de la mezcla de varios componentes químicos bioactivos como terpenos, terpenoides, fenilpropanos y compuestos fenólicos que muestran naturaleza lipofílica. Se sintetizan en el citoplasma y los plástidos de las células vegetales a partir de ácido malónico, ácido mevalónico y vías de metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP). Los terpenos hidrocarburos son compuestos de varias unidades de isopreno (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>) mientras que los terpenoides son la modificación bioquímica de terpenos a través de enzimas que añaden moléculas de oxígeno y se mueven o eliminan grupos metilo. En general los terpenoides son más antimicrobianos que los terpenos (Bhanu Prakash y col 2014). Los principales componentes se caracterizan por poseer un gran aroma debido a sus productos químicos de bajo peso molecular (Bhanu Prakash y col, 2014). En general, los aceites esenciales se componen de dos o tres componentes principales que se encuentran en una mayor concentración (20-95%) y otros componentes presentes en niveles de traza. Generalmente, los componentes que se presentan en mayor concentración determinan sus propiedades biológicas.

Se pueden utilizar varias técnicas para extraer los aceites esenciales de las plantas aromáticas, aunque los más comunes son la **hidrodestilación**, extracción con disolvente, prensado en frío, y la extracción de fluido supercrítico. Entre estas técnicas, los aceites

esenciales se suelen obtener más comúnmente por el método de destilación a vapor o hidrodestilación ya que es sencillo, con buen resultado y no es necesario el uso de compuestos químicos. Este método fue desarrollado en la edad media y en el Oriente Medio (Hamdy y col, 2012). Este método se utiliza habitualmente para la extracción de aceites ecológicos.

En la era moderna, los aceites esenciales y algunos de sus componentes se utilizan en diversos productos tales como cosméticos, productos de limpieza del hogar, ambientadores, productos de higiene, agricultura, alimentación, así como en usos medicinales. También se utilizan aceites esenciales en la aromaterapia y otras prácticas derivadas medicinales. A mediados del siglo XX que se empezó a desarrollar la química orgánica, se empezó a indagar más en la síntesis de medicamentos. El uso de aceites esenciales para el tratamiento medicinal ha disminuido en comparación con su uso en cosméticos y alimentos. Sin embargo, la demanda de estos como alternativa natural y segura a la medicina ha aumentado como consecuencia de la preocupación de los consumidores acerca de la toxicidad de los productos químicos sintéticos. Diversas actividades que se le asignan dentro de lo que podríamos llamar “medicina natural”, incluyen ser antioxidantes, anati-inflamatorios, antimicrobianos, antiviral y anticancerígeno, entre otras propiedades (Hamdy y col, 2012).

### **1.2 Aceites esenciales en el ámbito alimentario.**

La industria alimentaria busca cómo eliminar o ralentizar el deterioro de los alimentos, para ello se necesita conocer las reacciones de degradación más comunes de los alimentos. Solo así se podrá determinar la posible utilización de los aceites esenciales como inhibidores microbianos y antioxidantes. Es necesario evaluar la efectividad de los AEs como antioxidantes y antimicrobianos in vitro, así como sus características de seguridad alimentaria (Kloucek, y col, 2014).

Mohos y micotoxinas son contaminantes habituales de una gran variedad de alimentos como son granos de cereales, nueces, frutas, verduras, especias, etc. Además de contaminaciones microbianas, los agro-productos también son objeto de deterioro oxidativo durante el procesamiento, el transporte y el almacenamiento. Además existe una correlación positiva entre el estrés oxidativo y la estimulación de la biosíntesis de aflatoxinas, que hace que la gravedad del problema del deterioro de los alimentos aún sea más grave (Prakas y col, 2014).

Aunque, los efectos tóxicos de **la contaminación microbiana y oxidativa** del deterioro de los productos agrícolas se conocen desde hace mucho tiempo, sólo en los últimos años se ha prestado una atención adecuada sobre todo a la oxidación (Prakas y col, 2014).

Los mohos, y las toxinas asociadas a los alimentos son generados durante el almacenamiento, el transporte y el procesamiento posterior a la cosecha, lo que hace que el alimento sufra significativas pérdidas en la calidad, cantidad y composición de nutrientes, y por lo tanto reduzca el valor en el mercado. De acuerdo con la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), alrededor de 1000 millones de toneladas de alimentos se echan a perder a nivel mundial cada año debido a las micotoxinas producidas por hongos, sobretodo en el almacenamiento. La situación es más crónica y crítica en zonas tropicales y subtropicales, debido a sus favorables condiciones ambientales para el crecimiento de moho y la producción de hongos y sus micotoxinas, las cuales pueden ser responsables del desarrollo de determinadas enfermedades en el organismo humano (Prakas y col, 2014).

El deterioro se produce por la formación de compuestos secundarios, algunos de ellos tóxicos, que afectan tanto a cualidades sensoriales, como nutricionales de los alimentos, este deterioro se puede observar por la formación de olores y sabores rancios de los productos, y con ello la consiguiente disminución de la calidad nutricional y la seguridad alimentaria. La presencia de microorganismos en el deterioro de alimentos puede acelerar la oxidación de los lípidos y otros procesos de oxidación, además de producir cambios en las propiedades organolépticas, y si hablamos de hongos pueden incluso dar un color característico a la comida debido a su crecimiento (Alves-Silva y col, 2012).

Dado por tanto, que la oxidación de lípidos y el crecimiento microbiano son indeseables, la industria de la alimentación utiliza aditivos para retardar o inhibir estos procesos. Los aditivos antioxidantes que se utilizan con mayor frecuencia son la hidroxianisol butilado (BHA) y el hidroxitolueno butilado (BHT), sin embargo se ha demostrado que estos aditivos pueden causar daño en el ADN y producir carcinogénesis (Alves-Silva y col, 2012). Debido a los indeseables efectos de los compuestos sintéticos ha habido un creciente interés en la investigación de productos naturales y ecológicos para descubrir compuestos activos con propiedades antimicrobianas y antioxidantes que no tengan ningún efecto negativo sobre la salud humana, que sean más deseables por los consumidores y que conlleven a un desarrollo sostenible que pueda aplicarse a la industria alimentaria.

Uno de los métodos más sostenibles y no perjudiciales para la conservación de alimentos son los métodos físicos, como pueden ser la baja temperatura, la refrigeración, la aireación, el

secado rápido, el envasado al vacío o el envasado en atmósfera modificada (MAP). Son bastantes fiables y de fácil aplicación a pequeña escala, pero el inconveniente que presenta este tipo de método de conservación está en que no se aplican de manera significativa a gran escala o para el almacenamiento a granel, por lo que aún presentan limitaciones (Alves-Silva y col, 2012). Por otra parte, otra propuesta para la protección de alimentos son los productos naturales, que presentan como ventaja el ser biodegradable y poder ser explotados dentro del concepto de sostenibilidad. Decir que la conciencia actual hacia la sostenibilidad del sistema agrícola y medio ambiente está en auge en estos momentos, por lo que se está estableciendo cada vez más el uso de productos respetuosos con el medio ambiente y el uso de plagas como pesticidas biológicos. Por lo tanto, muchos productos derivados de plantas pueden ser explotados para descubrir nuevos productos bioactivos que puedan tener uso en la industria alimentaria en el lugar de los que se usan frecuentemente, que son productos sintéticos. De esta manera se ganaría por diferentes vertientes, como son el del cuidado del medio ambiente, la disminución de enfermedades y la conservación de los alimentos (Prakash y col, 2014).

Uno de los aditivos naturales que más se están estudiando y utilizando hoy en día son los **AEs**, los cuales están adquiriendo importancia como posible **sustituto de los componentes sintéticos** usados hasta ahora para mejorar la vida útil del alimento, esta importancia viene dada gracias a sus propiedades como antibacterianos, anti fúngico, anti-inflamatorio, antioxidante, entre otras propiedades (Alves-Silva y col, 2012).

Los aceites esenciales, como productos naturales, están ganando interés como aditivos alimentarios y son ampliamente aceptados por los consumidores, debido tanto a su larga tradición como especias, condimentos e infusiones como gracias a su alta volatilidad y con ello su naturaleza biodegradable.

La atención de la comunidad científica hacia el desarrollo de los antimicrobianos botánicos ecológicos ha crecido bastante en los últimos años. Al ser de origen natural, se considera que los AEs y sus componentes pertenecen a lo que podríamos llamar útiles sostenibles, que además son fácil de usar y por lo general están exentos de ningún tipo de dato de toxicidad.

Los AES pueden liberarse fácilmente como un fumigante de origen botánico con la ayuda de la tecnología de encapsulación. El método es económicamente viable, rápido y eficaz y además deja residuos mínimos, por lo que es aplicable en alimentos (Prakash y col, 2014).

### 1.3 Actividades que se le atribuyen a los aceites esenciales:

Hemos comentado varias de las características que se le atribuyen a los AEs, por las cuales han sido y son tan ampliamente utilizados, pero vamos a desarrollar estas propiedades un poco más ampliamente, sobre todo las que son útiles para la industria de la alimentación.

#### 1.3.1 Actividad antioxidante:

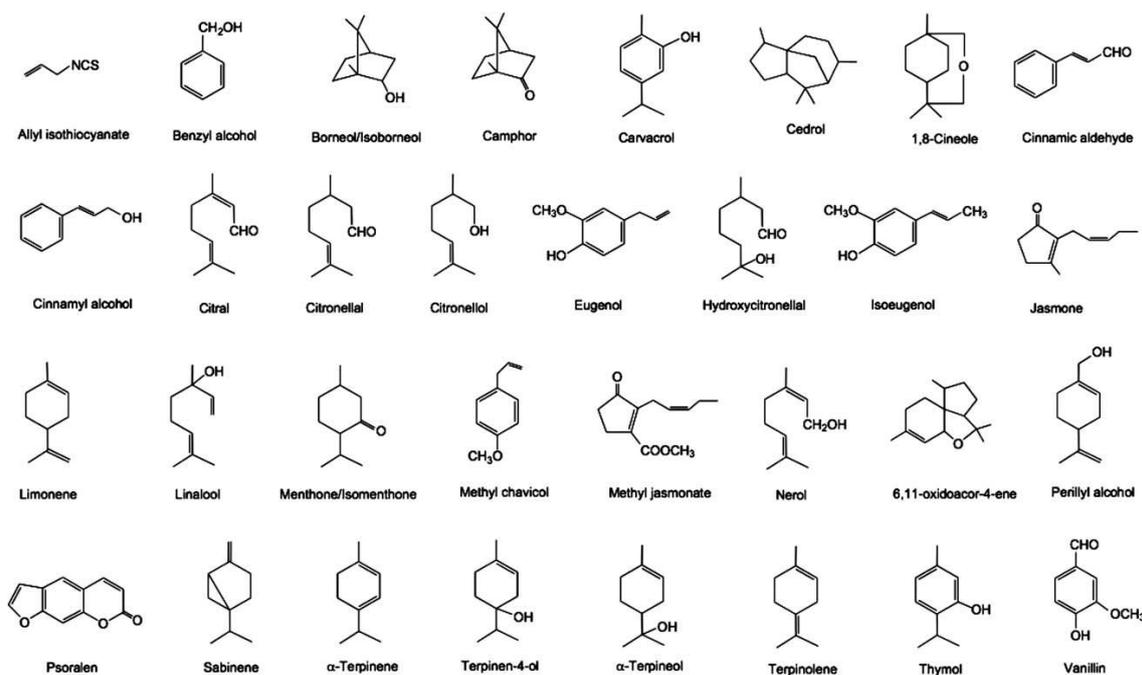
La actividad antioxidante es uno de los temas más intensivamente estudiados en las investigaciones de aceites esenciales, ya que los daños por la oxidación de diferentes sustancias biológicas provoca posteriormente muchas enfermedades, como pueden ser el cáncer, enfermedades hepáticas, el envejecimiento celular, la artritis, inflamaciones... Como resultado, muchas enfermedades han sido tratadas con antioxidantes para prevenir el daño oxidativo.

Recientemente, muchos investigadores han estado investigando la actividad antioxidante de diferentes aceites esenciales, con la finalidad de encontrar antioxidantes naturalmente seguros. Por consiguiente, diversos estudios han demostrado que los aceites esenciales son fuentes naturales ideales como antioxidantes. Como ejemplos podemos nombrar algunos, como son; el aceite esencial del tomillo, seguido del clavo, de la hoja de canela, albahaca, eucalipto, manzanilla, cilantro, eucalipto, enebro, comino, albahaca, canela, clavo, tomillo, seda del maíz egipcio, entre otros (Hamdy y col, 2012).

Existen informes sobre el poder antioxidante in vivo de los aceites esenciales, como ejemplo, está comprobado que la suplementación dietética de aceite de orégano para conejos retrasa la oxidación de lípidos. Cuando con el mismo aceite se alimentó a los pavos, la reducción de la oxidación de lípidos era comparable con la de  $\alpha$ -tocoferol de etilo (antioxidante sintético).

Existen informes que sugieren que los aceites esenciales son ricas fuentes de antioxidantes naturales y pueden ser usados para reemplazar los antioxidantes sintéticos para prevenir diversas enfermedades degenerativas.

En la **imagen 1** se muestran estructuras químicas procedentes de aceites esenciales que presentan capacidad antioxidante.



**Imagen 1.** Estructuras químicas procedentes de aceites esenciales que presentan capacidad antioxidante. (Hamdy y col, 2012). Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review.

### 1.3.2 Actividad antibacteriana:

Los productos químicos sintéticos han sido los utilizados comúnmente como conservantes antibacterianos en los alimentos para el control de la descomposición natural y para prevenir y controlar el crecimiento de microorganismos patógenos, pero actualmente la preocupación de los consumidores ha llegado a centrarse en la toxicidad de los productos los compuestos antibacterianos naturales que se encuentran en las plantas son los que tienen ahora la atención como aditivos alimentarios seguros. Se sabe que varias plantas naturales tienen actividad antibacteriana.

Las especias y las hierbas se han utilizado como conservantes para controlar los patógenos en los alimentos durante muchos años. Muchos estudios demuestran que los aceites esenciales presentan propiedades contra una amplia gama de cepas bacterianas, tales como *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus cereus*, y *Staphylococcus aureus*. Algunos aceites esenciales también demuestran actividad antibacteriana contra enteropatógenos como pueden ser la *Salmonella* spp. *E. coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, y *Clostridium perfringens* (Hamdy y col, 2012).

Mezclas de diferentes aceites esenciales como el orégano y el tomillo, el orégano y la mejorana y el tomillo y salvia exhiben fuertes efectos antibacterianos contra *B. cereus*,

*Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* O157: H7 y *L. monocytogenes*. El aceite esencial de orégano además es eficaz contra *P. aeruginosa* y *E. coli*. Existen también aceites con fuerte actividad inhibitoria frente a *Helicobacter pylori*, el cual se asocia con gastritis severa y una gran incidencia de úlceras pépticas.

La actividad de los AEs puede depender de diversos factores tales como el método de extracción, el crecimiento, la fase del cultivo, el medio de cultivo utilizado para el ensayo, el contenido de diversos componentes, incluyendo grasas, proteínas, agua, y agentes tenso activos, además del aroma de sus productos químicos. Se conoce que existe una relación entre el nivel de hidrofobicidad del aceite y su grado de actividad.

Entre las sustancias de los aceites esenciales se pueden dar varias reacciones entre ellas que modificarían sus propiedades, como puede ser la sinergia que se produce cuando el efecto combinado de las sustancias es mayor que la suma de los efectos individuales o el antagonismo que sucede cuando una combinación muestra una menor eficacia en comparación con las aplicaciones individuales. Los mecanismos de la actividad antibacteriana de los aceites no se conocen todavía por completo (Hamdy y col, 2012).

### 1.3.3 Actividad Antifúngica:

Algunos aceites esenciales han demostrado tener una amplia gama de efectos fungicidas naturales contra los patógenos de postcosecha. Las actividades antifúngicas de los aceites esenciales podrían ser aplicadas en fase de vapor para su uso en el almacenamiento de alimentos. Sin embargo, se requieren más estudios para su aplicación en fase vapor, ya que es posible que el deterioro de algunos componentes de los alimentos pueda seguir produciéndose. El carvacrol y timol se sabe que son eficaces contra los hongos transmitidos por los alimentos, incluyendo *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Como ejemplos podemos citar algunos como son el timol, el aldehído cinámico y Eugenol, que son aceites extraídos de la canela y del clavo que también presentan propiedades antifúngicas.

El crecimiento de *Aspergillus parasiticus* y la producción de aflatoxinas es inhibida por los aceites esenciales de *Timo vulgaris* y *Citrus aurantifolia*, mientras que *Mentha spicata* L., *Foeniculum molinero*, y *Artemisia dracunculus* inhiben el crecimiento de hongos solamente. Linalol, chavicol de metilo, y la vainillina extraídos de albahaca dulce y vainilla también muestran el mismo efecto inhibitorio sobre la producción de aflatoxinas.

Los aceites esenciales de Eugenia clorofila y tomillo tienen actividad contra mohos y levaduras. Oleorresinas extraídas de canela y aceites de clavo inhibe la producción de micotoxinas de especies de *Aspergillus* y *Penicillium*. Compuestos fenólicos menos volátiles, tales como isotiocianato de alilo y citral, procedentes de aceites de mostaza y hierba de limón,

son mucho más eficaces que las sustancias volátiles tales como hidrocarburos de terpeno (Hamdy y col, 2012).

#### 1.3.4 Actividad anti-mutagénica

Las mutaciones se pueden prevenir de varias maneras, como pueden ser la inhibición de la penetración de mutágenos en células, la adición de antioxidantes que inactiven los radicales libres producidos por los mutágenos, antioxidantes que activen enzimas celulares y mediante la activación de enzimas que actúen como dextosificantes mutagénicos con extractos de plantas. Los compuestos antimutagénicos son eficaces mediante la promoción de ADN libre de errores o mediante la inhibición de la reparación del ADN propenso a errores, sin embargo no ha habido ninguna investigación sobre el tipo de antimutagénico que implique la reparación del ADN por los terpenos y compuestos fenólicos de los AEs.

Los compuestos químicos extraídos de plantas aromáticas, tales como  $\alpha$ -terpineno,  $\alpha$ -terpineol, 1,8-cineol, d-limoneno, alcanfor, citronelal, citral y modulada hepática mono-oxigenasa presentan importante actividad antimutagénica.

Ha sido demostrado que el daño mitocondrial y la apoptosis / necrosis en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es reducido por aceites esenciales. Estudios recientes muestran que ciertos aceites esenciales actúan hacia paliar la mutación causada por las luces UV (Hamdy y col, 2012).

#### 1.3.5 Actividad anticancerígena:

Compuestos presentes en la dieta, como los monoterpenos, presentan actividad inhibitoria frente a carcinogénesis. Varios estudios experimentales y basados en la población indican que los isoprenoides en la dieta juegan un papel importante en la reducción de la incidencia de cáncer. Limoneno, un componente importante en muchos aceites esenciales de cítricos, presenta efectos quimio-preventivos y terapéuticos contra tumores mamarios en ratas y metástasis del aparato digestivo, lo cual, provoca cáncer. El aceite esencial del limón citrus, se conoce que apacigua la apoptosis a través de la activación de la interleucina  $1\beta$  (Hamdy y col, 2012).

#### 1.3.6 Actividad digestiva:

Muchas plantas aromáticas se han utilizado para pacientes con problemas digestivos y algunos estudios sugieren que los aceites esenciales y sus componentes presentan actividad digestiva. Por ejemplo, el aceite esencial de lavanda se conoce que afecta a la función gastrointestinal a través de la activación del nervio vago. La estimulación olfativa generada por

el olor del aceite de lavanda y su principal componente linalol activa nervios gástricos que mejoran la ingesta de alimentos, mientras que el aceite de pomelo y su principal componente, d-limoneno, muestran el efecto contrario (Hamdy y col, 2012).

#### 1.3.7 Actividad anti-inflamatoria:

La inflamación se asocia con ciertas enfermedades como son la hipertensión, el cáncer y los accidentes cerebrovasculares. El uso tradicional de aceites esenciales como anti-inflamatorios sugiere que poseen una potente actividad antiinflamatoria. Aloe vera es una de las plantas más conocidas por su actividad anti-inflamatoria. EL aceite esencial de aloe vera producido por prensado en frío es un aceite pálido y translúcido y se utiliza también como un aceite portador en aromaterapia.

La mejora la cicatrización de una herida mediante el uso de aloe vera era observada en las ratas diabéticas y en varios casos de isquemia dérmica. A pesar de que hay muchos informes sobre las actividades anti-inflamatorias de aloe vera, los estudios sobre la actividad de su aceite esencial son más limitados. Otros extractos de aceites que también han demostrado actividad anti-inflamatoria serían el aceite de tomillo, aceite de bergamota, aceite esencial de la raíz de regaliz, entre otros (Hamdy y col, 2012).

#### 1.3.8 Fototoxicidad

Se sabe que algunos aceites esenciales contienen compuestos fotoactivos. Los psoralenos, presente en el aceite esencial de *citrus bergamia*, forman mono y bi-aductos bajo luz UV, lo que produce mutagenicidad y la citotoxicidad.

Se ha observado que *Fusanus spicatus*, aceite esencial de la madera, no es fototóxico pero si altamente citotóxico, lo que sugiere que la citotoxicidad es más bien antagonista a la fototoxicidad. En el caso de la fototoxicidad, los AES penetran en las células sin dañar las membranas. La citotoxicidad o fototoxicidad dependen del tipo de producto químico presente en el aceite esencial, el cual, puede producir diferentes tipos de radicales con o sin exposición a la luz (Hamdy y col, 2012).

#### 1.3.9 Otras actividades

Además de las actividades nombradas existen muchas otras en las que se está estudiando, sobre todo a nivel medicinal y como perseverante en industrias alimentarias.

#### 1.4 El aceite esencial del *Oreganum compactum*:

El presente trabajo se centra en el AEs procedente del *Oreganum compactum* (OC). (Imagen 2)



**Imagen 2.** *Oreganum Compactum*. Manuel des bonnes pratiques de collecte de l'origan« *Origanum compactum*. Elalaoui Ali y Col, 2014.

El orégano es una importante planta herbácea, perenne, matosa, de múltiples usos que pertenece a la familia **Lamiaceae** y comprende **42 especies** y **18 híbridos** ampliamente distribuidos en Eurasia y África del Norte. Es originaria de las zonas montañosas de la región mediterránea de Europa y Asia. (Shayista Chisti y col, 2013). El nombre deriva del griego *oros* «montaña» y de *gamos* «resplandor, delicia», es decir «alegría de la montaña» porque en estado espontáneo colorea con sus flores las pendientes montañosas y los valles pedregosos y soleados.

El género *Oreganum* se ha dividido en 10 secciones según su procedencia: *Amaracus bentham*, *Anatolicon bentham*, *Brevifilamentum letswaart*, *Longitubus letswaart*, *Chilocalyx letswaart*, *Majorana bentham*, *Campanulaticalyx letswaart*, *Elongatispica letswaart*, *prolaticorolla letswaart* y *oreganum* (Shayista Chisti y col, 2013).

Las especies de esta planta han sido sometidas a la elaboración de perfiles botánicos como se dividen posteriormente: *O. vulgare*, *O. onites*, *O. syriacum*, *O. majorana*, *O. microphyllum*, *O. hypericifolium*, *O. dictamnus*, *O. dubium*, *O. sipyleum*, *O. compactum*, *O. floribundum*, *O. acutidens* (Shayista Chisti y col, 2013).

El orégano se ha utilizado durante miles de años como especia y en la etnomedicina. Tiene propiedades muy valiosas para la industria de los alimentos como las antifúngicas, antimicrobianas, insecticidas, antioxidantes, entre otras, aunque además se le atribuyen otras como antiespasmódico, antitumoral, actividades analgésicas, expectorante, antiparasitario, mejoras gastrointestinales, carminativo, diaforético, estimulante y tónico. Se ha sugerido que el carvacrol presente en el aceite esencial de orégano probablemente interfiera en la liberación y/o síntesis de mediadores de la inflamación, tales como los proteínoides, y por lo tanto puede favorecer el proceso de curación de las úlceras gástricas. Como un remedio popular, también se utiliza contra cólicos, tos, dolor de muelas y ciclos menstruales irregulares. El *Oreganum spp* es utilizado además como poderoso desinfectante y agente aromatizante en perfumes y en jabones (Shayista Chisti y col, 2013).

Como hierba culinaria, se usa para dar sabor a los alimentos y bebidas alcohólicas, el orégano tiene un potencial prometedor para la prevención y complicaciones de la diabetes en los tratamientos a largo plazo y tiene una eficacia anti inflamatoria mediante la inhibición de la lipoxigenasa. Los metabolitos secundarios de esta planta han sido bien estudiados en términos de compuestos polifenólicos y aceites esenciales. Por consiguiente, más de un centenar de compuestos no volátiles ya han sido identificados en esta planta, como son flavonoides, dépsidos y organoides (Shayista Chisti y col, 2013).

El OC es una especie endémica de Marruecos y el sur de España, crece en los bosques y pastizales rocosos de llanuras y partes bajas de las montañas. La floración se produce entre mayo y julio. El OC crece biogeográficamente en el Rif, el centroseptentrional del Tánger, parte occidental del norte de Marruecos, al oeste del sur de Marruecos, provincia de Al Haouz, el alto atlas y al sur de la Península Ibérica. El OC es una planta perenne, en general peluda, con tallos vellosos que miden aproximadamente entre 1-3mm. Las hojas del tallo son ovaladas, grandes y de hasta 35 mm, con peciolo de aproximadamente 2-8 mm. Las hojas también presentan vellosidades de entre 1-3mm.

Las inflorescencias son en espigas densas y muy cortas de color púrpura, y flores opuestas de gran tallo (5-12 mm) y sésiles. El cáliz es en general, sin pelo, de 3-4 mm de largo con 5 dientes triangulares (0,5- 1 mm), tienen cilios en forma de diente a los márgenes (cerdas regulares de 0,1 mm de largo). Los pelos finos se presentan en la cubierta de la corola (<0,1 mm). Las brácteas florales son ovales ovoides- lanceoladas, no membranosas, rígidas, correosas, sésiles y con la base de entre 6-8 mm de largo, además no presentan pelo en los lados, tienen pequeñas glándulas visibles y cilios (0,2-0,5 mm), además las brácteas florales se presentan superpuestas

entre sí desde la base hasta la parte superior de la oreja, donde se esconden cálices (Abdeljalil Belkamel y col, 2013)

El clima en el que crece el OC, viene dado evidentemente por su distribución geográfica, y como hemos dicho, su distribución se limita al sur de España y el norte de Marruecos, suele estar relacionada con los bosques y matorrales y crece en suelos drenados, por lo que su bioclima, es por tanto, semiáridos, sub-húmedo y caliente, son plantas de clima termo-mediterráneo y vegetación meso-mediterránea.

A la hora de reconocerla habría que tener en cuenta que fuera del periodo de floración, podría ser confundida con *Origanum Grosii* y *Origanum elongatum* (Elalaoui Ali y col, 2014). Como pequeños trucos para la hora de su recolecta, podríamos citar que *el Oregano elongatum* (**imagen 3**) tiene como hojas de orégano que parecen estar en mal estado, ya que se presentan dientes sin pelo, solo se ven espigas densas de aproximadamente 40 mm de largo y 3 mm de ancho (Elalaoui Ali y col, 2014).



**Imagen3.** *Orégano elongatum*. Manuel des bonnes pratiques de collecte de l'origan "*Origanum compactum*". (Elalaoui Ali y col, 2014).

Por otra parte el *Origanum grosii* (**imagen 4**) tiene hojas con pelos finos y de color verdoso, una sola panoja de pelitos sueltos, alcanza los 30 mm de largo y 5 mm de ancho; las brácteas igualan al cáliz o a veces se quedan más cortas, el cáliz suele tener 2,5 mm de ancho aproximadamente (Elalaoui Ali y col, 2014).



**Imagen 4.** *Oregano Grossi*. Manuael des bonnes practiques de collecte de l'origan "*Origanum compactum*". (Elalaoui Ali y col, 2014).

El OC para crecer de la mejor manera y dar todo su aroma, tiene que desarrollarse al sol, al calor y al aire. Si es cultivado en lugares sombreados y frescos, la calidad y la cantidad de aceites esenciales disminuye sensiblemente. Se ha visto que las plantas que crecen cerca de zonas marinas son las que tienen la mayor fragancia. A medida que la vegetación se seca es necesario retirarla. No es una planta particularmente grande por lo que es necesario hacerse un control de las malas hierbas. Tiene que hacerse bastante regularmente un binado de la tierra de modo que se retire la costra superficial que envuelve el terreno asfixiante sobre todo si el cultivo ocurre en tierras arcillosas.

Prefiere suelos secos, debe ser regado poco y a menudo teniendo cuidado con no empapar el terreno y no dejar encharcamientos ya que no los toleran de ningún modo porque causan la putrefacción de las raíces. La mayor demanda de agua se tiene cuando la planta todavía es joven y durante la floración (Elalaoui Ali y col, 2014). El OC es una planta que se adapta a bastantes tipos de terreno incluso pobre, aunque prefiere tierras calcáreas, permeables, secas y con una buena dosis de materia orgánica. Sobre todo no tolera los suelos húmedos en invierno si van asociados a temperaturas demasiado bajas.

Las plantas de OC son muy rústicas y no necesitan abonados extras. En la reanudación vegetativa se hace un abono completo con Nitrógeno, Fósforo y Potasio. Después de cada corte es bueno hacer un nuevo abonado azotado para estimular el crecimiento de la planta. La floración del orégano ocurre en verano y hasta el otoño (de julio a septiembre - octubre) y las semillas maduran del verano al otoño, agosto - septiembre - octubre. En la poda del OC no se

habla de poda completa sino sencillamente de la eliminación de las partes dañadas o estropeadas para evitar la manifestación de enfermedades.

La multiplicación se hace por semilla, por esqueje o por división de la planta. La multiplicación por semilla tiene consigo la desventaja de que, al intervenir la variabilidad genética, no se tiene la certeza de que se tendrán plantas iguales a las plantas madre, en caso de que se quiera conseguir una determinada planta o no se esté seguro de la calidad de la semilla que se está utilizando, es mejor hacer la multiplicación por esqueje o por división de la planta madre (Elalaoui Ali y col, 2014).



## 2. OBJETIVOS:

En el Departamento de Tecnología Agroalimentaria de la Escuela Politécnica Superior de Orihuela, de la Universidad Miguel Hernández se está realizando un estudio experimental sobre la composición y las propiedades antimicrobianas y antifúngicas del AE del OC de procedencia ecológica.

El objetivo del presente estudio es realizar una búsqueda en la literatura científica de estudios sobre la composición, propiedades antioxidantes y antimicrobianas del aceite esencial de *Oreganum compactum*, además de caracterizar una muestra de este aceite de procedencia ecológica de la provincia de Alicante.

En base a la literatura científica vamos a realizar una propuesta de investigación de las propiedades antioxidantes de este aceite y así completar la información sobre las propiedades conservantes de este aceite ecológico.



REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:

**3. MATERIALES Y MÉTODOS:**

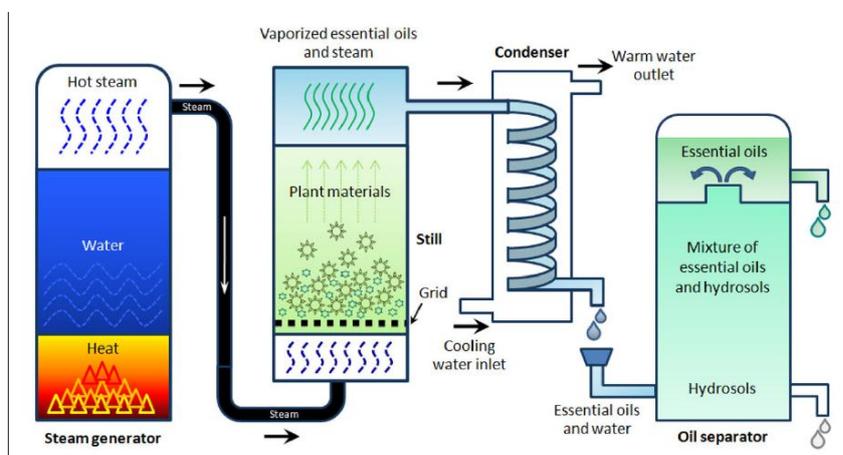
**3.1 Revisión bibliográfica**

Los principales materiales utilizados han sido los artículos científicos encontrados mediante una búsqueda en la literatura científica, utilizando de buscador el “ SCOPUS “ y escribiendo como criterio: **Or?ganum compactum**. La fecha de búsqueda se realizó el 26/02/2016.

Los resultados obtenidos con el criterio indicado arriba fueron 58 artículos, de los cuales se leyó el abstract y se realizó una selección de aquellos artículos relacionados con propiedades antimicrobianas, antioxidantes y generales, por lo que únicamente se seleccionaron 35 en los que se basa la mayor parte del presente trabajo. Con posterioridad se consultaron otros trabajos para complementar información y justificación de las observaciones.

**3.2 Ensayo experimental**

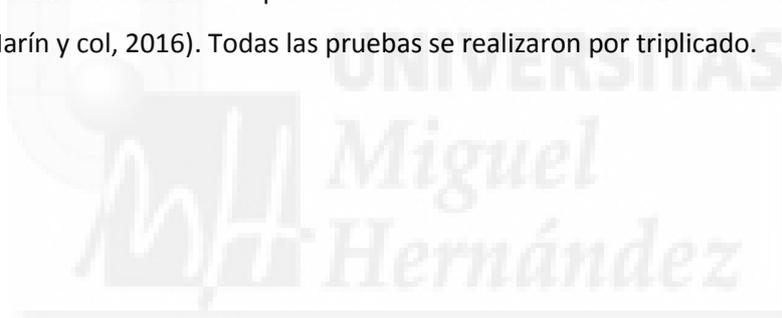
Además de los artículos científicos usados como material de información, también se ha realizado el estudio experimental de la composición del OC. Las propiedades antimicrobianas se han estudiado en la UMH lo que nos ha permitido incluir imágenes de los ensayos incluidos en este trabajo bibliográfico. El AE de OC utilizado en la UMH es de origen ecológico extraído por **hidrodestilación (imagen 5)**. Se extrajo por hidrodestilación a baja presión y se almacenó a 4°C antes de su uso. El aceite se obtuvo de la empresa Herbes del Molí (Benimarfull, Alicante, España). La plantación y compañía están certificados para la agricultura orgánica por CAECV (Comité de Agricultura Ecológica de la Comunidad Valenciana).



**Imagen 5.** Esquema del proceso de hidrodestilación. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and their uses for food preservation. (Tongnuanchan.P y Benjakul. S ,2014)

### 3.3 Método de análisis del aceite

Para el análisis de los componentes del AE de *O.compactum* se utilizó tanto un GC-MS, como un GC-FID. Un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-17A junto con un detector espectrómetro de masas Shimadzu, que se utilizó para la identificación de los picos. Los análisis se llevaron a cabo utilizando helio como gas portador. Las muestras diluidas de los extractos se inyectaron. Los espectros de masas se obtuvieron por ionización de electrones, utilizando una gama espectral de 45 a 450 m/z. La mayoría de los compuestos fueron identificados mediante el uso de forma simultánea de los dos métodos de análisis: KI, índice de Kováts hace referencia a los n-alcenos (C8-C32); y los espectros de masas (biblioteca de los espectros de sustancias químicas). La semicuantificación de compuestos se realizó en un Shimadzu GC 2100 equipado con un detector FID. Con ellos se aislaron los compuestos volátiles, se identificaron y cuantificaron electrónicamente a partir de los datos del área FID sin utilizar factores de corrección (Marín y col, 2016). Todas las pruebas se realizaron por triplicado.



#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

##### 4.1 Composición del AE de *O.compactum*

En la **tabla 1** se presenta el resultado del análisis de la composición del aceite esencial de *O. compactum* de origen ecológico de Alicante.

**Tabla 1.** Principales constituyentes del aceite esencial de orégano y su correspondiente área en porcentajes totales por cromatografía e índice de kovats. KI, W significa que las identificaciones se basan en el índice de Kovats y Lit la comparación con la biblioteca Wiley.

Componentes	Id. <sup>1</sup>	Kováts Indexes		<i>Orégano compactum</i>
		KI	Lit. <sup>2</sup>	% area
$\alpha$ - Felandreno	KI, W	933	933	0.51
$\alpha$ -pineno	KI, W	943	941	0.69
Canfeno	KI, W	951	953	0.09
3-octanone	KI, W	988	982	0.1
Mirceno	KI, W	992	984	1.63
$\alpha$ - phellandrene	KI, W	1016	1009	0.23
$\alpha$ -terpineno	KI, W	1026	1026	2.1
<b>p-cimeno</b>	KI, W	1034	1032	<b>9.69</b>
Limoneno	KI, W	1038	1036	0.33
Sabineno	KI, W	1041	1034	0.2
1,8-cineol	KI, W	1044	1039	0.08
Trans $\beta$ -ocimeno	KI,W	1048	1047	0.07
<b><math>\gamma</math>-terpineno</b>	KI, W	1067	1066	<b>16.31</b>
terpinoleno	KI, W	1096	1094	0.13
p-cimeno	KI, W	1101	1099	0.11
$\alpha$ -terpinoleno	KI, W	1105	1102	1.34
3,5-heptadien-2-ona	KI, W	1125	1119	0.05
Cis-carvyl de etilo	KI, W	1149	1146	0.04
Terpinen-4-ol	KI, W	1195	1198	0.39
Thimyl metil eterl	KI, W	1247	1244	0.09
<b>Timol</b>	KI, W	1298	1307	<b>16.76</b>
<b>Carvacrol</b>	KI, W	1311	1318	<b>46.78</b>
Trans cariofileno	KI, W	1439	1425	1.93
$\alpha$ -humuleno	KI, W	1475	1460	0.09
$\beta$ -bisaboleno	KI, W	1519	1515	0.05
$\delta$ -cadineno	KI, W	1533	1531	0.06
Óxido de cariofileno	KI, W	1606	1589	0.08

Como puede observarse en la tabla 1, los componentes principales del aceite fueron por orden descendente **carvacrol, timol,  $\gamma$ -terpineno y p-cimeno**, cuya suma suponen el 89,54% del total. En la **tabla 2** se realiza una revisión de los componentes mayoritarios del aceite esencial del *O.compatum* encontrados en la revisión de la literatura científica.

**Tabla 2.** Principales constituyentes del AE del OC según el método de extracción, geografía, estado vegetativo y parte de la planta por diferentes autores.

Mét. De extrc.	Geografía	Estado vegetal	Parte de la planta	$\rho$ -cime no	$\gamma$ -terpeno	Timo l	Carv acrol	Referenc
Hidrod estilación	Marruecos (Rif, Tenger, centenario septentrional, norte, oeste meridional)	Floración	Hojas y flores	13,00	18,60	22,67	31,22	Abdeljalil Belkamel y col, 2103
Hidrod estilación	Norte de Marruecos	de Floración	Flores	16,26	22,90	19,36	22,00	Mezzoug y colaboradores, 2006
Disolución en etanol	Comercial de Bélgica	de -----	Flores	13,10	11,61	15,26	46,88	Maryam Azizkhani y col, 2013
-----	Marruecos	-----	flores	7,89	2,59	27,5	30,53	F.Bakkali y col, 2004.
Hidrod estilación	USA	-----	-----	17,9	-----	20,2	24,8	Pavel Kloucek y col, 2001.
-----	-----	-----	-----	11,4	16,6	16,2	41,8	Sfeir y col, 2013.
Hidrod estilación	Bélgica	-----	-----	7,89	18,20	27,50	30,53	Bouhdid, S y col, 2008.
-----	Marruecos	-----	Parte área	-----	22,9	19,3	22,0	Mounia Oussalah y col, 2005
Destilación	Marruecos	-----	-----	11,4	7,1	9,0	58,1	Chebli Bouchra y col, 2003
-----	Francia	-----	-----	16,6	11,4	16,2	41,8	Julien Sfeir y col, 2013

Como se puede observar en las **tablas 1 y 2**, tanto del estudio en la UMH, como en la recopilación bibliográfica los componentes principales que se repiten y coinciden en todos los casos son  $\rho$ -cimeno,  $\gamma$ -terpeno, timol y carvacrol. Las concentraciones de los cuatro sí que varían de un estudio a otro, esto puede ser debido a diferentes factores, como son el estado vegetativo de la planta antes de la recolecta, la zona geográfica donde se recolectó la planta, ya que influye en el tipo de **cultivo** y el **clima**, y por último el **quimiotipo** de la planta, ya que según los diferentes quimiotipos, las concentraciones de sus componentes principales pueden variar.

A raíz de estos componentes mayoritarios se puede esperar las características que muestra el aceite del *O. compactum*, como antioxidante y antimicrobiano.

#### **4.2 Capacidad antioxidante del AE de *O. compactum* en la literatura científica: revisión de métodos utilizados y resultados.**

En la industria alimentaria, un antioxidante se define como una sustancia que en pequeñas cantidades sea capaz de prevenir o retrasar, de manera significativa, la **oxidación** de materiales fácilmente oxidables, tales como las grasas, proteínas, el ADN, entre otros (Graca. M, 2010). Un antioxidante puede actuar a través de varios mecanismos, de tal manera que pueden inhibir una enzima específica, reaccionar con agentes oxidantes antes que estos causen daño a la molécula, secuestrar metales, o incluso poseer sistemas de reparación (Graca. M, 2010).

En alimentación, se trabaja más comúnmente relacionando la capacidad antioxidante con el poder reductor, de hecho, la propiedad de un compuesto de poseer carácter reductor indica que es donante de electrones, y que puede reducir, por tanto, los compuestos intermedios oxidados de los procesos de peroxidación de lípidos y convertirlas en productos más estables, poniendo con ello fin a las famosas cadenas de oxidación, que tanto preocupan en el sector de los alimentos (Graca. M, 2010).

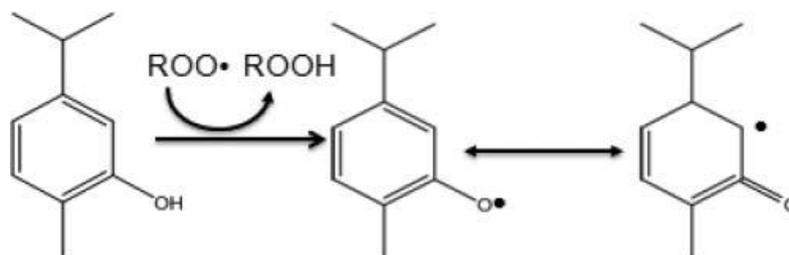
En la teoría, el potencial de reducción determina la facilidad que tiene un cierto compuesto para reducir químicamente a otro. Un sistema con un estándar de reducción negativo ( $-E^\circ$ ) debe reducir (donar electrones) a un sistema con un potencial menos negativo que él, cero o positivo ( $E^\circ$ ). Como ejemplo:



Dado que el potencial de reducción del ascorbato es más negativo que el del tocoferol, el ascorbato reduce al tocoferol cediéndole electrones y oxidándose él a la misma vez (Graca. M, 2010)

El efecto antioxidante del AE del *O.compactum* se atribuye a sus componentes mayoritarios, p-cimeno,  $\gamma$ - terpeno, timol y carvacrol, los cuales tienen como resultado varios posibles mecanismos, como son: la eliminación de radicales libres, la actividad quelante de metales o su capacidad de unión al oxígeno. (Rodríguez-García. I y col, 2015). Carvacrol y timol pueden donar átomos de hidrógeno de los radicales libres y convertirlos a productos estables libres de radicales libres (**Imagen 6**). Los mejores antioxidantes donadores de hidrógenos son los monohidroxi o polihidroxi compuestos fenólicos con diversas sustituciones de anillos aromáticos, cuyo potencial de reducción es menor que el de un radical libre, y por tanto puede

donar hidrógenos para el radical, a menos que la reacción sea cinéticamente desfavorable (Rodríguez-García et al., 2015).



**Imagen 6.** Mecanismo de captación de radicales libres del carvacrol. Oregano Essential Oil as an antimicrobial and Antioxidant additive in food products. (Rodríguez-García et al., 2016)

#### 4.2.1 Revisión de métodos para analizar su capacidad antioxidante:

La actividad antioxidante puede ser detectada de varias formas, como midiendo el sustrato, el consumo del elemento oxidante, los productos intermedios o los productos finales. En las matrices alimentarias varias mediciones pueden ser llevadas a cabo, como son: la medición del índice de peróxidos, valor del ácido tiobarbitúrico, valor de yodo, contenido en ácidos grasos libres, contenido de polímeros, formación de dienos conjugados por absorción a 232 y 268nm, color, composición de ácidos grasos, relación de ácidos grasos saturados (Graca M, 2010).

Los ensayos de antioxidantes en los alimentos y sistemas biológicos pueden ser divididos en dos grupos: Los que evalúan la **peroxidación lipídica** y los que miden la capacidad de **captación de radicales libres**. Por otra parte, para medir la captación de radicales libres, los métodos son agrupados en dos grupos, de acuerdo con las reacciones químicas involucradas: métodos basados en la reacción de transferencia de átomos de hidrógenos, los cuales se producen en un medio de pH dependiente y métodos basados en la reacción de transferencia de electrones individuales, los cuales se producen en un medio independiente del pH.

Los métodos cuya reacción es la transferencia de un átomo de hidrógeno, el antioxidante es capaz de eliminar los radicales libres por la donación de hidrógeno:



Estas reacciones son dependientes del pH y la presencia de agentes reductores (es decir, de iones metal) en tales métodos no se recomienda ya que puede originar una reactividad aparentemente alta.

Por otra parte en los métodos cuya reacción es la capacidad antioxidante para transferir un electrón a cualquier compuesto, incluido metales, la transferencia está basada en la

desprotonación y potencial de ionización del grupo funcional reactivo, por lo tanto este método no depende del pH (Graca. M, 2010).

#### 4.2.1.1 Métodos basados en la captación de radicales libres por **transferencia de electrones**.

Este principio incluye un oxidante (sustrato) que atrae un electrón del antioxidante, causando cambios de color en el sustrato. El grado de cambio de color es proporcional a las concentraciones de antioxidantes. El punto final de la reacción se alcanza cuando el cambio de color se detiene. El cambio de la pendiente de la curva de absorbancia refleja la concentración de la actividad antioxidante. Este grupo de métodos incluye:

4.2.1.1.1: Ensayo de fenoles totales con reactivo **Folin-Ciocalteu**: Consiste en la cuantificación de contenido de fenoles totales, es decir, el número de grupos fenólicos u otros grupos oxidables presentes en la muestra. La reacción de transferencia de electrones se produce entre los antioxidantes y molibdeno, que se reduce en el complejo, dando lugar a especies azules que se pueden medir espectrofotométricamente. Esta reacción sólo se produce en un ambiente alcalino, por lo que la adición de carbonato de sodio es muy importante (Graca. M, 2010).

4.2.1.1.2: Capacidad antioxidante equivalente Trolox (**TEAC**): Este método se basa en el cambio de azul a verde del radical ABTS catiónico. La cantidad de decoloración, expresada como porcentaje de inhibición de  $ABTS^+$ , se determina como una función de la concentración y el tiempo, en la que se usa Trolox como patrón de referencia. La concentración de antioxidantes dando el mismo porcentaje de variación de absorbancia de  $ABTS^+$  como de Trolox 1nM se considera como TEAC (Graca. M, 2010).

4.2.1.1.3: Reducción del ión férrico de la potencia antioxidante (**FRAP**): En este método una sal férrica, Fe (III) (TPTZ)  $2Cl_3$  (TPTZ=2,4,6-tripiridil-striazina), se utiliza como agente oxidante. El método consiste en la utilización del poder reductor de los aceites para reducir una solución de ferrocianuro de potasio, lo cual conduce a un aumento de la absorbancia. (Alvés –Silva y col, 2012). El ensayo TEAC y FRAP son bastante similares, se diferencian únicamente en el pH de ensayo, TEAC se produce a pH neutro, mientras FRAP necesita un ambiente ácido. Una unidad FRAP es definida como la reducción de 1M de Fe (III) a Fe (II) (Graca. M, 2010).

4.2.1.1.4: Ensayo de potencial antioxidante total: utiliza un complejo de Cu (II) como oxidante: Se basa en la reducción de Cu (II) a Cu (I) por el antioxidante presente en la muestra. El Cu (I)

forma con bathocuproin (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina); 1M de  $\alpha$ -tocoferos es capaz de reducir 2M de Cu (II) a Cu (I) (Graca. M, 2010).

4.2.1.1.5: 2,2,-difenil-1-picrilhidrazil (**DPPH**): El DPPH es un radical libre estable que se utiliza generalmente para determinar la capacidad de los compuestos para barrer radicales libres. El método se basa en la reducción de una solución metanólica de DPPH en presencia de hidrógeno para la donación de moléculas. La reducción de la solución de DPPH es supervisada por la medición de la absorción a 517 nm (pasa de púrpura a amarillo). Se mide la absorbancia de los cambios por la disminución altamente significativa del DPPH y la concentración de radicales debido a la captación de actividad de cada concentración de aceite. La actividad antioxidante se mide a diferentes concentraciones (0.15-20 mg / ml) de muestras de EOS y se trabaja en términos de hidrógeno (donación del hidrógeno) o capacidad radical de barrido, utilizando el radical estable DPPH. Los resultados se expresan en porcentaje de inhibición como la media de tres repeticiones (Bouhdid. y col, 2008 y Alves-Silva y col, 2012).

Existen también ensayos basados igualmente en la transferencia de electrones que miden los compuestos oxidantes de la muestra a través de un barrido de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno, estos oxidantes interactúan y dañan las principales macromoléculas, ya sea en sistemas biológicos o en alimentos. Oxidantes tales como: Aniones de superóxido, radicales peróxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete, peroxinitrito, óxido nítrico, entre otros (Graca. M, 2010).

4.2.1.2. Métodos basados en la captación de radicales libres por **transferencia de átomos de hidrógeno**:

El método basado en la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) y el método (TRAP) que atrapa radicales totales (TRAP) son ejemplos de métodos de transferencia de hidrógeno. En ambos casos hay: (a) un radical generador de carga, 2,2 azobis (2-amidinopropano) por lo general (AAPH), para dar un flujo constante de radicales peróxido en el aire de la solución, (b) un sustrato para supervisar el progreso de la reacción (UV o fluorescencia), (c) el antioxidante que competirá con el sustrato para adquirir los radicales libres e inhibir o retrasar la oxidación.

4.2.1.2.1. **ORAC**: absorción de radicales de oxígeno. En este método una proteína fluorescente (R-ficoeritina), fluoresceína o dichlorofluoresceína se utilizan como sustratos y el progreso de la reacción es seguido por fluorescencia. Los radicales peróxido reaccionarán con un sustrato fluorescente para formar un compuesto no fluorescente. El ensayo ORAC monitorea la reacción

durante un periodo mayor a 30min y la actividad antioxidante se determina bajo las áreas integradas en las curvas de la caída de la fluorescencia (Graca. M, 2010).

4.2.1.2.2. **TRAP:** atrapa radicales libres. En el método TRAP, los sustratos incluyen R- ficoeritrina o 2,2 ' azinobis (ácido 3 - etilbenzotiazolina - 6 - sulfónico) (ABTS), y por lo tanto la oxidación del sustrato es seguido por fluorescencia o espectrofotometría, respectivamente (Graca. M, 2010).

#### 4.2.1.3 Aplicación de métodos basados en la **peroxidación lipídica.**

La oxidación lipídica es la más común en alimentos, esta es una reacción compleja que puede ser generada a través de tres vías diferentes:

1. no enzimática, de reacción en cadena mediada por radicales libres.
2. no enzimática, foto -oxidación no radical.
3. reacción enzimática.

La forma de medición que aplican los métodos se mide de distintas maneras: por agotamiento de oxígeno, por pérdida de sustrato, por formación de productos de oxidación primarios y por la formación de productos de oxidación secundarios.

El método de **agotamiento de oxígeno** se basa en que la oxidación de grasas y aceites va acompañada de una absorción de oxígeno de la atmósfera y un aumento de la masa de la muestra. En general, los métodos de aumento de peso basados en el incremento de este por absorción de oxígeno son muy poco precisos (Graca. M, 2010).

En el método de **pérdida de sustrato**, la detección de la estabilidad oxidativa por la pérdida de sustrato incluye métodos que determinan los ácidos grasos insaturados no oxidados residuales después de su extracción y derivatización por GC. La mayoría de estos sustratos tienen una estructura con propiedades de fluorescencia en el espectro UV-Vis. Como ejemplo de este tipo de métodos podemos citar:

4.2.1.3.1 Método de **blanqueo del β-caroteno:** El ensayo del ácido β-caroteno-linoleico, se basa en el blanqueo de una emulsión del β-caroteno, o en la pérdida de su color amarillo debido a su reacción con los radicales formados por la oxidación de los ácidos linoleico. BHT se utiliza como control positivo y la actividad antioxidante se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación: (Bouhdid. y col, 2008).

$$\text{La inhibición (\%)} = \left[ \frac{\text{AA (120)} - \text{AC (120)}}{\text{AC (0)} - \text{AC (120)}} \right] \times 100$$

AA (120): la absorbancia con el antioxidante en t = 120 min

CA (120): la absorbancia del control en t = 120 min

AC (0): la absorbancia del control en t = 0 min.

4.2.1.3.2 Disminución de la fluorescencia de ácido cis-parinárico: el ácido cis-parinárico es un ácido graso poliinsaturado con cuatro dobles enlaces conjugados, que son los responsables de alta fluorescencia y de su alta sensibilidad al ataque de radicales libre. La oxidación de este ácido conjugado es responsable de su pérdida irreversible de fluorescencia, midiéndose esta por absorbancia (Graca. M, 2010).

4.2.1.3.3 Disminución de la fluorescencia de **BODIPY**: bodipy es un fluoróforo muy útil por sus propiedades ópticas, y normalmente se asocia con biomoléculas mediante enlaces polares a través de grupos funcionales amina o ácido carboxílico. Esta molécula presenta un resto fenilo combinado con un dieno conjugado, que muestra una brillante fluorescencia roja. La oxidación conduce a una extinción gradual de la fluorescencia (Graca. M, 2010).

En los métodos basados en la oxidación de **productos primarios**: los hidroperóxidos son considerados productos primarios formados por la oxidación de lípidos. Se han desarrollado varias técnicas con el fin de evaluar su formación, las cuales se adaptan bien tanto en alimentos como en muestras biológicas in vitro. Ejemplo de estos métodos son:

4.2.1.3.4 Medición yodométrica de hidroperóxidos: Los hidroperóxidos o peróxidos reaccionan con el ión yoduro para generar yodo, esto se valora con una solución patrón de tiosulfato sódico en presencia de una solución de almidón. El valor de peróxidos puede determinarse colorimétricamente, basándonos en la oxidación de ferroso a ión férrico (Graca. M, 2010).

4.2.1.3.5 Medición por ultravioleta de dienos conjugados: la abstracción de hidrógeno de un grupo CH<sub>2</sub> en un lípido poliinsaturado es generalmente estabilizado por un reordenamiento molecular para formar un dieno conjugado o trieno. El método de absorción por UV mide los hidroperóxidos y los dienos y trienos conjugados, que absorben en el rango 232 a 278nm (Graca. M, 2010).

Los métodos basados en la formación de **productos de oxidación secundaria** supervisan la formación de estos y principalmente están basados en métodos espectrofotométricos y cromatográficos. Podemos citar:

4.2.1.3.6. Test del ácido tiobarbitúrico: Se basa en determinar el ácido tiobarbitúrico, la cual es una sustancia reactiva (TBARS), formada como producto secundario de la peroxidación lipídica. Se mide el porcentaje de inhibición de la peroxidación de lípidos a diferentes concentraciones

en muestras de AEs. Los resultados se expresan en% de inhibición como la media de tres replicas (Alves-Silva y col, 2012).

4.2.1.3.7. Medición de aldehído mediante el ensayo de anisidina: este método se basa en la reacción del grupo carbinilo del aldehído (especialmente 2-alquenes) con el grupo amina de la  $\rho$ - anisidina, que origina la formación de una base de Schiff que absorbe a 350nm. El colorímetro da la respuesta por  $\rho$ - anisidina, la cual varía según el grado de insaturación del aldehído, es decir, la respuesta es más intensa con aldehídos di- insaturado que con aldehídos mono-insaturados, considerando idénticas a las concentraciones (Graca. M, 2010).

4.2.1.3.8. Medición cromatográfica de compuestos volátiles: La descomposición de los productos primarios de la oxidación lipídica produce epóxidos, cetonas, hidrocarburos y saturación e insaturación de aldehídos. Algunos de estos compuestos son volátiles y se considera que son los principales contribuyentes del flavor de los alimentos asociado al enranciamiento. Los componentes volátiles se miden generalmente por GC o GC acoplados a espectrometría de masas (Graca. M, 2010).

4.2.1.3.9. Medición de ácido fórmico: El método **RANCIMAT** es una prueba automatizada que mide la conductividad de compuestos de bajo peso molecular, como es el ácido fórmico producido durante la oxidación de lípidos a temperaturas de 100°C o superiores. Este método permite evaluar la eficacia de un antioxidante para evitar la oxidación de una grasa en condiciones de temperatura elevada e inyección de aire. Existen fórmulas matemáticas que correlacionan los tiempos de inducción de la oxidación con la mayor o menor capacidad antioxidante de una sustancia (Graca. M, 2010).

#### 4.2.2 Discusión de los métodos.

En la **tabla 3** se muestra el nivel de capacidad antioxidante que demuestra el AE del OC según el método DPPH, basado en la captación de radicales libres por transferencia de electrones, y el método  $\beta$ -caroteno, basado en la pérdida de sustrato.

**Tabla 3.** Actividad antioxidante del OC (+++ muy oxidante, ++ medianamente oxidante, + escasa capacidad oxidante, - no oxidante). Bouhdid y col, 2008)

Método	Resultado	Referencia
DPPH	++	Bouhdid y col, 2008
$\beta$ -caroteno	++	Bouhdid y col, 2008

Según la literatura científica el orégano posee una buena capacidad de eliminar radicales libres y evitar que los lípidos se oxiden, lo cual, puede atribuirse al alto contenido de los compuestos fenólicos en este aceite (Bouhdid y col, 2008). De hecho, diversos estudios ponen de manifiesto la correlación entre el contenido fenólico y la capacidad antioxidante de extractos de plantas. El **timol y carvacrol**, los principales componentes de este aceite, son dos fenoles conocidos como moléculas antioxidantes. Esta actividad se debe a la presencia de grupos hidroxilo en su estructura química. Posibles sinergias entre los diversos componentes del aceite debe también tenerse en cuenta, aunque por ahora nos centramos en que su actividad antioxidante se centra en su contenido de compuestos fenólicos. (Bouhdid y col, 2008).

El poder reductor del aceite esencial de O. C aumenta con el aumento de concentración de aceite, pero por otra parte, si se compara su poder antioxidante con el del ácido ascórbico se observa que es significativamente más bajo, como se observa en la **tabla 4**, en la cual se compara una reducción de una solución de ferricianuro de potasio que conduce a la aumento de la absorbancia a 700 nm (Bouhdid y col, 2008).

**Tabla 4.** Poder de reducción de una solución de ferricianuro por el OC el ácido ascórbico medido por absorbancia a 700nm.

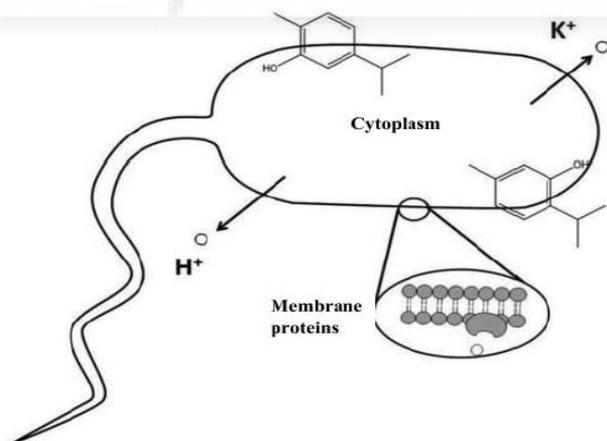
Muestra	Concentración (mg/L)	Absorbancia (700nm)
Orégano compactum	0	0.046 ± 0.002
	100	0.105 ± 0.012
	250	0.182 ± 0.008
	500	0.271 ± 0.001
	1000	0.484 ± 0.021
Ácido ascórbico	10	0.166 ± 0.010
	50	0.714 ± 0.020
	100	1.277 ± 0.049

Como contraste de dos métodos comúnmente utilizados para este tipo de ensayos, como son los ensayos del DPPH y del ácido  $\beta$ -caroteno-linoleico decir que el ensayo de DPPH permite la prueba tanto de sustancias lipofílicas como de sustancias hidrófilas mientras que la prueba de blanqueo  $\beta$ -caroteno es dependiente de la polaridad del sustrato.

### 4.3 Capacidad antimicrobiana de AE de OC en la literatura científica: revisión de métodos in vitro, microorganismos estudiados y recopilación de resultado bibliográficos.

Al igual que en el apartado anterior se ha realizado una revisión de los métodos de determinación de la capacidad antimicrobiana más utilizados para evaluar aceites esenciales. Los principales componentes del AE del *O.compactum* actúan acumulándose en la membrana de la célula, uniéndose al protón de hidrógeno e induciendo la modificación de la conformación de la membrana celular produciendo como resultado la muerte celular. (Rodríguez-García. I y col, 2015).

El carvacrol y timol causan alteraciones en la morfología de las hifas de los hongos y agregados, reduce diámetros y lisa la pared celular, además de producir cambios biológicos. En las bacterias, la **membrana celular** es el objetivo más importante de los AEs, ya que interfieren con los fosfolípidos formadores de las bicapas de la membrana (Rodríguez-García. I y col, 2015). Timol y carvacrol son capaces de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram - negativas (**imagen 7**), liberando el componente lipopolisacárido y aumentando así la permeabilidad de la membrana citoplasmática y en consecuencia cambiando la permeabilidad pasiva de la célula. p-cimeno es un compuesto hidrófobo que provoca mayor hinchazón de la membrana citoplasmática en comparación con el carvacrol (Rodríguez-García. I y col, 2015).

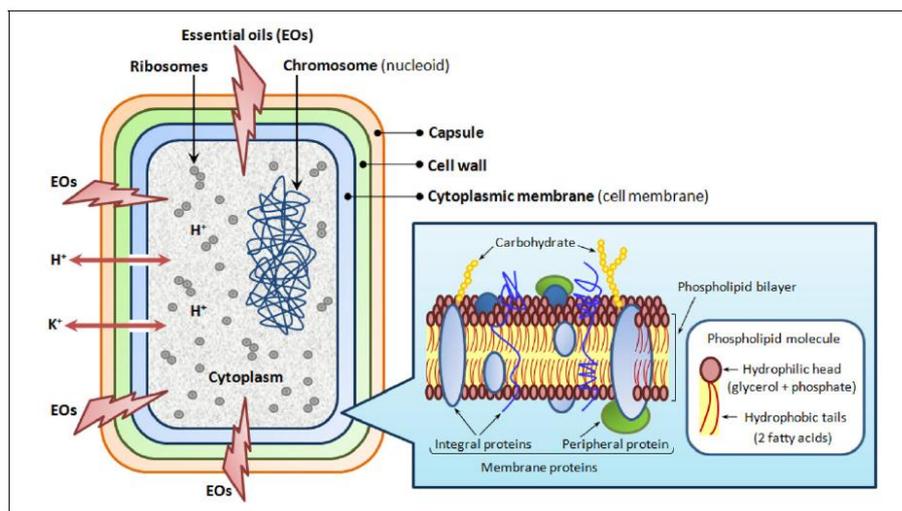


**Imagen 7.** Mecanismo antibacteriano de timol y carvacrol desintegrando la membrana externa, la liberación de componentes citoplasmáticos y, en consecuencia cambio de la permeabilidad pasiva de la célula. *Oregano essential oil as an antimicrobial and antioxidant additive in food products.* Rodríguez-García. I y col (2015).

La sinergia de **varios AEs**, como pueden ser el carvacrol y el cimeno provocan una mayor desestabilización de la membrana y una disminución en el potencial de los componentes individuales de la membrana. El carvacrol se puede acumular en la membrana de la célula y gracias a su capacidad de unión al hidrógeno y su capacidad de protonarse puede inducir a la modificación conformacional de la membrana, dando como resultado la muerte celular. (Rodríguez-García. I y col ,2015).

Es importante señalar que tanto la parte hidrófila como la hidrófoba de los compuestos fenólicos contribuyen a la actividad antimicrobiana. La parte hidrófila interactúa con la parte polar de la membrana, mientras la parte hidrofobia entierra partes apolares de la membrana bacteriana. (Rodríguez-García. I y col ,2015).

Se debe tener en cuenta con qué tipo de bacteria va a interactuar el AE. Carvacrol desintegra la membrana externa de las bacterias **Gram-negativas**, lo que genera la liberación de lipopolisacáridos y aumenta la permeabilidad de la membrana citoplasmática para ATP. Para las bacterias **Gram-positivas**, interactúa con la membrana de la bacteria y altera la permeabilidad para cationes como  $H^+$  y  $K^+$ . En general se observa mayor actividad antimicrobiana en bacterias **Gram-positivas** que en bacterias Gram-negativas, ya que la mayor cantidad de compuestos lipofílicos en las membranas de las Gram-positivas facilita la penetración de los AEs. Por otro lado, la resistencia de las bacterias Gram-negativas a los aceites esenciales se asocia con el papel protector de las proteínas intrínsecas de la membrana o lipopolisacáridos de la pared celular, que limitan la velocidad de difusión de compuestos hidrófobos a través de la capa de lipopolisacáridos. (Rodríguez-García. I y col ,2015). Finalmente ya sea una célula Gram-positiva o Gram-negativa lo que conduce a la muerte celular es la disipación del gradiente iónico, que es el que deriva al deterioro de los procesos esenciales de la célula, como se muestra en la **imagen 8**.

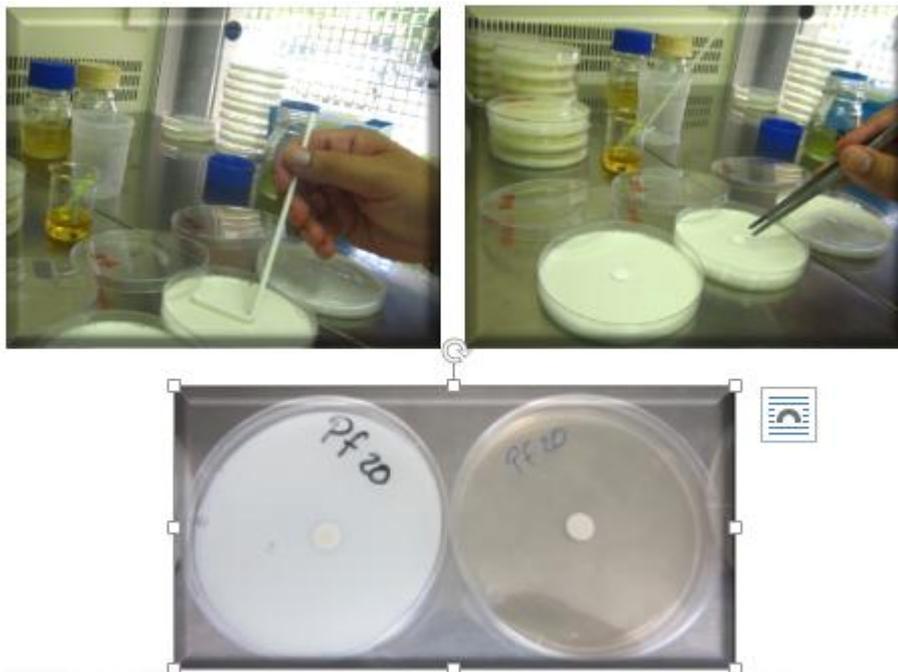


**Imagen 8.** Esquema del efecto del AE en la célula bacteriana. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and their uses for food preservation. Phakawat Tongnuanchan and Soottawat Benjakul, 2014

#### 4.3.1 Prueba de inhibición en disco: (Realizado por Cesar Parra, 2014)

Parra (2014) evaluó mediante el método descrito por Buer et al., (método de Kirby-Bauer) la actividad inhibitoria de levaduras del OC mediante la prueba de inhibición en disco. Este método mide la efectividad del aceite en fase gaseosa, **sin contactar** directamente con el alimento ni microorganismo. Se basa en la difusión del aceite a partir de un disco impregnado o pozo donde se deposita el aceite. Este es un medio estandarizado que se puede realizar utilizando placas Petri con diferentes medios de cultivo sólido en función del microorganismo. Se agrega suspensión de 0,1mL de  $10^6$ ucf/ml del microorganismo a estudiar y se siembra en superficie. Se depositan discos estériles de 9mm de diámetro, uno sobre cada placa, en donde se adicionan cantidades del aceite esencial a ensayar (**imagen 9**). Posteriormente las placas se incuban a las condiciones óptimas de crecimiento de cada microorganismo. Finalmente se realizan mediciones en mm de los diámetros de los halos que se formaron a causa de la inhibición: bactericida donde no hay signos de crecimiento y bacteriostático donde el crecimiento es escaso.

**Imagen 9.** Placas de petri con diferentes medios de cultivo ( leche entera, leche descremada y pda) y el disco esteril con el AEs (Ensayo UMH, 2014).



4.3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC), por el método de dilución en caldo:

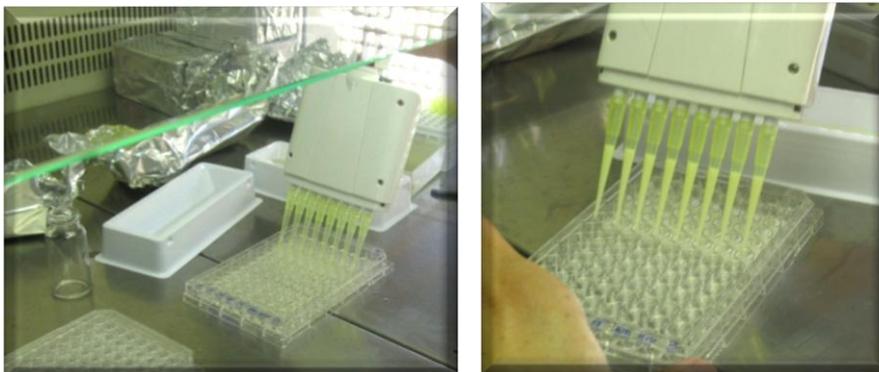
La MIC es definida como la concentración más baja de una sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de ser incubado por 24 horas. Este método mide la efectividad del aceite en **contacto directo** con el microorganismo.

En la técnica de dilución, son utilizados tubos o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal (**imagen 10**). El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pozos de las microplacas, como se ve en la **imagen 10 y 11**, y la MIC es determinada después de la incubación. Los métodos de microdilución en caldo son una técnica útil para determinar MIC en un gran número de muestras. Las placas de microdilución tras la incubación deben sellarse con adhesivo para evitar la evaporación del medio de cultivo cuando se incuben (**imagen 12**). Tras la incubación se observa la turbidez o se procede a la adición del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT). Las células vivas y metabólicamente activas son capaces de reducir el MTT, de color amarillo en solución a formazán, compuesto insoluble que precipita en forma de cristales violeta, evidenciando de esta forma actividad metabólica.

Se pueden realizar ensayos en diferentes medios de cultivo para evaluar el comportamiento de los microorganismos frente al AEs de OC. Dos medio de cultivo son

Mueller-Hinton (MH, medio comercial) y también sistemas modelo como leche desnatada (0,3% grasa) y leche entera (3,6% grasa), incubadas en las condiciones óptimas de cada microorganismo.

**Imagen 10.** Aplicación del AE y del sustrato usado como medio (Ensayo UMH, 2014)



**Imagen 11.** Siembra d levaduras (Ensayo UMH, 2014).



**Imagen 12.** Microplacas recién sembradas con las levaduras en cada uno de los medios de cultivo (Ensayo UMH, 2014).

- a. Microplaca con medio de cultivo leche Entera (3,6% de grasa),
- b. b Microplaca con medio de cultivo leche desnatada (0,3% de grasa),
- c. c Microplaca con medio de cultivo caldo Mueller-Hinton.



#### 4.3.3. Recopilación bibliográfica de los microorganismos que han sido estudiados con O.C como inhibidor o genotóxico.

En la **tabla 5** encontramos una recopilación de los resultados de la bibliografía consultada.

**Tabla 5.** Recopilación de datos bibliográficos del efecto inhibitorio y el MIC del OC.

<u>Microorganismo</u>	<u>Componentes principales del aceite y adiciones</u>	<u>Medio de cultivo para CI e MIC.</u>	<u>Capacidad inhibitoria</u>	<u>MIC (vol/vol) (vol/peso) (µL/ml) (µL/mg)</u>	<u>Referencia</u>
<i>Staphylococcus aureus</i> ( gram +)MBLA	Carvacrol, y-terpeno, thymol y ρ- cymeno.	-Caldo LB -Agar Muller-Hinton	[50µL] :27mm	0,0078	Bouhdid. y col, 2008
<i>Staphylococcus aureus</i> ( gram +)CECT976	Carvacrol, y-terpeno, thymol y ρ- cymeno.	-Caldo LB -Agar Muller-Hinton	[50µL] :12mm	0,0312	Bouhdid. y col, 2008
<i>Staphylococcus aureus</i> ( gram +)CECT794	Carvacrol, y-terpeno, thymol y ρ- cymeno.	-Caldo LB -Agar Muller-Hinton	[50µL] :10mm	0,0312	Bouhdid. y col, 2008
<i>bacillus subtilis</i> ( gram +) DCM6633	Carvacrol, y-terpeno, thymol y ρ- cymeno.	-Caldo LB -Agar Muller-Hinton	[50µL] :25mm	0,0312	Bouhdid. y col, 2008
<i>Enterococcus faecium</i> (gram +)CECT410	Carvacrol, y-terpeno, thymol y ρ- cymeno..	-Caldo LB -Agar Muller-Hinton	[50µL] :22mm	0,0312	Bouhdid. y col, 2008
<i>Escherichia coli K12</i> (gram -) MBLA	Carvacrol, y-terpeno, thymol y ρ- cymeno.	-Caldo LB -Agar Muller-Hinton	[50µL] :20mm	0,0625	Bouhdid. y col, 2008
<i>Eschecrichia coli serovar 0157:H7</i> (Gram -) CECT4030	Carvacrol, y-terpeno, thymol y ρ- cymeno.	-Caldo LB -Agar Muller-Hinton	[50µL] :20mm	0,1250	Bouhdid. y col, 2008
<i>Proteus mirabilis</i> (Gram -)IH	Carvacrol, y-terpeno, thymol y ρ- cymeno.	-Caldo LB -Agar Muller-Hinton	[50µL] :32mm	0,0625	Bouhdid. y col, 2008

Propiedades antimicrobianas y antioxidantes del aceite esencial de *Oreganum Compactum* de cultivo ecológico. Revisión.

<u>Microorganismo</u>	<u>Componentes principales del aceite y adiciones</u>	<u>Medio de cultivo para CI e MIC.</u>	<u>Capacidad inhibitoria</u>	<u>MIC (vol/vol) (vol/peso) (μL/ml) (μL/mg)</u>	<u>Referencia</u>
<i>Listeria innocua</i> (Gram +) CECT4030	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno..	-Caldo LB -Agar Muller-Hinton	[50μL] :32mm	0,0312	Bouhdid. y col, 2008
<i>Listeria monocytogenes serovar 4b</i> (Gram +)CECT4032	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno..	-Caldo LB -Agar Muller-Hinton	[50μL] :15,5mm	0,0625	Bouhdid. y col, 2008
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ( Gram - )CECT378	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno..	-Caldo LB -Agar Muller-Hinton	[50μL] :5mm	0,2500	Bouhdid. y col, 2008
<i>Pseudomonas aureoginosa</i> (Gram - )IH	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	-Caldo LB -Agar Muller-Hinton	[50μL] :0mm	>1	Bouhdid. y col, 2008
<i>Pseudomonas aureoginosa</i> (Gram - )CECT 110T	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	-Caldo LB -Agar Muller-Hinton	[50μL] :2mm	>1	Bouhdid. y col, 2008
<i>Pseudomonas aureoginosa</i> (Gram - )CECT 118	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	-Caldo LB -Agar Muller-Hinton	[50μL] :1 mm	>1	Bouhdid. y col, 2008
<i>Pseudomonas putida</i> (Gram -)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	BD Brain Heart infusión (BHI) Agar	-	0,05	Mounia Oussalah y col, 2005.
<i>Botrytis cinerea</i> (Hongo)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	Potato Dextrose Agar (PDA)	Inhibitorio a 100ppm	0,05	Chebli Bouchra y col, 2003.
<i>Escherichia coli O157:H7</i> (gram -)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	Ensalada preparada	-	0,05	Maryam Azizkhani y col, 2013.
<i>Feline calcivirus</i> (virus)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	Ensalada preparada	-	0,05	Maryam Azizkhani y col, 2013.
<i>E.coli</i> (gram -)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	Mueller Hinton	2μL: 15,33mm	0,015	Fadila Moussaoui y Tajelmolk Alaoui, 2015.

Propiedades antimicrobianas y antioxidantes del aceite esencial de *Oreganum Compactum* de cultivo ecológico. Revisión.

<u>Microorganismo</u>	<u>Componentes principales del aceite y adiciones</u>	<u>Medio de cultivo para CI e MIC.</u>	<u>Capacidad inhibitoria</u>	<u>MIC (vol/vol) (vol/peso) (µL/ml) (µL/mg)</u>	<u>Referencia</u>
<i>E.coli</i> (ATCC 25921) (gram -)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	Mueller Hinton	2µL: 13,00mm	0,013	Fadila Moussaoui y Tajelmolk Alaoui, 2015.
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (gram -)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	Mueller Hinton	2µL: 25,66mm	0,026	Fadila Moussaoui y Tajelmolk Alaoui, 2015.
<i>Enterobacter aerogenes</i> (Gram -)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	Mueller Hinton	2µL: 28,00mm	0,028	Fadila Moussaoui y Tajelmolk Alaoui, 2015.
<i>S. aureus</i> (gram +)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	Mueller Hinton	2µL: 18,33mm	0,018	Fadila Moussaoui y Tajelmolk Alaoui, 2015.
<i>Proteus mirabilis</i> (gram -)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	Mueller Hinton	2µL: -	-	Fadila Moussaoui y Tajelmolk Alaoui, 2015.
<i>P. putida</i> (gram-)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	Mueller Hinton	2µL: -	-	Fadila Moussaoui y Tajelmolk Alaoui, 2015.
<i>P. aeruginosa</i> (gram -)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	Mueller Hinton	2µL: -	-	Fadila Moussaoui y Tajelmolk Alaoui, 2015.
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853) (gram -)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	Mueller Hinton	2µL: -	-	Fadila Moussaoui y Tajelmolk Alaoui, 2015.
<i>S.enteritidis</i> ( gram -)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	Mueller Hinton	2µL: 14,00mm	0,014	Fadila Moussaoui y Tajelmolk Alaoui, 2015.
<i>Alternaria alternata</i> ( hongo)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	Mueller-Hinton	-	0,031	Pavel Kloucek y col, 2010.
<i>Aspergillus niger</i> (hongo)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	Mueller-Hinton	-	0,125	Pavel Kloucek y col, 2010.

Propiedades antimicrobianas y antioxidantes del aceite esencial de *Oreganum Compactum* de cultivo ecológico. Revisión.

<u>Microorganismo</u>	<u>Componentes principales del aceite y adiciones</u>	<u>Medio de cultivo para CI e MIC.</u>	<u>Capacidad inhibitoria</u>	<u>MIC (vol/vol) (vol/peso) (μL/ml) (μL/mg)</u>	<u>Referencia</u>
<i>Penicillium digitatum</i> (moho)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	Mueller-Hinton	-	0,125	Pavel Kloucek y col, 2010.
<i>Staphylococcus aureus</i> (gram +)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	Mueller-Hinton	-	0,125	Pavel Kloucek y col, 2010.
<i>Salmonella enteritidis</i> (gram -)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	Mueller-Hinton	-	-	Pavel Kloucek y col, 2010.
<i>P. aeruginosa</i> (gram -)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	Mueller-Hinton	-	-	Pavel Kloucek y col, 2010.
<i>E.coli O157:H7</i> (gram -)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	BHI	-	0.025	Mounia Oussalah y col, 2005.
<i>Salmonella typhimurium</i> (gram -)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	BHI	-	0.05	Mounia Oussalah y col, 2005.
<i>S. aureus</i> (gram +)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	BHI	-	0.013	Mounia Oussalah y col, 2005.
<i>L. monocytigenes</i> (gram +)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno.	BHI	-	0.1	Mounia Oussalah y col, 2005.
<i>Streptococcus pyogenes</i> (gram +)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno+ DMSO	-Agar de sangre -BH	6 μL: 38mm	0.075	Julien Sfeir y col, 2013.
<i>Candida albicans</i> ( gram +)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno + ramnolípidos	TSA	-	0,0156	Ester Haba y col, 2014.
<i>S. aureus</i> ( gram+)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno + ramnolípidos	TSA	-	0,125	Ester Haba y col, 2014.

Propiedades antimicrobianas y antioxidantes del aceite esencial de *Oreganum Compactum* de cultivo ecológico. Revisión.

<u>Microorganismo</u>	<u>Componentes principales del aceite y adiciones</u>	<u>Medio de cultivo para CI e MIC.</u>	<u>Capacidad inhibitoria</u>	<u>MIC (vol/vol) (vol/peso) (µL/ml) (µL/mg)</u>	<u>Referencia</u>
<i>E.coli O157:H7</i> (gram -)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno + nisina	TSB	-	0,006 (llega a su MIC en menor tiempo que solo)	Ben Hammou y col, 2011.
<u>Microorganismo</u>	<u>Componentes principales del aceite y tratamiento</u>	<u>Medio de cultivo</u>		<u>Acción antimicrobiana con el transcurso del tiempo:</u>	<u>Referencia</u>
<i>Listeria monocytogenes</i> (gram +)	Carvacrol, y-terpeno, thymol y p- cymeno( libre y encapsulados)+irradiación $\gamma$ + nisina.	jamón		Tras 7 días de tratamiento: O.C libre a 0,025 µl/ml. (sin y con irradiación $\gamma$ ): 0,005-0,000 O.C encapsulado a 0,025 µl/ml. (sin y con irradiación $\gamma$ ): 0.020-0,0117 O.C a 0,025 µl/ml. + Nisina Libre(sin y con irradiación $\gamma$ ): 0,018- 0,003 O.C a 0,025 µl/ml. + Nisina encapsulado(sin y con irradiación $\gamma$ ):0,038- 0,026	Tanzina Huq y col, 2014.

Decir que se debe tener en cuenta a la hora de valorar la capacidad antimicrobiana de un AE diferentes factores, como son: la concentración del AE utilizado, la solubilidad de este en la membrana de la célula, el pH del medio, el tiempo de reacción, el oxígeno presente en el medio, la temperatura, el número de células y el tamaño del inóculo con el que se trabaja, la dispersión y emulsión del AE, los componentes del alimento o el medio de cultivo en el que se está realizando el estudio, la cantidad de NaCl presente en el medio, ya que este puede actuar como agonista o antagonista con el aceite, presencia de cationes como  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ , ya que pueden interrumpir la actividad antimicrobiana del aceite, por la formación de quelatos con otros iones y el componente del AE, lo que dificulta su entrada a través de las membranas celulares de la bacteria.

Con los datos recopilados en la **tabla 5**, aunque la mayoría de estudios se hayan realizado en medios de cultivo de crecimiento idóneo para cada microorganismo a estudiar, a excepción de *E.coli O157:H7* y *Feline calicivirus* en ensalada preparada y *Listeria monocytogenes* en jamón, podemos sacar en claro varias características antimicrobianas de los AEs: es efectivo tanto en bacterias como en mohos, hongos y virus, diferenciando que en bacterias es más efectivo en Gram-positivas que en Gram-negativas, se observa también que a mayor concentración mayor capacidad inhibitoria y que se pueden añadir a alimentos, teniendo efectividad igualmente. Añadir que se pueden combinar con otros elementos, tanto químicos como físicos con los que interactúen de manera agonista para mejorar su efectividad.

Podemos citar varios ejemplos respecto a las conclusiones de la tabla: Si nos fijamos en *Listeria* (Gram+) vemos que su halo de inhibición abarca, según serotipos, de entre 15-32mm a una concentración de 50µL, mientras que a la misma concentración diferentes serotipos de *Pseudomonas* (Gram -) presentan un halo de entre 1-5mm, siendo por otra parte la MIC incluso mayor a 1 µL/ml en *Pseudomonas* (Gram -) y 0,03 µL/ml en *Listeria* (Gram +). Demostrando su mayor inhibición en bacterias Gram+ que en Gram-.

Como efecto de agonismo podemos comparar como el mismo serotipo de *E.Coli* presenta su MIC en 0,006 µL/ml cuando se añade nisina y en 0,025 µL/ml si solo está presente en el medio el AE.

Comentar que al comparar el mismo microorganismo, *E.Coli O157:H7*, estudiado en un medio de cultivo presenta una MIC menor que al estudiarlo en un alimento completo como puede ser ensalada lista para el consumo.

## CONCLUSIONES:

### 5. CONCLUSIONES:

Realmente podemos encontrar gran número de estudios relacionados con el uso de nuestro aceite y planta, lo cual resulta bastante coherente sobre todo por dos motivos esenciales, primero por la gran tradición que presenta el uso de esta planta para múltiples funciones, incluida el uso en la alimentación como especia, y segundo por el aumento de la preocupación de la población tanto en su salud y con ello la disminución de productos de origen sintético, como por el medio ambiente. Decir como nota de interés que existen muchos más estudios de la especie *Oreganum vulgare* que de *Oreganum compactum*.

Como podemos observar en las tablas de su **composición**, ya sea de revisiones bibliográficas o del estudio realizado en la UMH, los componentes mayoritarios del AE de OC coinciden en todos los casos, siendo estos carvacrol, cymeno, thymol y terpeno. Aunque en todos los estudios los resultados se asemejan bastante, suele variar un poco el porcentaje de cada uno de ellos, pero debemos tener siempre en cuenta que en la composición final del aceite influyen múltiples factores, como pueden ser el momento y la forma de su recolección, el clima en el que se ha cultivado, altitud, suelo, nutrientes recibidos a lo largo de su vida, etc...

El AE del Orégano muestra **potencial antioxidante** gracias a sus componentes más activos carvacrol y timol, el poder antioxidante aumenta a medida que aumenta la concentración del aceite en el medio.

El poder antioxidante puede ser medido a través de diferentes métodos de análisis, los cuales presentan fundamentos de medición distintos, aunque en el caso de aceites y alimentos los más extendidos serían los métodos basados en la oxidación lipídica y los métodos de captación de radicales libres por transferencia de electrones.. Se debe tener en cuenta que la capacidad antioxidante puede sufrir cambios tanto por agonismo como por antagonismo con otros compuestos.

Respecto al **potencial antimicrobiano**: Se ha podido encontrar en la bibliografía revisada estudios de capacidad inhibitoria del OC tanto en bacterias Gram +, como Gram -, hongos, mohos y larvas, pudiendo observar como resultado que en todos ellos presenta algún tipo de capacidad inhibitoria, debiendo tener muy en cuenta las condiciones del estudio y si se ha usado

algún compuesto más que actúe de manera conjunta con el OC para obtener un MIC menor o una capacidad inhibitoria mayor. De manera concluyente como resultado de la actividad microbiológica y basándonos en los resultados revisados, podríamos decir que es más inhibitorio en bacterias Gram +, en levaduras y larvas, que en bacterias Gram - y mohos, y que aunque la mayoría de estudios son en medios de cultivo, también presenta inhibición cuando el estudio se realiza sobre alimentos listos para el consumo, como pueden ser el jamón y la ensalada preparada.



## 6. PROPUESTA DE ESTUDIO DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE PRODUCIDO EN ALICANTE DE ORIGEN ECOLÓGICO.

A la vista de la revisión bibliográfica considero que para poder caracterizar la capacidad antioxidante del AE de *O.compactum* sería conveniente aplicar, tras la extracción por hidrodestilación del aceite, los siguientes métodos sobre un banco de diluciones de *O. compactum*.

- Métodos basados en el secuestro de radicales libres tanto los basados en la transferencia de átomos de hidrógeno como los basados en la transferencia de electrones.
- Métodos de peroxidación lipídica, tanto las reacciones no enzimáticas como las enzimáticas. Estos métodos engloban la medición por agotamiento de oxígeno, por pérdida de sustrato y por formación de productos primarios y secundarios.

Según mi criterio y basándome en los métodos más relevantes de la revisión bibliográfica que tratan la capacidad antioxidante, y además conociendo en que se basa cada uno, a la hora de proponer un estudio para la capacidad antioxidante aplicaría alguno de los métodos siguientes: método **DPPH**, el ensayo del  **$\beta$ - caroteno**, el método de **Folin-Ciocalteu**, el **RANCIMAT** o el test **TBARS**.

El método Folin-Ciocalteu pienso que sería adecuado ya que la muestra a la que queremos medir la capacidad antioxidante es un AEs rico en fenoles, y este método se basa en la medición de estos grupos y otros grupos oxidables.

Por otra parte el método DPPH es un método caracterizado para la medición de la capacidad antioxidante concretamente de aceites, y además aparece en varias revisiones bibliográficas como un método bastante indicado para realizar nuestro análisis, ya que incluso en la revisión del artículo de Bouhdid y col, (2008), se ha medido la capacidad antioxidante del OC.

El ensayo del  $\beta$ - caroteno tiene un uso muy extendido, y aunque se suele emplear más para aceites ricos en oleico, el método está muy estandarizado para aceites, incluso en el artículo de Bouhdid y col, (2008), también se ha medido la capacidad antioxidante por este método.

El test TBARS mide la peroxidación lipídica, que es la más común en alimentos, y el test también es específico para aceites, por lo que creo que también sería otra posible opción.

Por último el método **RANCIMAT**, o método de inducción de la oxidación, es muy adecuado por poner a prueba la capacidad de inhibición de la oxidación de una matriz grasa y porque su extendido uso a nivel industrial hace que los resultados sean de fácil comprensión y gran utilidad para la industria alimentaria.

Tras la aplicación de los métodos compararíamos resultados entre los diferentes métodos y de las distintas concentraciones utilizadas, para poder obtener un resultado concluyente y fiable que permita proveer de base científica el uso del AE de *O. compactum* como antioxidante.



## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdeljalil Belkamel, Jamal Bammi, Abdelfettah Belkamel and Allal Douira. **Etude de la composition chimique de l'huile essentielle d'une endémique Ibéro-marocaine: *Origanum compactum* (Benth.)**(2013). Journal of Animal & Plant Sciences, 2013.

Alaoui.T and F.Moussaoui. **Evaluation of antibacterial activity and synergistic effect between antibiotic and the essential oils of some medicinal plants.** (2015) Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, Article in Press.

Alves-Silva.J, Dias dos Santos. S.M, Pintado.M, Pérez-Álvarez. J.A, Fernández-López.J and Viuda-Martos .M. **Chemical composition and in vitro antimicrobial, antifungal and antioxidant properties of essential oils obtained from some herbs widely used in Portugal.** Food Control (2012).

Azizkhani, M, Elizaquível, P., Sánchez, G., Selma, M.V and Aznar, R. **Comparative efficacy of *Zataria multiflora boiss*, *Origanum compactum* and *Eugenia caryophyllus* essential oils against *E. Coli O157: H7*, *Feline calicivirus* and endogenous microbiota in commercial baby-leaf salads.** (2013) *International Journal of Food Microbiology*, 166 (2), pp. 249-255.

Bakhy. K, Benlhabib.O, Bighelli.A, Casanova. J, Tomi.F and Al Faiz.C. **Yield and chemical variability of the essential oil isolated from aerial parts of wild *Origanum compactum* Benth. From Moroccan Western Rif.** American Journal of essential oils and natural products (2014).

Bakkali, F , Averbeck, S , Averbeck, D , Zhiri, A , Baudoux, D and Idaomar, M. **Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) after treatments with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS** (2006) Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 606 (1-2), pp. 27-38.

Bakkali.F, Averbeck.S, Averbeck.D, Zhiri.A and Idaomar.M. **Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** (2005) Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 585 (1-2), pp. 1-13.

Bakkali.F, Averbeck .S, Averbeck.D and Idaomar.M. **Biological effects of essential oils – A review.** Food and Chemical Toxicology 46 (2008) 446–475.

Bhanu Prakash, Akash Kedia and Prashant Kumar Mishra, N.K. **Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities e Potentials and challenges.** Food control (2014).

Bouchra, C, Achouri, M , Hassani, L.M.I and Hmamouchi, M. **Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr.** (2003) Journal of Ethnopharmacology, 89 (1), pp. 165-169.

Bouhdid, S, Skali, S.N, Idaomar, M, Zhiri, A, Baudoux, D, Amensour, M and Abrini, J. **Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil.** (2008) African Journal of Biotechnology, 7 (10), pp. 1563-1570.

Chafai Elalaoui Ali, Boukil Ahmed, Bachar Mohamed, Driss Lkhoumsi and Guermal Abdenasser. **Manuel des bonnes pratiques de collecte de l'origan « *Origanum compactum*.** Projet pam (2014).

Chishti, S and Kaloo, Z.A., Sultan, P. **Medicinal importance of genus *Origanum*: A review.** (2013) Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy, 5 (10), pp. 170-177.

Fakchich J and Elachouri M. **Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments.** (2013), Journal of Ethnopharmacology.

Graca.M. **Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review).** Flavour and fragrance journal (2010), pp 291-312.

Haba. E, Bouhdid.S, Torrego-Solana.N, Marqués. A.M, Espuny.M.J, García-Celma.M.J and Manresa. A. **Rhamnolipids as emulsifying agents for essential oil formulations: Antimicrobial effect against *Candida albicans* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** (2014) International Journal of Pharmaceutics, 476 (1), pp. 134-141.

Hamdy A.E. Shaaban, Ahmed H. El-Ghorab and Takayuki Shibamoto. **Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review.** Journal of Essential Oil Research (2012).

Hammou, B.F., Skali, N., Idaomar, M and Abrini, J. **The antimicrobial effect of *Origanum compactum* essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* in tryptic soy broth (TSB) and in sheep natural sausage casings during storage at 25 and 7°C.** (2011) African Journal of Biotechnology, 10 (71), pp. 15998-16005.

Kloucek, P, Smid, J, Frankova, A, Kokoska, L., Valterova, I and Pavela, R. **Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase** (2012) Food Research International, 47 (2), pp. 161-165.

Lang.G and Buchbauer.G. **A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review.** Flavour and fragrance journal (2012), pp 13-39.

Marín.I, Sayas-Barberá.E, Viuda-Martos.M, Navarro.C and Sendra.E. **Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Organic Fennel, Parsley, and Lavender from Spain.** MDPI(2016)

Mezzouga.N , Elhadri.A , Dallouh.A , Amkiss a.S, Skali.N.S , Abrini.J , Zhiri.A , Baudouxb.D, Diallo.B , El Jaziri.D and Idaomar.M. **Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents.** Science Direct Mutation Research 629 (2007) 100–110.

Nhu-Trang, T.-T., Casabianca, H and Grenier-Loustalot, M.-F. **Deuterium/hydrogen ratio analysis of thymol, carvacrol,  $\gamma$ -terpinene and p-cymene in thyme, savory and oregano essential oils by gas chromatography-pyrolysis-isotope ratio mass spectrometry** (2006) Journal of Chromatography A, 1132 (1-2), pp. 219-227.

Oussalah, M , Caillet, S , Saucier, L and Lacroix, M. **Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*** (2007) Food Control, 18 (5), pp. 414-420.

Oussalah, M , Caillet, S , Saucier and Lacroix, M. **Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat** (2006) Meat Science, 73 (2), pp. 236-244.

Parra Triviño.C. **Control ecológico de levaduras alterantes en productos lácteos. Ensayo de aceite esencial de *Oregano compactum*.**(2014)

Riedl.B, Bouchard.J, Dang Vu.K, Lacroix.M and Huq.T. **Synergistic effect of gamma ( $\gamma$ )-irradiation and microencapsulated antimicrobials against *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat (RTE) meat.** (2015) Food Microbiology, 46, pp. 507-514.

Rodriguez-Garcia.I, Silva-Espinoza.B.A, Ortega-Ramirez.L.A, Leyva. J.M, Siddiqui. M.W, M.R. Cruz-Valenzuela, G.A. Gonzalez-Aguilar and J. F. Ayala-Zavala. **Oregano Essential Oil as an Antimicrobial and Antioxidant Additive in Food Products.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition. (2015).

Rota. M, Herrera. A, Martinez. R, Sotomayor. J.A and Jordan M.J. **Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils.** (2008). Food Control 19 (2008) 681–687.

Sağdıç, O, Kuşçu, A, Özcan, M and Özçelik, S. **Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157:H7** (2002) Food Microbiology, 19 (5), pp. 473-480.

Shankar Raut.J and Mohan Karuppaiyl.S. **A status review on the medicinal properties of essential oils. Revision.** Industrial crops and products. (2014)

Sfeir, J, Lefrançois, C., Baudoux, D., Derbré, S and Licznar, P. **In vitro antibacterial activity of essential oils against *Streptococcus pyogenes*.** (2013) Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2013, art. no. 269161, .

Tongnuanchan.P, and Benjakul.S. **Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and their uses for food preservation.** Concise reviews in food science. (2014).

Vergis.J, Gokulakrishnan.P, Argarwal.R.K and Kumar.A. **Essential Oils as Natural Food Antimicrobial Agents. A review.** Critical reviews in food Science and Nutrition. (2015).

Yi Xin Seow, Chia Rou Yeo, Hui Ling Chung and Hyun-Gyun Yuk. **Plant Essential Oils as Active Antimicrobial Agents.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition. (2013).

