

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA

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



**“Actividad antioxidante y antibacteriana de
aceites esenciales ecológicos de hinojo, perejil
y lavanda”**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Septiembre – 2015

AUTOR: Irene Marín Muñoz

DIRECTOR/ES: D^a Esther Sendra Nadal

CODIRECTOR: D Manuel Viuda Martos

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE
ORIHUELA

TRABAJO FIN DE MÁSTER



**“Actividad antioxidante y antibacteriana de aceites
esenciales ecológicos de hinojo, perejil y lavanda”**

El alumno

Fdo: Irene Marín Muñoz.

Vº Bº del Director

Dª Esther Sendra Nadal

Vº Bº del Codirector

D Manolo Viuda Martos



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

VISTO BUENO DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

CURSO 2014/2015

Director/es del trabajo
Esther Sendra Nadal Manuel Viuda Martos

Dan su visto bueno al Trabajo Fin de Máster

Título del Trabajo
Actividad antioxidante y antibacteriana de aceites esenciales ecológicos de hinojo, perejil y lavanda
Alumno
Irene Marín Muñoz

Orihuela, a 07 de Septiembre de 2015

Firma/s directores/es trabajo



Se autoriza al alumno Dña. Irene Marín Muñoz a realizar el Trabajo Fin de Máster titulado: “Actividad antioxidante y antibacteriana de aceites esenciales ecológicos de hinojo, perejil y lavanda”, bajo la dirección de Dña. Esther Sendra Nadal y la codirección de D. Manuel Viuda Martos, debiendo cumplir las directrices para la redacción del mismo que están a su disposición en la asignatura.

Orihuela, 15 de Julio de 2015

Fdo.: Gema Romero Moraleda

Directora del Master Universitario en Agroecología, Desarrollo Rural y Agroturismo





MASTER UNIVERSITARIO OFICIAL DE AGROECOLOGÍA, DESARROLLOR RURAL Y AGROTURISMO

REFERENCIAS DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

Título: “Actividad antioxidante y antibacteriana de aceites esenciales ecológicos de hinojo, perejil y lavanda.”

Modalidad: experimental.

Autor: Irene Marín Muñoz.

Director/es: Esther Sendra Nadal y Manuel Viuda Martos.

Convocatoria: 2014-2015.

Número de referencias bibliográficas: 94

Número de tablas: 9

Palabras clave (5 palabras): Aceite esencial, actividad antioxidante, actividad antibacteriana, ecológico, convencional.

RESUMEN

El uso de los aceites esenciales para aromatizar alimentos presenta una larga trayectoria, usándose desde la antigüedad en las diversas civilizaciones. En la actualidad se ha ido incrementando el interés en la utilización de conservadores naturales debido al conocimiento de diversos estudios que demuestran los efectos nocivos de los productos alimenticios a los que se incorporan aditivos químicos o sintéticos. Es principalmente este motivo el que ha hecho que los aceites esenciales derivados de plantas y especias se hayan estudiado en profundidad y se hayan evaluado para su uso como agentes antioxidantes y antibacterianos. En nuestro trabajo se ha llevado a cabo el análisis de los aceites esenciales ecológicos de hinojo (*Foeniculum vulgare*), perejil (*Petroselinum crispum*) y lavanda (*Lavandula officinalis*), comparados con el aceite esencial de lavanda producida en agricultura convencional. Para ello se ha evaluado su composición química, contenido en fenoles totales, propiedades antioxidantes mediante diferentes métodos, y actividad antibacteriana frente a *Listeria innocua* y *Pseudomonas fluorescens*. Todos presentaron propiedades antioxidantes, en mayor o menor medida en función del mecanismo de capacidad antioxidante evaluado, así, el aceite de perejil resultó pro-oxidante al evaluar el índice del ácido tiobarbitúrico. Respecto a la capacidad antimicrobiana todos mostraron inhibición de *L. innocua*, pero ninguno de ellos resultó efectivo contra *P. fluorescens*. Las diferencias observadas para algunos parámetros entre las lavandas analizadas no pudieron explicarse por el origen ecológico o convencional del cultivo.

ABSTRACT

The use of essential oils for flavoring food has a long history, they have been used since ancient times in various civilizations. Nowadays, there is an increasing interest in the use of natural preservatives for foods, given the widespread sense that consumers rather prefer natural products due to safety concerns about synthetic chemicals. In this scenario, essential oils derived from plants and spices have been studied extensively and have been evaluated for use as antioxidants and antibacterial agents. In our work, it has been carried out the analysis of essential oils from organic grown fennel (*Foeniculum vulgare*), parsley (*Petroselinum crispum*) and lavender (*Lavandula officinalis*), as well as conventionally grown lavender. Chemical composition, total phenol content, antioxidant properties by different methods, and antimicrobial properties against *Listeria innocua* and *Pseudomonas fluorescens* have been evaluated. All essential oils showed antioxidant properties, depending on the evaluated mechanism, parsley essential oil showed pro-oxidant properties as assessed by thiobarbituric acid test. Regarding antimicrobial properties, all of them showed inhibitory activity against *L. innocua*, but none was able to inhibit *P. fluorescens*. None relevant differences could be explained by the organic or conventional origin of lavender.

AGRADECIMIENTOS

Estas líneas van dirigidas a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de este Trabajo Fin de Máster.

De manera especial, me gustaría expresar mi gratitud a mi directora, Esther Sendra Nadal. Por segunda vez en mi paso por la Universidad Miguel Hernández ha sido la encargada de guiarme en la elaboración de mi trabajo. Sin su ayuda, paciencia y cariño hubiese sido imposible llevarlo a cabo. De igual manera, a mi codirector Manuel Viuda Martos, con el que compartí la investigación en el laboratorio, y con el que trabajar es un placer y, a menudo, una fiesta. Gracias por hacerme tan amena esta tarea, por ofrecerme tus conocimientos y por el interés mostrado para que este proyecto se realizara.

Gracias a mi marido, José Domingo, por sus palabras de apoyo y confianza, por su paciencia en los momentos de tensión y por su cariño incondicional. No podía faltar mi familia, grande donde las haya, por ayudarme estos meses a llegar a la meta, quitándome obstáculos para que todo fuera más fácil. Os adoro.

También a mis amigos/as, eslabón importantísimo en mi vida, por escucharme, tranquilizarme, animarme y estar siempre, de manera incondicional, sin tener en cuenta la hora ni el día (Ana, Andrea, Anahí, Fiorella, Javi, Mari Carmen, Nieves, Silvia, Trini,...) pero de manera muy especial a Mari Carmen Reina y Juan, por haber tenido el placer de compartir un año muy intenso a vuestro lado, jornadas intensivas de estudio e investigación, descansos, búsqueda de recursos, de horas y horas al teléfono consultando dudas, largas tardes y madrugadas, risas y lagrimas para conseguir nuestro objetivo, y como no para celebrarlo a lo grande!. Sin vosotros nada sería igual.

Por último, a mis compañeros Antonio, José Andrés, José Antonio, José Miguel, Mari Carmen y Raquel. Gracias por facilitarme el trabajo para poder llevar a cabo este proyecto y por ayudarme en el día a día.

Gracias.

ÍNDICE GENERAL:

	<u>Páginas</u>
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- Alimentos ecológicos en España	1
1.1.1.-Principios generales de la producción ecológica	4
1.2.- Características de los aceites esenciales: interés para su aplicación en alimentos.....	4
1.2.1.- Clasificación de los aceites esenciales	7
1.2.2.- Localización de los aceites esenciales en las plantas.....	9
1.2.3.- Características físico-químicas de los aceites esenciales.	9
1.3.- Los aceites esenciales como agentes antioxidantes y antibacterianos	9
2.- OBJETIVOS.....	14
2.1.- Objetivos Generales	14
2.2.-Objetivos Parciales.....	14
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1.- Diseño de los experimentos.....	15
3.1.1.- Material vegetal	15
3.1.2.- Sustancias químicas.....	15
3.1.3.- Preparación de las soluciones metanólicas a partir de los aceites esenciales.....	15
3.2.- Metodología analítica.....	17
3.2.1.- Determinación de la composición de los aceites (GC/MS).....	17
3.2.2.- Determinación de Fenoles Totales	18
3.2.3.- Determinación de la Capacidad Antioxidante	18
3.2.3.1.- <i>Determinación de la actividad antioxidante usando 2,2'-difenil-1-picrihidrazil (DPPH) método de captación de radicales</i>	 18

3.2.3.2.- Poder Reductor del Hierro (FRAP).....	19
3.2.3.3.- Inhibición de la peroxidación lipídica de la yema de huevo tamponada por aceites esenciales (TBARS).....	20
3.3.- Determinación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales	21
3.3.1.- Inhibición de <i>Listeria innocua</i>	21
3.3.2.- Inhibición de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	21
3.4.- Análisis estadístico	22
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1.- Resultados de la composición química de los aceites esenciales	23
4.1.1.- Resultados de la composición química del aceite esencial de hinojo ecológico, perejil ecológico, lavanda ecológica y lavanda convencional.....	23
4.2.- Resultados del Contenido Total de Fenoles.....	29
4.3.- Resultados de la Capacidad Antioxidante de los aceites esenciales	30
4.3.1.- DPPH.....	30
4.3.2.- FRAP.....	33
4.3.3.- TBARS	35
4.4.- Resultados de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales	37
4.4.1.- <i>Listeria innocua</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i>	37
5.- CONCLUSIONES.....	39
6.- BIBLIOGRAFÍA.....	41

INDICE DE TABLAS

- Tabla 1: Dedicación de la superficie ecológica en España en el año 2011.
- Tabla 2: Clasificación de los aceites esenciales según sus grupos funcionales y ejemplos.
- Tabla 3: Soluciones metanólicas a partir de aceites esenciales.
- Tabla 4: Composición química de los aceites esenciales de hinojo ecológico (*Foeniculum vulgare*), perejil ecológico (*Petroselinum crispum*), lavanda ecológica (*Lavandula officinalis*) y lavanda convencional, porcentajes relativos del área total e Índice de Kòvats.
- Tabla 5: Contenido total de fenoles (TPC) de aceites esenciales de hinojo ecológico (*Foeniculum vulgare*), perejil ecológico (*Petroselinum crispum*), lavanda ecológica (*Lavandula officinalis*) y lavanda convencional.
- Tabla 6: La actividad antioxidante de los aceites esenciales de hinojo ecológico (*Foeniculum vulgare*), perejil ecológico (*Petroselinum crispum*), lavanda ecológica (*Lavandula officinalis*) y lavanda convencional utilizando las concentraciones correspondientes (A = 5 g/L, B = 10 g/L, C = 20 g/L, D = 50 g/L) medido por el método DPPH.
- Tabla 7: La actividad antioxidante de hinojo ecológico (*Foeniculum vulgare*), perejil ecológico (*Petroselinum crispum*), lavanda ecológica (*Lavandula officinalis*) y lavanda convencional utilizando las concentraciones correspondientes (A = 5 g/L, B = 10 g/L, C = 20 g/L, D = 50 g/L) medido por el método FRAP.
- Tabla 8: Actividad antioxidante de aceites esenciales de hinojo ecológico (*Foeniculum vulgare*), perejil ecológico (*Petroselinum crispum*), lavanda ecológica (*Lavandula officinalis*) y lavanda convencional utilizando las concentraciones correspondientes (A = 5 g/L, B = 10 g/L, C = 20 g/L, D = 50 g/L) medidos mediante el ensayo TBARS.
- Tabla 9: Efecto de la concentración (CE) de aceites esenciales de hinojo ecológico (*Foeniculum vulgare*), perejil ecológico (*Petroselinum crispum*), lavanda ecológica (*Lavandula officinalis*) y lavanda convencional.



“Sin importar que tan urbana sea nuestra vida, nuestros cuerpos viven de la agricultura; nosotros venimos de la Tierra y retornaremos a ella, y es así que existimos en la agricultura tanto como existimos en nuestra propia carne.”

Wendell Berry



Introducción

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Alimentos ecológicos en España.

La producción ecológica puede ser definida como una técnica que nos ofrece alimentos con propiedades nutricionales y organolépticas de mayor calidad y más saludables, a la vez que contribuye a preservar el medio ambiente en el ámbito rural y al fomento de la biodiversidad. Para ello, este sistema está basado en una serie de principios encaminados a unas prácticas de cultivo y manejo comunes diseñadas para mermar el impacto humano en el medio ambiente.

La diversidad de numerosas especies, tanto animales como vegetales, presentes en estos sistemas, así como la heterogeneidad en el uso de la tierra, contribuyen a crear un paisaje más interesante y complejo, apoyando el desarrollo a nivel local y regional en las zonas rurales.

Esta producción está regulada por una normativa general a nivel estatal, y por un estricto Reglamento europeo, Reglamento (CE) Nº 834/2007 sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el Reglamento (CE) Nº 2092/91 y Reglamento (CE) Nº 889/2008 por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) Nº 834/2007 del Consejo con respecto a la producción ecológica, su etiquetado y su control, donde se recogen las exigencias en material vegetal, animal, inspecciones, certificación y etiquetado. Actualmente, existe una propuesta del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre la producción ecológica y su etiquetado, la cual derogaría el R (CE) 834/2007, y modificaría el R (CE) 889/2008. Los controles a los que son sometidos los alimentos ecológicos son realizados por entidades certificadoras autorizadas y supervisadas por la Administración, con el fin de garantizar el cumplimiento de las normas establecidas.

Por tanto, un alimento ecológico es aquel que ha sido producido sin usar pesticidas y fertilizantes sintéticos, evitando todo tipo de alteraciones transgénicas y respetando el sistema natural donde se desarrolla dicho producto. (MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE, Y MEDIO NATURAL Y MARINO, [MARM], 2009).

Según un estudio realizado por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medioambiente con la colaboración de la empresa de investigación GFK publicado en

septiembre de 2014, los consumidores de productos ecológicos en España han aumentado hasta un 29% respecto a un 26% en 2011, año en el que también se realizó dicha investigación para estudiar la Evolución de la caracterización de la tipología y perfil socio-demográfico del consumidor de alimentos ecológicos en España.

En cuanto a la edad de los consumidores de productos ecológicos, también se ha producido un aumento significativo en las comprendidas entre 45 y 54 años respecto al 2011, en contraposición de los jóvenes menores de 35, los cuales han disminuido considerablemente su consumo. Referente al sexo, el consumo de estos alimentos se asemeja más entre hombres y mujeres con respecto al anterior estudio, en el cual, las mujeres eran más destacadas. También aumenta la frecuencia de consumo, siendo un 25% de los consumidores los que lo hacen a diario. Los productos más consumidos y por los que se empieza son las verduras frescas y la fruta, seguidas de la carne de ave y lácteos.

La distribución geográfica aparece sin diferencias significativas notables, al contrario que en 2011 en el que el peso del Noroeste de España en cuanto al consumo de estos alimentos era más relevante. Uno de los parámetros de estudio que no sufrió variación fue la mayor proporción de personas de clase media-alta y alta que consumen alimentos ecológicos, y la composición de los hogares, en los que siguen siendo los hogares con hijos los que mayor porcentaje de consumo ecológico presentan, respecto a los hogares sin hijos y unipersonales.

Una de las características que definen al consumidor ecológico es que prefiere consumir productos locales y cultivados cerca de su entorno y adquirir productos de comercio justo. Estas personas están generalmente comprometidas con el medioambiente y la sostenibilidad, a pesar de que el porcentaje de reciclado ha bajado respecto al estudio anterior, además de ser personas que se preocupan por la salud y nutrición. El consumo está limitado principalmente por los precios, ya que son más altos que un producto convencional, y por la baja disponibilidad. El hipermercado sigue siendo el canal más utilizado por los consumidores, pero sigue creciendo la adquisición de dichos productos directamente al agricultor.

La agricultura ecológica en España, un país desarrollado dentro del contexto único de la Unión europea, ha gozado de un crecimiento asombroso en los últimos

años, y se han podido apreciar ganancias significativas del mercado de productos ecológicos dentro del país (Ruiz de Maya et al., 2011; Comisión europea, 2010).

Desde el año 1992 se ha ido observando un crecimiento notable en la producción de productos ecológicos, tanto en España como a nivel europeo. En el 2011, la superficie dedicada a cultivos ecológicos alcanzó 1.845.039 hectáreas tal como se muestra en la **Tabla 1**, como consecuencia del fuerte crecimiento en los últimos años de la superficie productiva ecológica, con un aumento del 25% entre 2009 y 2011 (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente [MAGRAMA], 2013).

Tabla 1: Dedicación de la superficie ecológica en España en el año 2011.

Dedicación de la superficie ecológica	Año 2011			
	Sup. ecológica inscrita (Has)	Sup. ecológica productiva (Has)	% Sup. productiva inscrita	% Total sup. eco. inscrita
Cultivos (arables y permanentes)	835.506,78	561.944,54	67,26	45,28
Prados y pastos permanentes (incluido forestal con uso ganadero)	869.427,13	587.608,20	67,59	47,12
Otros usos (forestal sin uso ganadero, barbechos, erial y otros)	140.105,19	92.056,34	65,71	7,59
TOTAL	1.845.039,10	1.214.609,08	67,29	100

Fuente: MAGRAMA, 2013

Aunque la superficie es un indicador importante en la producción ecológica, también lo es la cantidad y tipo de producto que se genera en este tipo de producción. La mayoría de la producción es de origen vegetal y se estima que en 2011 hubo un

incremento significativo en cuanto al valor generado de alrededor de un 25% comparándolo con el 2009 (MAGRAMA, 2013).

En general la producción ecológica en España está aumentando en cuanto a las cantidades de producción y también de consumo.

1.1.1.- Principios generales de la producción ecológica.

La agricultura ecológica está basada en una serie de parámetros a seguir, tal como se ha comentado en el apartado anterior. Los principales son:

- ✓ Selección de especies vegetales y animales que se adapten al medio y que sean resistentes a enfermedades.
- ✓ Limitación en el uso de pesticidas y fertilizantes químicos, al igual que antibióticos en el ganado, y aditivos y coadyuvantes en alimentos y otros insumos.
- ✓ Prohibición del uso de organismos modificados genéticamente.
- ✓ Promueve la rotación de cultivos.
- ✓ Prevención de la erosión de los suelos.
- ✓ Equilibrio y aumento de la biodiversidad.
- ✓ Cría de ganado al aire libre, con alimentación ecológica y con prácticas adecuadas.
- ✓ Aprovechamiento local de los recursos naturales propios.

1.2.- Características de los aceites esenciales: interés para su aplicación en alimentos.

El empleo de aceites esenciales por el ser humano tiene su origen desde tiempos remotos y se conocen referencias de todas las culturas y religiones. Tanto es así, que existen datos de su uso con fines terapéuticos por parte de la población china

desde el año 4500 a.C. También los egipcios lo usaban para embalsamar a sus difuntos, productos cosméticos, para baño y en medicina, y en Grecia lo destinaban a fines medicinales para sus enfermos (Mahecha, 2010). Su utilidad es muy amplia, ya que desde tiempos inmemorables ha estado ligado a fines sociales, religiosos y terapéuticos entre otros (De la Torre y López, 2010).

La creciente preocupación por el deterioro en la calidad de los alimentos que consumimos y el actual interés de la población, sobre todo en los países desarrollados por consumir productos más naturales, hace que se abra una gran oportunidad en el mercado de los alimentos funcionales, probióticos, prebióticos, ecológicos, sanos,... y en el uso de aditivos de origen natural, en retracción de los de origen químico.

Además de todo lo anterior, los alimentos también son susceptibles de sufrir graves deterioros en su calidad causados por procesos de oxidación que se dan entre los compuestos que los constituyen y el oxígeno presente en el ambiente. Este deterioro se produce sobre todo durante su procesado y su almacenamiento. Para prevenir estos procesos de oxidación de los alimentos, usualmente se utilizan antioxidantes sintéticos como el butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT). Sin embargo, estos antioxidantes presentan el inconveniente de ser compuestos muy volátiles y se descomponen cuando son expuestos a temperaturas muy elevadas, además de que su consumo puede tener riesgos para la salud, aunque no está totalmente claro (Martínez-Tome et al., 2001). Es este el motivo por el que se incrementa el interés en los aceites esenciales y su aplicación en la conservación de alimentos, ya que existe una percepción cada vez más negativa de los conservantes sintéticos por el consumidor. Como consecuencia, se buscan otras alternativas a la incorporación de antioxidantes químicos, y se incorporan los aceites esenciales a la industria alimentaria.

Los aceites esenciales son definidos de varias maneras según los diferentes autores. Por ejemplo, según Fuentealba (1999), Davis y Camper, (2001), Cairo (2003), Ricciardi (2003), Vogel y Berty (2003) coinciden en que los aceites esenciales son una combinación de sustancias químicas naturales capaces de proporcionar a las diferentes plantas aromas característicos, ya sea en sus hojas, frutos, flores, semillas, etc. Por otro lado Burt, (2004) explicó que los aceites esenciales son mezclas de sustancias con una composición química muy compleja, obtenidos a partir del metabolismo secundario de la plantas, es decir, sustancias que presentan actividad

farmacológica, y que no están presentes en todas las plantas. Son características de algunas especies. Los compuestos que se encuentran en mayor cantidad en la constitución de los aceites puede llegar a superar el 85% del total, mientras que el resto de componentes aparece en forma de trazas (Bauer, K., Garbe, D., Surburg, H., 2001). El papel que juegan esos compuestos minoritarios es de vital importancia, ya que existen estudios que demuestran que contribuyen de manera significativa a las propiedades funcionales que pueda presentar el aceite esencial en cuestión (Burt, 2004).

En la actualidad, se conocen aproximadamente 3000 aceites esenciales diferentes, de los cuales, solamente unos 300 tienen interés comercial e industrial. Sobre todo son usados en las industrias de la alimentación como saborizantes y aromatizantes, sanidad, farmacéutica, perfumería y cosmética. A escala mundial, los aceites esenciales más importantes representan casi el 50% del total con solo 18 aceites esenciales diferentes. El 90% del consumo mundial de estos aceites es producido solamente por 13 países, liderados por EEUU y China, que juntos suponen el 44% del consumo mundial (FAO, 2011). A pesar de que puede ser un sector poco conocido y pasar inadvertido, la producción mundial de aceites esenciales es de miles de toneladas, por tanto, es un mercado de alta importancia económica.

La industria alimentaria en España es una de las que más aceites esenciales requiere. Su uso es muy variado, y se suelen emplear aditivos naturales con funciones saborizantes, colorantes, antioxidantes y conservantes. Se pueden encontrar en todo tipo de productos, como carnes preparadas, embutidos, sopas, helados, queso, aceite, vinagre, encurtidos, embutidos, etc. Los aceites más empleados por esta industria son el cilantro, naranja y menta, entre otros. También son utilizados en la elaboración de bebidas alcohólicas y no alcohólicas, especialmente refrescos. Para ello las más usadas son las esencias extraídas del naranjo, limón, mentas e hinojo, además de muchas otras. Estas esencias también se emplean en la producción de caramelos, chocolates y otras golosinas con la finalidad de aromatizar y dar sabor a dichos productos.

1.2.1.- Clasificación de los aceites esenciales.

Se pueden clasificar en base a diferentes criterios, según Martínez, A. (2003) y SENA (2012):

- ✓ Consistencia.
 - Esencias fluidas, que se caracterizan por ser líquidos volátiles a temperatura ambiente.
 - Bálsamos, con una consistencia más espesa y menos volátiles, con facilidad de sufrir reacciones de polimerización.
 - Oleorresinas, las cuales presentan el aroma de las plantas de forma concentrada y pueden ser líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas.

- ✓ Origen.
 - Naturales, obtenidos directamente de la planta, sin ninguna modificación fisicoquímica. Su extracción es muy costosa puesto que presentan bajos rendimientos.
 - Artificiales, producidos con mezclas o enriqueciendo la esencia con uno o varios de sus componentes.
 - Sintéticos, elaborados por combinación de sus componentes, que a su vez son sintetizados químicamente. Son más económicos y por tanto más usados.

- ✓ Estructuras químicas más frecuentes.
 - Monoterpenoides, muy abundantes en la albahaca, menta, salvia.
 - Sesquiterpenoides, abundantes en el jengibre.
 - Compuestos oxigenados, abundantes en el jazmín y geranio.

En cuanto a la clasificación de los aceites esenciales según su estructura química, también aparecen otras interpretaciones, según diferentes autores. Russo, Gallet, Bocchini, y Carnacini, (1998) explicaron que en la composición de los aceites esenciales participan más de setenta sustancias, fundamentalmente terpenos, monoterpenos y sesquiterpenos, hidrocarburos, alcoholes, cetonas,... Günther, (1948); Teuscher et al., (2005); Parry, (1921); Muñoz, (2002) y Peter, (2004) coincidieron en que los aceites esenciales son mezclas homogéneas formadas por compuestos químicos orgánicos que provienen de una misma familia, los terpenoides. Estos son una familia de hidrocarburos oxigenados o no, con uno o varios anillos insaturados y con 10 carbonos en su estructura. Según Mahecha, (2010) los aceites esenciales están formados por numerosos compuestos volátiles, producto del metabolismo secundario de las plantas en cuya composición interviene una porción de hidrocarburos del tipo terpenos, junto con otros compuestos, casi siempre oxigenados, como alcoholes, ésteres, aldehídos y compuestos fenólicos, responsables de los aromas que le confieren. Otra agrupación de los aceites esenciales la presenta Cairo, (2003), tal como indica la **Tabla 2**.

Tabla 2: Clasificación de los principales compuestos de los aceites esenciales según sus grupos funcionales y ejemplos:

Grupo químico	Ejemplo
Ésteres	Ácido benzoico, acético, salicílico.
Alcoholes	Linalol, geraniol, citronelol, terpeniol, mentol, borneol.
Aldehídos	Citral, citronelal, benzaldehído, aldehído cumínico.
Fenoles	Eugenol, timol, carvacrol.
Cetonas	Carvona, mentona, pulegona, fenchona, alcanfor, cetona.
Lactonas	Cumarina.
Terpenos	Canfeno, pineno, limoneno, felandreno, cedreno.
Hidrocarburos	Cimeno, estireno.

Fuente: Cairo, 2003

1.2.2.- Localización de los aceites esenciales en las plantas.

Los aceites esenciales procedentes de las plantas aromáticas son sintetizados y acumulados en estructuras glandulares o vesículas secretoras que pueden encontrarse por toda la planta, ya que su distribución no es homogénea, aunque suelen presentarse en la parte aérea, generalmente en hojas y flores. En algunos casos, las flores pueden poseer más número de vesículas secretoras que el resto de la planta, por tanto el rendimiento del aceite puede variar mucho dependiendo de si su obtención se hace destilando por separado las distintas partes de la planta (frutos, flores, raíces, tallos y hojas) o no (Miguel, Figueiredo, Costa, Martins, Barroso y Pedro, 2003). La presencia de los aceites en las plantas tienen como finalidad protegerlas de posibles plagas o enfermedades e incluso de que sean invadidas por otras plantas, atraer insectos para facilitar la polinización, ahuyentar depredadores, o simplemente ser un producto metabólico que interviene en el proceso (Montes et al., 1992, y Cairo, 2003).

1.2.3.- Características físico-químicas de los aceites esenciales.

Entre sus características destaca que son líquidos de aspecto oleoso, altamente volátiles, insolubles en agua aunque le transmiten su perfume, y solubles en alcohol, éter, aceites vegetales y minerales, muy inestables ante la luz y el oxígeno, y ante la presencia de agentes oxidantes y reductores, inflamables, responsables del aroma de las plantas, colores y sabores, con densidad generalmente inferior a la del agua. Están compuestos mayoritariamente parte por hidrocarburos de la serie polimetilénica del grupo de los terpenos que se encuentran con otros compuestos, casi siempre oxigenados.

1.3.- Los aceites esenciales como agentes antioxidantes y antibacterianos.

Según Ortuño (2006), los aceites esenciales son conocidos y usados en gran número de aplicaciones desde la antigüedad. Sus usos más comunes eran la cosmética, perfumería y farmacología. Es más adelante, entre los Siglos XVI y XVII, cuando se empiezan a conocer los aceites esenciales de los que disponemos en la actualidad. Con la llegada de la medicina moderna, el uso de los aceites como

productos curativos entró en decadencia, pero en el Siglo XIX fue necesaria su industrialización debido a su empleo masivo en productos de perfumería y como aditivos para otorgar sabor a los alimentos.

Durante varias décadas, numerosos estudios e investigaciones de diferentes autores han confirmado y coincidido en la capacidad antifúngicas que poseen los aceites esenciales. Esta característica es conferida por los diferentes compuestos químicos que constituyen a los aceites esenciales, principalmente los terpenos. (Reuveni et al., 1984, Deans y Ritchie, 1987; Alankararao et al., 1991; Baruah et al., 1996; Gogoi et al., 1997; Pitarokili et al., 1999; Meepagala et al.; 2002).

Además, se ha demostrado que no solo contienen unas importantes propiedades antifúngicas (Fitzgeraldetal, 2004; Kalemba y Kunicka, 2003; Silva et al., 2011; Tserennadmid et al., 2011), sino también antiparasitarias (George et al., 2009), insecticidas (Essam, 2001; Kim et al., 2003), antivirales (Schnitzler et al., 2011), antibacterianas (Deans y Ritchie, 1987; Oussalah et al., 2007), y antioxidante (Brenes y Roura, 2010).

En la industria alimentaria se usan principalmente aceites esenciales como aditivos para aportar aromas, pero también representan una interesante fuente de antimicrobianos naturales con la finalidad de conservar los alimentos. No obstante, la aplicación de aceites esenciales como conservantes de alimentos requiere unos conocimientos muy específicos sobre sus propiedades, como por ejemplo, la concentración mínima inhibitoria (MIC), la gama de organismos objetivo, el modo de acción, y el efecto de componentes de la matriz alimentaria en sus propiedades antimicrobianas. Estos conocimientos de las sustancias que forman los aceites esenciales a día de hoy están muy documentados en unos pocos componentes de los aceites esenciales, pero todavía falta mucho por investigar en el resto de sustancias que los conforman. El estudio de los aceites esenciales como agentes antimicrobianos en la aplicación a la industria alimentaria es de vital importancia, ya que se podría conocer su efecto sobre los diferentes microorganismos susceptibles de aparecer en los alimentos, la forma en la que interactúan con el alimento y cómo funcionan en combinación con otros componentes. El inconveniente más significativo que presenta la utilización de aceites esenciales como conservantes naturales de alimentos es, por un lado, que individualmente no son lo suficientemente potentes para obtener inhibir microorganismos, y por otro, que cuando se añaden cantidades suficientes para

proporcionar un efecto antimicrobiano, causan cambios organolépticos en los alimentos que en ocasiones pueden ser negativos.

Los estudios a modo individualizado de los componentes de un aceite esencial con acción antimicrobiana, casi siempre han sido sobre bacterias, y en menor medida sobre mohos y levaduras. Las bacterias Gam-negativas suelen ser menos susceptibles a los agentes antimicrobianos que las Gram-positivas (Trombetta et al., 2005), debido a sus características de membrana que actúa como barrera para protegerse de macromoléculas y compuestos hidrófobos. Esto proporciona una mayor protección frente a compuestos antimicrobianos hidrofóbicos, los cuales forman parte de los aceites esenciales (Nikaido, 1994, 2003).

Del mismo modo, se ha demostrado que también poseen propiedades antioxidantes. Los antioxidantes son compuestos que poseen la capacidad de retrasar o inhibir la oxidación de lípidos u otras moléculas como consecuencia de la inhibición o propagación de las reacciones en cadena de oxidación (Velioglu et al., 1998). Según Zeng y Wang, (2001) los aceites esenciales pueden ser utilizados como conservadores naturales para los alimentos ya que entre sus componentes principales se encuentran los fenoles, sustancias que poseen dicha capacidad, y poder así sustituir a los antioxidantes sintéticos. Maestri et al., (2006), demostraron las altas propiedades antioxidantes que poseen los compuestos fenólicos naturales, pero su uso en los alimentos es bastante limitado por motivos de seguridad y solo algunos pueden ser aplicados a los alimentos.

Otro estudio llevado a cabo por diferentes investigadores como Ruberto y Baratta, (2000); Foti y Ingold, (2003); y Huang et al., (2005) demostró que muchos terpenos que forman parte de la composición de los diversos aceites esenciales poseen actividad antioxidante y antirradicales libres. La asociación entre sí de los diferentes componentes individuales que forman un aceite, posee más actividad antioxidante que la simple acción por separado de estos componentes (Ruberto y Baratta, 2000; Agnani et al., 2004; Lee y Shibamoto, 2002; Singh et al., 2005).

Las propiedades antioxidantes de los aceites esenciales dependen de su composición química. Muchos de ellos han demostrado ser antioxidantes naturales muy potentes debido a sus altos contenidos en fenoles e hidrocarburos terpénicos capaces de inhibir la oxidación, y por tanto, pueden ser incluidos como

alimenticio o aditivo para conservar de manera natural infinidad de productos alimentarios y prevenir ciertas enfermedades (Edris, 2007).

A la vista de las potenciales propiedades antimicrobianas y antioxidantes de los aceites esenciales, resulta de gran interés evaluar la capacidad antimicrobiana in vitro de aceites esenciales de origen ecológico. El conocimiento de sus propiedades conservantes permitiría su uso en alimentos ecológicos, y alimentos convencionales donde permitiría sustituir la adición de conservantes químicos de síntesis. En este trabajo en concreto se estudian tres aceites esenciales de amplio uso: hinojo, perejil y lavanda. Se propone evaluar su efecto frente a dos bacterias psicrótrofas, alterantes de alimentos refrigerados (*Pseudomonas fluorescens*) e indicadores de la presencia de *Listeria* spp. (*Listeria innocua*), así como sus propiedades antioxidantes por diferentes métodos.

Las bacterias que pertenecen al género *Listeria* son bacilos Gram-positivos cortos, regulares, no esporulados ni ramificados, y que suelen aparecer como células individuales o formando cadenas cortas (Oteo y Alós, 2004). Su tamaño suele ser de entre 0,4 y 0,5 μm de diámetro y 0,4 y 2 μm de longitud, según información publicada en 1994, por Hendricks-Bergey en la novena edición de Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Pueden ser móviles cuando se cultivan a temperaturas aproximadas a 25° C y esto se debe a la presencia de varios flagelos de implantación periférica, los cuales pueden llegar a medir entre 6 y 20 μm . Las colonias suelen ser pequeñas y lisas y tienen un color gris azulado con la luz normal y azul-verde brillante al observarse a la lupa con epiiluminación, con un ángulo de la luz de 45°-60° C. La temperatura óptima para su crecimiento se sitúa entre 30°C y 37°C. *Listeria* spp. son microorganismos aerobios y anaerobios facultativos (Trepal-Quílez, M., 2002). Existen diferentes especies dentro de este género, entre las cuales se encuentra la *Listeria innocua*. Ésta se utiliza como sustitutivo no patógeno de otras especies, ya que presenta características tanto fisiológicas como metabólicas muy similares al resto. Es esta la razón principal por la que es aceptada de manera internacional como modelo en diversos estudios (Wouters et al., 1999 y Fitzgerald et al., 2004).

Las *Pseudomonas* son microorganismos móviles, ya que presentan uno o varios flagelos polares (Bergey y Krieg, 1989). Al igual que en la *Listeria*, existen diferentes especies dentro de este género. Normalmente se encuentran en el suelo, aunque también pueden aparecer como patógenos oportunistas en animales

(siendo el caso de *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*) y en plantas (*P. syringae*). Poseen un metabolismo aerobio, aunque algunas cepas son todo lo contrario. Pertenecen al género Gram-negativo, y presentan gran importancia en medicina, medioambiente e industria (Díaz, 2011).

Centrándonos en este estudio, las bacterias *Pseudomonas fluorescens* son organismos aeróbios, los cuales se caracterizan por tener un metabolismo basado en reacciones de oxidación-reducción con el fin de obtener energía, usando para ello sustancias oxidables a pH neutro o básico. Su tamaño suele ser de entre 0,5 y 0,8 μm . Las temperaturas óptimas a las que se reproducen oscilan entre los 25° y 30° C. Son bacterias muy propagadas, ya que poseen una gran capacidad para utilizar una gran variedad de nutrientes (Díaz, 2011).

Ambas bacterias son psicrótrofas y muy ubicuas, por este motivo se han escogido como modelo para evaluar las propiedades antimicrobianas de los aceites seleccionados.





Objetivos

2. OBJETIVOS.

2.1. Objetivos generales.

- ✓ Evaluar el potencial antioxidante y antimicrobiano de los aceites esenciales de hinojo, perejil y lavanda ecológicos, y el de lavanda convencional, en vistas a su posible aplicación para la conservación de los alimentos.

2.2. Objetivos parciales.

- ✓ Analizar la composición de los distintos aceites esenciales por medio de la cromatografía de gases.
- ✓ Determinar el Contenido de Fenoles Totales de los aceites esenciales.
- ✓ Determinar la actividad antioxidante de los aceites por diversos métodos.
- ✓ Estudiar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales frente a *Listeria innocua* CECT 910, *Pseudomonas fluorescens* CECT 844.



Materialles y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO DE LOS EXPERIMENTOS

3.1.1. Material vegetal.

Los aceites esenciales de hinojo (*Foeniculum vulgare*), perejil (*Petroselinum crispum*) y lavanda (*Lavandula officinalis*) con certificado de producción ecológica se de la empresa Herbes del Molí. La lavanda de cultivo convencional (*Lavandula officinalis*) se obtuvo de Plantapol, SL. No se localizaron aceites esenciales convencionales de hinojo y perejil con lo cual no se pudieron comparar los tres aceites ecológicos con su formato convencional comercial.

3.1.2. Sustancias químicas.

Se usaron diferentes sustancias químicas dependiendo del método analítico que se fuese a llevar a cabo: Hidroxitoluenobutilado (BTH), 2-2, difenil-1-picrylhidrazyl (DPPH), Reactivo de Folin-Ciocalteu, Ácido gálico, Cloruro de hierro III, Ácido tricloroacético (TCA) y Trolox, los cuales fueron traídos de la empresa química Sigma (Alemania). Fosfato dibásico de potasio, ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), carbonato de sodio y fosfato de sodio dibásico eran de Merck (Darmstadt, Alemania). Hexacianoferrato de potasio, era de FlukaBiochemika. El disolvente utilizado para la preparación de las soluciones estándar fue el metanol de grado HPLC, suministrado por Merck.

3.1.3. Preparación de las soluciones metanólicas a partir de los aceites esenciales.

Las soluciones metanólicas se realizaron a las concentraciones de 20, 15, 10 y 5 % para cada uno de los aceites esenciales a analizar:

- Hinojo ecológico
- Perejil ecológico
- Lavanda ecológica
- Lavanda convencional.

El disolvente empleado fue metanol, y las cantidades empleadas para conseguir las concentraciones deseadas se muestran a continuación:

Tabla 3: Soluciones metanólicas a partir de aceites esenciales:

Concentración (%)	Muestra (mL)	Metanol (mL)
20	2	10
15	1,5	10
10	1	10
5	0,5	10

Para la obtención de las soluciones metanólicas se tomaron 2; 1,5; 1 y 0,5 mL de las diferentes muestras de aceites esenciales de hinojo, perejil y lavanda ecológica y lavanda convencional con una pipeta y se depositaron en un tubo de ensayo, al que posteriormente se le añadieron 10 mL de metanol. Los tubos con la mezcla se agitaron vigorosamente para conseguir una mezcla uniforme.

Las determinaciones realizadas con las soluciones obtenidas fueron las siguientes:

- ❖ Metodología analítica:
 - ✓ Determinación de la composición de los aceites (GC/MS).
 - ✓ Determinación del Contenido de Fenoles Totales.
 - ✓ Determinación de la capacidad antioxidante.

- ❖ Determinación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales.
 - ✓ Inhibición de *Listeria innocua*.
 - ✓ Inhibición de *Pseudomonas fluorescens*.

3.2 METODOLOGÍA ANALÍTICA

3.2.1 Determinaciones de la composición de los aceites (GC/MS).

Cromatografía de Gases (GC)

Los aceites esenciales se analizaron usando un equipo Shimadzu GC-17 equipado con detector FID y una columna X5 TRACSIL Metal (Teknokroma, S.Coop. C. LTD, Barcelona, España; 30 m X 0,25 mm de diámetro, espesor de la película 0,25 μ m). Las temperaturas del inyector y del detector se fijaron en 250° C y 300° C, respectivamente. La temperatura del horno se mantuvo a 40° C durante 5 minutos; aumentando 3° C/min hasta llegar a los 200° C y se mantuvo durante 1 min, aumentando 15° C/min hasta 280° C y se mantuvo durante 10 minutos. El helio fue el gas portador, a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Las muestras fueron diluidas (1/10 ciclohexano, v/v) y 0,2 μ L fueron inyectados manualmente en el modo de split (relación de división 1/44). Los datos cuantitativos se obtuvieron electrónicamente de datos del área de FID sin utilizar los factores de corrección. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

Cromatografía de Gases- Espectrometría de Masas (GC-MS)

Los compuestos volátiles se aislaron, identificaron y cuantificaron en un cromatógrafo de gas Shimadzu GC-17A (Shimadzu Corporation, Kioto, Japón), junto con un detector de espectrómetro de masas Shimadzu (GC-MS QP-5050A). El sistema GC-MS estaba equipado con la misma columna utilizada en el análisis de GC y con el mismo programa de temperatura. Los análisis se llevaron a cabo utilizando helio como gas portador a una velocidad de flujo de 1 mL/min, a una relación de división de 1:10. Las muestras fueron diluidas (1/10 ciclohexano, v/v) y se inyectaron 0,2 μ L de los extractos. Los espectros de masas se obtuvieron por ionización de electrones (EI) a 70 eV, utilizando una gama espectral de 45 a 450 m/z.

La mayoría de los compuestos fueron identificados utilizando dos métodos de análisis diferentes:

- a) KI, Índices Kòvats en referencia al n-alcanos (C₈-C₃₂) (NIST, 2010); y
- b) Espectros de masas (sustancias químicas auténticas y colección de la biblioteca espectral Wiley). La identificación se considera provisional cuando se basa sólo en los datos del espectro de masas.

3.2.2 Determinación de Fenoles Totales.

El contenido de Fenoles Totales (TPC) fue determinado usando el reactivo de Folin-Cicalten (Singleton y Rossi, 1965).

Se tomaron volúmenes de 0,3 mL de las soluciones metanólicas de la máxima concentración (5%) de cada uno de los aceites esenciales a analizar, y se introdujeron en los tubos de ensayo. Seguidamente, se añadieron 10 mL de agua destilada a cada tubo y se agitaron vigorosamente. A continuación se agregaron 2,5 mL de Reactivo Folin-Cicalteau (diluido previamente 10 veces en agua destilada), se volvieron a agitar todos los tubos y se dejaron reposar 8 min. Transcurrido dicho tiempo, se introdujeron 2 mL de carbonato sódico (7,5 % w/v) en cada uno de los tubos, se agitaron, y se cubrieron con parafilm para ser incubados en un baño a 50°C durante 5 minutos.

La absorbancia se midió en un equipo HP 8451 a 760nm, y comparado con una curva de calibración de ácido gálico. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico. El ensayo se llevó a cabo por triplicado.

3.2.3 Determinación de la Capacidad Antioxidante.

3.2.3.1 Determinación de la actividad antioxidante usando 2,2'- difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) método de captación de radicales.

La actividad antioxidante de los aceites esenciales descritos anteriormente fue medida en términos de donación de Hidrógeno o capacidad de eliminación de radicales, utilizando el radical estable DPPH (Brad- Williams, Cuvelier y Berset, 1995).

Un volumen de 100 μL de las distintas soluciones metanólicas de las muestras obtenidas con los aceites esenciales, en las cuatro concentraciones (20, 15, 10, 5 g/L), fue puesto en tubos de ensayo, a los que se añadieron 2 mL 6×10^{-5} mol/L de solución metanólica de DPPH (0,006 gr de DPPH en 250 mL de Metanol). Las mezclas se agitaron en una centrífuga Vortex (2500 rpm) durante 1 minuto y fueron colocadas en una sala sin luz durante 30 minutos para evitar su degradación. La absorbancia se midió a 517 nm con un espectrofotómetro HP 8451 (Hewell Packard, Cambridge, Reino Unido). El metanol fue usado como muestra control para poner a cero el espectrofotómetro. La absorbancia del radical sin antioxidante fue utilizada como control. La cantidad de muestra necesaria para disminuir la absorción de DPPH en un 50% (IC50) se calculó gráficamente. La inhibición (en %) se representó frente a la concentración de la muestra en el sistema de reacción.

El porcentaje de inhibición del radical DPPH se calculó de acuerdo a la fórmula del Yen y Duh:

$$\% = [A_B - A_S / A_B] \times 100$$

donde: DPPH inhibición (%), A_B = absorbancia de la muestra control ($t= 0$ min) y A_S = absorbancia de la muestra analizada en el final de la reacción ($t= 30$ min).

3.2.3.2. Poder reductor del hierro (FRAP)

El poder reductor del hierro se determinó mediante el método cloruro férrico-ferrocianida de potasio (Oyaizu, 1986).

Se depositó 1 mL de distintas soluciones metanólicas de las muestras obtenidas de los aceites esenciales en sus diferentes concentraciones (20, 15, 10, y 5 g/L) en los tubos de ensayo y un blanco con metanol. Se añadieron a 2,5 mL de tampón fosfato (0,2 M, pH 6,6) y 2,5 ml de ferrocianida de potasio (1%). Las mezclas se incubaron a 50 °C durante 20 minutos, y seguidamente se adicionaron 2,5 mL de ácido tricloroacético (10%). Se tomó una parte de esta mezcla (2,5 mL) en otro tubo y se mezcló con 2,5 mL de agua destilada y 0,5 mL de tricloruro férrico (1%). Tras 30 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 700 nm con un espectrofotómetro HP 8451 (Hewell Packard, Cambridge, Reino Unido). El cero se

hizo con el blanco. El FRAP de la muestra se expresa en términos de capacidad antioxidante equivalente de Trolox. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado.

3.2.3.3 *Inhibición de la peroxidación lipídica de la yema de huevo tamponada por aceites esenciales (TBARS)*

Para la determinar la inhibición de la peroxidación lipídica, se utilizó el método de Darker et al., (2008) con algunas modificaciones.

Para ello, se añadieron 0,1 mL de las diferentes diluciones de aceites esenciales (20, 15, 10, 5 g/L) para mezclarlas a continuación con una emulsión compuesta con 2,5 g de yema de huevo en 100 mL de tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4) para obtener una concentración final de 25 g/L y 0,1 mL de Fe²⁺ (1 mM). Los tubos se incubaron en un baño a 37 °C durante 1 hora. Después de la incubación se le adicionó 0,5 mL de ácido tricloroacético (15%) recién preparado y 1mL de ácido tiobarbitúrico (1%), se agitaron los tubos en un vortex e incubaron en un baño a 100 °C durante 10 min. Inmediatamente después, se enfriaron los tubos en una bandeja con hielo, y posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos para que precipitaran las proteínas. La formación de TBARS se determinó midiendo el sobrenadante retirado de cada tubo con una micropipeta a una absorbancia de 532 nm con un espectrofotómetro HP 8451 (Hewell Packard, Cambridge, Reino Unido). Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado (excepto la lavanda ecológica). La muestra control se realizó por duplicado con el mismo procedimiento pero sustituyendo la muestra por metanol. El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = [A_C - A_S / A_C] \times 100$$

donde: A_C= absorbancia de la muestra control y A_S= absorbancia de la muestra analizada en el final de la reacción.

3.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES:

Los aceites esenciales fueron probados individualmente contra la *Listeria innocua* CECT 910; *Pseudomonas fluorescens* CECT 844. Estas especies fueron suministradas por la Colección Tipo de Cultura Española de la Universidad de Valencia.

3.3.1. Inhibición de *Listeria innocua*.

Para determinar la capacidad antibacteriana de los aceites esenciales se utilizó el método de difusión en disco de agar descrito por Tepe et al., (2005) con algunas modificaciones. Se prepararon las placas con un medio sólido, agar BHI (Sharlab, Sharlab SL, Barcelona, España) compuesto por caldo de infusión corazón y cerebro (37 g/L) con agar (15 g/L), y se llevó a una temperatura de 100° C. Seguidamente se embotelló el caldo y se introdujo en el autoclave a 121°C durante 15 min. Una vez terminado el proceso, se vertió el medio de cultivo en las diferentes placas y se llevó a cabo la siembra de la *Listeria innocua* (0,1 mL de 10⁶ CFU/mL). Discos de papel de filtro estéril, de 9 mm de diámetro (Schlinder y Schuell, Dassel, Alemania) se impregnaron con 40, 20, 10, 5 y 2 µL de los diferentes aceites esenciales puros y se colocaron en las placas inoculadas. Estas placas se incubaron a 37° C durante 24 horas. Los diámetros de las zonas de inhibición se midieron en milímetros. Todas las pruebas se realizaron por duplicado y se midieron al menos tres diámetros de halos de inhibición de cada disco.

3.3.2. Inhibición de *Pseudomonas fluorescens*.

Se llevó a cabo con el mismo procedimiento descrito anteriormente, exceptuando el medio de cultivo sólido sobre el que se inocula la *Pseudomona fluorescens*, que en este caso fue el agar nutritivo II (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra). Las placas se incubaron a 26° C durante 48 horas.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para el estudio de la actividad antioxidante y antibacteriana de los aceites esenciales se utilizó un procedimiento Multivariante Proc GLM (Modelo Lineal General). Para descubrir dónde había diferencias significativas entre los niveles del factor principal, fue aplicado el Test de Tukey (Afifi y Azen, 1979). Para la actividad antioxidante, se aplicó ANOVA con 2 factores (poder antioxidante: lavanda, hinojo, perejil y concentración: 20, 15, 10 y 5 g / L). Para la actividad antibacteriana, ANOVA se realizó con los siguientes factores: dosis (cinco niveles; 40, 20, 10, 5 y 2 μ L) para cada aceite esencial. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando SPSS® IBM® Statistics versión 23.0.0.0.





Resultados

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Resultados de la composición química de los aceites esenciales.

4.1.1. Resultados de la composición del aceite esencial de hinojo ecológico, perejil ecológico, lavanda ecológica y lavanda convencional.

En la **Tabla 4** se presenta la composición de los aceites esenciales (AEs) de las diferentes plantas aromáticas estudiadas, después de ser analizadas por GC-MS y comparar los espectros obtenidos con la librería de identificación del software y por comparación con el Índice de Kòvats. Se reflejan los porcentajes del área de cada compuesto respecto al área total del cromatograma determinado por la inyección en el GC/FID.

En los análisis de GC-MS de aceite esencial de hinojo ecológico se identificaron 17 constituyentes diferentes, representando el 100% del total de aceite: limoneno (26,44%) se encontró como el componente principal, anetol (23,5%) el segundo con mayor porcentaje y fenchona (21,68%) en tercera posición, como sustancias más significativas. α -felandreno y α -pineno fueron localizados en menores porcentajes (9,26% y 6,22%, respectivamente). Según los datos obtenidos por Viuda-Martos et al., (2011), en su investigación de aceites esenciales ecológicos procedentes de plantas de Egipto, se observa que *trans*-anetol (65,59%) es el compuesto predominante, seguido de metilchavicol (13,11%). Limoneno y fenchona fueron otros de los componentes identificados en los aceites esenciales de hinojo en menores cantidades (8,54% y 7,76%, respectivamente). Éste último fue muy similar al descrito por Telci, Demirtas y Sahin, (2009), para hinojo cultivado en Turquía, quienes describieron unos niveles más altos de *trans*-anetol y más bajos de metil-chavicol, limoneno y fenchona. Politeo, Jukié y Milos, (2006) en su estudio de la composición química de aceites esenciales de 12 plantas diferentes procedentes de Croacia, encontraron que el aceite esencial de hinojo estaba compuesto en un 77,6 % de *trans*-anetol, coincidiendo con Viuda-Martos et al., (2011) y Telci et al., (2009), seguido de un 12,4% de fenchona. En comparación con otro estudio de la Universidad de Valladolid, por Cerpa-Chávez, (2007), se observa que el *trans*-anetol es el componente mayoritario del aceite. La fenchona, el α -pineno, el metil-chavicol, el α -felandreno y el d-limoneno son los compuestos secundarios del aceite.

Tabla 4. Composición química de aceites esenciales de hinojo ecológico (*Foeniculum vulgare*), perejil ecológico (*Petroselinum crispum*), lavanda ecológica (*Lavandula officinalis*) y lavanda convencional, porcentajes relativos del área total e índice de Kòvats.

Composición	Id. ¹	Índice de kovats		<i>Foeniculum vulgare</i> (% área)	<i>Petroselinum crispum</i> (% área)	<i>Lavandula officinalis</i> (% área)	<i>Lavanda Convencional</i> (% área)
		KI	Lit ²				
α - tujeno	KI,W	920	923	0,14	0,15	0,07	-
α -pineno	KI,W	927	933	6,22	15,47	0,26	0,21
Canfeno	KI,W	939	952	0,59	0,1	0,25	0,24
Sabineno	KI,W	966	973	0,14	-	-	0,68
β - pineno	KI,W	968	980	2,04	-	0,05	0,17
Acetato de nerilo	KI,W	969	1365	-	10,41	-	-
Octan-3-ona	KI,W	980		-	-	1,35	0,71
Mirceno	KI,W	985	991	2,27	0,47	0,62	0,06
α - felandreno	KI,W	997	1005	9,26	0,11	-	-
Cisocimeno	KI,W	1001	1040	-	-	0,09	-
Acetato de hexilo	KI,W	1008	1162	-	-	0,65	0,35
α - terpineno	KI,W	1009	1018	-	0,05	-	-
Para-cimeno	KI,W	1018	1027	2,48	0,24	0,14	-
1,8-cineol	KI,W	1023	1039	-	-	1,71	6,08
Sabineno	KI,W	1023	976	-	4,73	-	-
Limoneno	KI,W	1026	1031	26,44	-	-	-
Cisocimeno	KI,W	1033	1040	1,6	-	-	1,7
Transocimeno	KI,W	1043	1050	0,5	-	5,05	1,37
γ - terpineno	KI,W	1052	1062	0,34	0,31	0,09	-
β - ocimeno	KI,W	1043	1062	-	-	3,44	-
Cis óxido de linalol	W	1067	1088	-	-	0,12	0,15
Terpinoleno	KI,W	1080	1084	-	0,07	0,07	0,15
Trans óxido de linalol	W	1083	1088	-	-	-	0,1
Para-cimenil	KI,W	1084		-	0,21	-	-

Composición	Id. ¹	Índice de kovats		<i>Foeniculum vulgare</i> (% área)	<i>Petroselinum crispum</i> (% área)	<i>Lavandula officinalis</i> (% área)	<i>Lavanda Convencional</i> (% área)
		KI	Lit ²				
Fenchona	KI,W	1084	1094	21,68	-	-	-
Linalol	W	1105	1098	-	-	34,44	39,78
3-acetato de octilo	KI,W	1119		-	-	0,12	-
Neo-allo-ocimeno	KI,W	1125		-	-	0,23	0,09
Alcanfor	KI,W	1137	1143	0,43	-	0,31	5,59
Hexil isobutirato	KI,W	1143		-	-	0,05	0,18
Trans-sabineno hidrato	KI,W	1177	1097	0,18	-	2,43	0,13
Criptona	KI,W	1180		-	-	-	0,14
Butirato de hexilo	KI,W	1187	1191	-	-	0,41	0,51
Mirtenal	W	1188	1193	-	0,17	-	-
Chavicol de metilo	W	1194	1196	2,19	-	-	-
α- terpineol	KI,W	1198	1185	-	-	1	0,51
Bornilo acetato	KI,W	1221	1285	-	-	0,19	0,09
Hexil-2-metilbutirato	KI,W	1231		-	-	-	0,14
Hexil isovalerato	KI,W	1237	1245	-	-	-	0,12
Acetato de linalilo	KI,W	1254	1257	-	-	34,19	35,51
Acetato de nerilo	KI,W	1254	1365	-	-	-	-
Felandral	KI,W	1270		-	0,09	-	-
Bornilo acetato	KI,W	1279	1285	-	-	0,19	-
Lavandulilo acetato	KI,W	1284	1289	-	-	4,08	1,18
Anetol	KI,W	1288		23,5	-	-	-
N-butiltiglato	KI,W	1326		-	-	-	0,25
Nerol	KI,W	1356	1228	-	-	0,33	-
Acetato de nerilo	KI,W	1358	1365	-	-	-	0,28
Calareno	KI,W	1374		-	0,09	-	-
Geranil acetato	KI,W	1376	1383	-	-	0,49	0,53
Hexilcaproato	KI,W	1381		-	-	0,1	0,07

Composición	Id. ¹	Índice de kovats		<i>Foeniculum vulgare</i> (% área)	<i>Petroselinum crispum</i> (% área)	<i>Lavandula officinalis</i> (% área)	<i>Lavanda Convencional</i> (% área)
		KI	Lit ²				
Transcariofileno	KI,W	1414	1430	-	0,07	3,83	1,22
α - farneseno	KI,W	1429		-	-	0,09	-
β -farneseno	KI,W	1449	1458	-	0,19	3,08	0,6
Germacreno D	W	1470	1480	-	0,05	0,39	0,33
Propionato de geranilo	KI,W	1500	1475	-	-	-	0,28
α -amorfeno	KI,W	1509	1506	-	-	0,07	0,1
Miristicina	KI,W	1528	1520	-	36,09	-	-
Elemicin	KI,W	1550	1554	-	2,74	-	-
β -copaen-4-ol	KI,W	1562		-	0,15	-	-
Óxido de cariofileno	KI,W	1578	1573	-	-	0,21	-
Alitetrametoxibenzeno	KI,W	1590	1591	-	6,45	-	-
Junipene	KI,W	1598		-	0,66	-	-
Apiol	KI,W	1684	1622	-	20,93	-	-

¹“KI, W” significa que la identificación se basó en Índices de Kovats y se comparó con la biblioteca Wiley. Compuestos “KI” identificados tentativamente basados en Índices de Kovats, compuestos “W” identificados tentativamente (Wiley fue la única biblioteca utilizada para la identificación). ² Base de datos NIST.

Como se puede observar con los datos expuestos anteriormente existe una gran variabilidad de composición entre los AEs a pesar de pertenecer al mismo género y especie, tal y como se muestra en la literatura científica. Esta diversidad puede atribuirse a numerosas causas empezando por las condiciones climáticas a las que estén sometidas las plantas, el momento en el que se lleva a cabo la recolección y la región geográfica en la que se encuentran, el agua disponible, la altura sobre el nivel del mar, las posibles enfermedades causadas por insectos y hongos, la parte de la planta usada para la obtención del aceite esencial, el secado, almacenamiento post-cosecha o el método utilizado para obtener el AE, según Viuda-Martos et al., (2008). Burt, (2004), demostró que la composición química de los AEs depende principalmente de la temporada en la que se produzca la recolección y la localización geográfica en la que se lleve a cabo su producción. No disponemos de información sobre parámetros fitotécnicos, por tanto, se asume que al tratarse de aceite obtenido de plantas de cultivo ecológico destinadas a la obtención de aceite para comercializar, la empresa cuenta con procedimientos estandarizados de cultivo y manipulación para minimizar las diferencias entre diferentes cosechas, pese a lo cual, algunos factores, como la climatología no son controlables.

Por tanto, y según los resultados obtenidos en el análisis químico del AE de hinojo, 4 de los componentes mayoritarios son *trans*-anetol, fenchona, metil-chavicol y limoneno, los cuales según Burt, (2004) son compuestos fenólicos que están presentes de manera natural en especies como el orégano y el tomillo; éstos presentan actividad antimicrobiana en ciertos microorganismos de interés en alimentos. Básicamente, su mecanismo de acción consiste en cambiar la permeabilidad de la membrana citoplasmática provocando la salida del material intracelular y por consiguiente provocando la muerte de los microorganismos.

En el aceite esencial de perejil ecológico se identificaron 24 compuestos químicos diferentes, representando el 100% del total del aceite. Este aceite esencial fue caracterizado por la presencia dominante de 4 sustancias: miriscitina en un 36,09%, apiol en un 20,93%, α -pineno en un 15,47% y nerilacetato en un 10,41%. Seguido de éstos, en proporciones menores, aparecen el allitetrametoxibenceno, sabieno y elemicina (6,45%, 4,73% y 2,74%, respectivamente). El perfil obtenido en este estudio fue muy similar al descrito por Zhang, Chen, Wang y Yao, (2006) donde el componente mayoritario fue miristicina (32,75%), apiol (17,54%), α -pineno (16,64%) y β -pineno (11,54%), hallazgos que están de acuerdo con los resultados presentados aquí, pero en diferentes concentraciones. Viuda et al., (2011) investigaron un aceite

esencial ecológico proveniente de Egipto, en el que localizaron que los principales componentes eran apiol (46,46%), α -pineno (22,21%), y β -pineno (16,06%). Así mismo, según Reider-Vicanco, Enrique-León, Américo-Castro, Norma, Ramos, (2012) el aceite esencial de perejil procedente de Lima, manifestó estar conformado por los siguientes componentes químicos: 1R- α -pineno, β -pineno, β -felandreno, p, α -dimetil estireno, 1,3-benzodioxole- 4-metoxi-6-(2-propenyl), (G)-2-catem-4-ol y 1,3-benzodioxole, 4,7-dimetoxi-5-(2-propenyl) conocido también como apiol. A modo de resumen se puede observar que los resultados obtenidos son similares en la mayoría de los estudios, en diferentes concentraciones.

En cuanto a la lavanda ecológica, en su aceite esencial fueron identificados 36 componentes diferentes, siendo su compuesto predominante el linalol (34,44%) seguido del acetato de linalilo (34,19%), y en porcentajes mucho más inferiores otros tales como *trans*-o-cimene (5,05%), acetato lavandulilo (4,08%), *trans*-cariofileno (3,83%), β -o-cimeno (3,44%) y β -farneseno (3,03%). Comparando estos resultados con los de Viuda et al., (2011), podemos observar que coinciden en los componentes principales, variando la proporción (39,83% de linalol y 32,11% acetato de linalilo). El siguiente compuesto mayoritario en el estudio del AE de esta lavanda originaria de Egipto fue el alcanfor (11,29%) y beta-felandreno (7,63%). Hassiotis, Tarantilis, Daferera y Polissiou, (2010) refirieron que los principales componentes de las plantas nativas de lavanda cultivadas en Grecia, que fueron linalol (20,1%) y acetato de linalilo (13,3%), coincidiendo también con Viuda et al., (2011). En general, se observa una coincidencia en los componentes principales aunque los porcentajes relativos son diferentes, en especial con las muestras griegas.

En el análisis del aceite esencial de la lavanda convencional, se obtuvieron 35 sustancias diferentes en su composición, siendo dos de ellas más significativas que el resto. Con un 39,78% se encontró linalol y con un 35,51% acetato de linalilo. Los compuestos principales coinciden con la lavanda ecológica descrita anteriormente, y con las referencias bibliográficas citadas. Aunque los porcentajes de estos dos compuestos son mayores en la lavanda no ecológica no podemos atribuir estas diferencias a la producción orgánica o convencional, ya que el contenido de sus componentes es muy variable, dependiendo éste de muchos factores tales como la especie, manejo del cultivo y condiciones climáticas a las que se exponen las plantas, Shellie et al., (2002).

4.2 Resultados del Contenido Total de Fenoles.

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios presentes en las plantas que poseen en común un anillo aromático o uno o más grupos hidroxilo unido a éste. Estos compuestos se dividen en varios subgrupos, como son los fenoles, ácidos fenólicos, fenilpropanoides, flavonoides, taninos y quinonas (Harbone, 1998; Strack, 1997). Se ha demostrado que muchos de estos compuestos naturales poseen diversas funciones, entre ellas, propiedades antioxidantes (Maestri et al., 2006).

Tabla 5. Contenido total de fenoles (TPC) de aceites esenciales de hinojo ecológico (*Foeniculum vulgare*), perejil ecológico (*Petroselinum crispum*), lavanda ecológica (*Lavandula officinalis*) y lavanda convencional.

Aceite esencial	Fenoles Totales *EAG / (mg/L)
<i>Foeniculum vulgare</i> ecológico	262.59 ^c ±15.5
<i>Petroselinum crispum</i> ecológico	388.35 ^d ±21.7
<i>Lavandula officinalis</i> ecológica	137.52 ^b ±38.3
<i>Lavandula officinalis</i> convencional	88.94 ^a ±9.65

* Equivalente a Ácido Gálico (mg/L).

Los valores seguidos por la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) según el Test de Rango Múltiple de Tukey.

Tal como se observa en la **Tabla 5**, los resultados del análisis del contenido de Fenoles Totales para los aceites esenciales de hinojo ecológico (*Foeniculum vulgare*), perejil ecológico (*Petroselinum crispum*), lavanda ecológica (*Lavandula officinalis*) y lavanda convencional, nos hacen percibir que existen diferencias significativas entre ellos. El AE de perejil ecológico mostró el mayor contenido en Fenoles Totales (388,35 mg EAG/L). Seguido de éste fue el AE de hinojo ecológico, con valores de 262,59 mg EAG/L. Por último, los AEs que presentaron menor presencia de Fenoles Totales fueron los de lavanda, aunque cabe destacar que el cultivo ecológico presenta un contenido en Fenoles Totales mayor que el convencional (137,52 y 88,94 mg EAG/L, respectivamente). Viuda et al., (2011) también demostraron que el perejil ecológico originario de Egipto presentó un contenido de Fenoles Totales con resultado muy similar al obtenido en nuestro estudio, (370,32 mg EAG/L), coincidiendo también con el de lavanda ecológica (140,33 mg EAG/L). La presencia de Fenoles Totales en el AE de hinojo ecológico de Egipto presenta más discrepancia con respecto a los resultados

obtenidos en nuestra investigación, siendo mayores en el hinojo ecológico de Herbes del Molí.

También se conocen varios estudios relativos a la composición de fenoles en muestras de aceite esencial de hinojo, los cuales provienen de diferentes países (Italia, Irán, Finlandia y Portugal). Por ejemplo, el aceite esencial de hinojo de procedencia española, mostró un contenido en fenoles totales de 42,16 mg EAG/g de extracto, el cual resultó mucho mayor que el obtenido en el resto de aceites, excepto en el aceite esencial de hinojo italiano, con un contenido de 80 mg EAG/g de extracto (Barros et al., 2009; Motamed y Naghibi, 2010; Hinneburg et al., 2006; Conforti et al., 2009).

Las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos han sido estudiadas en diferentes investigaciones, y juegan un papel muy importante en la estabilidad de los productos alimenticios, así como en los mecanismos de defensa antioxidante de los sistemas biológicos. (Nijveldt et al., 2001).

El contenido de compuestos fenólicos presentes en el material vegetal podría ser usado como un importante indicador en la capacidad antibacteriana y antioxidante de los alimentos funcionales, y podría incluirse como una fuente natural de antioxidantes sustitutivos de los aditivos químicos en diversos alimentos. Se considera que la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos es debido a sus altos potenciales redox, donación de átomos de hidrógeno e interrupción de las reacciones de oxidación. (Velioğlu et al., 1998; Osawa et al., 1994).

4.3 Resultados de la Capacidad Antioxidante de los Aceites Esenciales.

4.3.1 DPPH.

La actividad antioxidante de los aceites esenciales hinojo ecológico (*Foeniculum vulgare*), perejil ecológico (*Petroselinum crispum*), lavanda ecológica (*Lavandula officinalis*) y lavanda convencional se midió con métodos de donación de hidrógeno o de su capacidad de secuestrar radicales, usando el radical estable DPPH. Este radical libre no necesita ninguna preparación específica y este método se caracteriza por ser una técnica sencilla y muy rápida para comprobar la existencia de propiedades antioxidantes en las sustancias a estudiar.

En la **Tabla 6** se muestran las concentraciones efectivas de cada uno de los aceites esenciales para captar radicales DPPH y los valores de captación, y por tanto, de inhibición de la oxidación del radical. Se puede observar que los aceites esenciales analizados presentan diversos grados de capacidad de captación.

Los resultados obtenidos para el AE de perejil ecológico presentaron una mayor efectividad ($p < 0,05$) en el secuestro de radicales DPPH en todas las concentraciones analizadas, siendo más bajos que los observados para los controles BHT. Seguido de éste se mostró el AE de lavanda ecológica, existiendo diferencias significativas respecto a los dos aceites restantes en las concentraciones más altas (10, 15 y 20 g/L). A bajas concentraciones (5 g/L) no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) para los AEs de lavanda ecológica, hinojo ecológico y lavanda convencional. Tampoco se apreciaron diferencias en ninguna de las concentraciones entre los AEs de hinojo ecológico y lavanda convencional. Tanto en el AE de perejil ecológico como en el de lavanda ecológica, aparecen diferencias significativas entre las distintas concentraciones estudiadas, aumentando su poder de inhibición de manera notable conforme aumenta la concentración del aceite. En cambio, en el AE de hinojo se observan diferencias significativas a bajas concentraciones (5 y 10 g/L) y no se aprecian en las más altas, y en el AE de lavanda convencional no hay diferencias entre las concentraciones de 5 y 20 g/L, ni entre 15 y 20 g/L, pero sí entre las más bajas y las más altas. Viuda et al., (2011) en su estudio de AEs originales de Egipto, obtuvieron resultados muy similares, siendo el perejil ecológico el que mayor poder antioxidante por capacidad de secuestro de radicales DPPH presentó en todas sus concentraciones (5,10,20,50 g/L), seguido de la lavanda ecológica, y siendo los valores más bajos para el hinojo ecológico.

La concentración de AE necesario para inhibir el 50% del radical DPPH, o lo que es lo mismo, los valores de IC_{50} de los diferentes AEs que se presentan en la tabla, siguieron el siguiente orden: BHT (0,53 g/L) > AE de lavanda convencional (11,94 g/L) > AE de perejil ecológico (12,91 g/L) > AE de lavanda ecológica (31,30 g/L) > AE de hinojo ecológico (45,89 g/L). A menor valor de IC_{50} menor concentración de aceite se precisa para inhibir el radical y, por tanto, mayor efecto inhibitorio.

Tabla 6. La actividad antioxidante de los aceites esenciales de hinojo ecológico (*Foeniculum vulgare*), perejil ecológico (*Petroselinum crispum*), lavanda ecológica (*Lavandula officinalis*) y lavanda convencional utilizando las concentraciones correspondientes (A = 5 g/L, B = 10 g/L, C = 15 g/L, D = 20 g/L) medido por el método DPPH.

	% Inhibición DPPH				
	A	B	C	D	IC ₅₀
<i>Foeniculum vulgare</i>	11.24 ^{aA} ±0.80	14.99 ^{bA} ±1.12	21.88 ^{cA} ±4.25	21.17 ^{cA} ±2.20	45.89*
<i>Petroselinum crispum</i>	2887 ^{aB} ±0.61	44.22 ^{bC} ±0.55	53.34 ^{cC} ±1.87	64.28 ^{dC} ±1.45	12.91*
<i>Lavandula officinalis</i>	13.07 ^{aA} ±1.15	19.60 ^{bB} ±1.00	28.32 ^{cB} ±2.55	33.54 ^{dB} ±1.03	31.30
<i>Lavandula officinalis c</i>	11.50 ^{aA} ±1.29	12.16 ^{aA} ±2.10	17.32 ^{bA} ±2.15	17.38 ^{bA} ±1,38	11.94
BHT	95.41±0.28 ^{aC}	96.33±1.02 ^{aD}	96.98±0.51 ^{aD}	97.43±0.93 ^{aD}	0.53

*IC₅₀: Concentración (g/L) para 50% de inhibición.

Los valores seguidos por la misma letra minúscula dentro de la misma línea no son significativamente diferentes ($p>0.05$) según el Test de Rango Múltiple de Tukey.

Los valores seguidos por la misma letra mayúscula dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p>0.05$) según el Test de Rango Múltiple de Tukey.

El método DPPH, como se ha explicado anteriormente, mide la capacidad de la muestra para donar Hidrógeno al radical DPPH, lo que resulta en el blanqueo de la solución de DPPH. Cuanto mayor sea el blanqueo, mayor capacidad antioxidante presentará el aceite, lo que se reflejará en un IC₅₀ inferior, según Lim, Lim y Tee (2006).

Según un estudio realizado por Djeridane et al., (2006), suele existir una correlación lineal entre el Contenido de Fenoles Totales (CFT) y la capacidad antioxidante. En nuestro caso, no se cumple del todo con la teoría. En algunos casos, los resultados obtenidos en el CFT para nuestros aceites y los obtenidos en el método DPPH son lineales, pero por ejemplo, el hinojo presentó un alto contenido en fenoles totales y su capacidad de inhibición del radical DPPH es la menor de todos. Por otro lado, es el aceite de perejil ecológico el que mayor actividad antioxidante presenta y también elevado contenido en fenoles totales. Esto implica que no siempre la relación sería lineal entre CFT y capacidad de inhibición del radical DPPH. Esta correlación entre CFT y capacidad de inhibición del DPPH es posible que se cumpla, al comparar extractos de la misma especie vegetal, pero no siempre cuando se comparan especies diferentes, dado que no solo afecta el contenido total sino también el perfil de componentes de la fracción fenólica.

También se observa que los aceites esenciales ecológicos presentan mayor poder antioxidante que los convencionales según los resultados obtenidos en esta prueba.

Según el estudio realizado por Faller y Fialho, (2010) donde analizaron la capacidad antioxidante de diferentes frutas y hortalizas, cultivadas de manera ecológica y convencional a través de este método, llegaron a la conclusión de que dicha capacidad antioxidante tendió a ser mayor en las plantas cultivadas a través de la agricultura orgánica, presentando mayores concentraciones en las partes de la planta más expuestas al medio ambiente. Sin embargo, realizando el estudio de manera más profunda los resultados mostraron perfiles diferenciados según el alimento. En verduras y hortalizas, y en la piel de las frutas presentaron más capacidad antioxidante las cultivadas de manera ecológica, y en la pulpa de las frutas predominó más la capacidad antioxidante en el método de cultivo convencional. Según las partes de las plantas analizadas, estos parámetros pueden variar mucho debido a alteraciones en las diferentes prácticas a la hora de cultivarlas.

Por otro lado, según la investigación llevada a cabo por Kouřimská, L.A, Sabolová, M.b, Dvořáková, B.A., Roubíčková, I.B, Pánek, y J.b, Nový, P.a., (2014) en la que se estudió la actividad antioxidante de hierbas *Lamiaceae* cultivadas en agricultura ecológica y convencional, por su poder antioxidante y su uso en la industria alimentaria, se llegó a la conclusión de que dos especies de orégano (*Origanum vulgare* L. y *Origanum heracleoticum* L.) y hierbabuena (*Mentha spicata* L.) cultivadas de manera ecológica no mostraron una actividad antioxidante más alta estadísticamente significativa que las cultivadas convencionalmente.

4.3.2 FRAP

El método FRAP o Capacidad de Reducción del ión hierro es un método muy sencillo, rápido y económico. Se basa en la determinación de la capacidad reductora de los aceites del complejo férrico/ferricianina a la forma ferrosa (Oyaizu, 1986). En la **Tabla 7** se observa la capacidad de reducción del ion férrico (Fe^{+3}), en términos de concentración equivalente al Trolox (TEAC) de los AEs de hinojo ecológico (*Foeniculum vulgare*), perejil ecológico (*Petroselinum crispum*), lavanda ecológica (*Lavandula officinalis*) y lavanda convencional. Del mismo modo que en los métodos

estudiados anteriores, se observa una relación dependiente de la concentración a la que se presentan dichos aceites, a mayor concentración de aceite presente en la reacción, mayor capacidad reductora, aunque cabe destacar que en los aceites esenciales de lavanda, tanto ecológico como convencional, no se aprecian diferencias significativas entre las concentraciones 20 y 50 g/L en ecológico, y entre 10 y 20 g/L en convencional.

El AE de perejil ecológico fue el que mostró los valores más elevados ($p < 0,05$) en la capacidad de reducir el ión férrico en términos de concentración equivalente al Trolox, con valores comprendidos entre 0,4 y 0,93 mM/L Trolox, en todas las concentraciones en las que se llevó a cabo el ensayo, con diferencias estadísticas con el BHT control. Seguidamente fueron el AE de hinojo ecológico (con valores de 0,19 a 0,27 mM/L Trolox) y de lavanda ecológica (0,14 a 0,24 mM/L Trolox), respectivamente. Todo lo contrario de lo que ocurrió con el AE de lavanda convencional, el cual manifestó los valores más bajos ($p < 0,05$) en la capacidad de reducir el ion férrico si se compara con los otros AE estudiados, con valores de 0,07 a 0,19 mM/L Trolox. Aparecen diferencias significativas entre las diferentes muestras de AE, con excepción AE de lavanda ecológica y convencional en sus concentraciones de 10 g/L y 50 g/L. Para la determinación de la capacidad antioxidante por FRAP sí se cumple que a mayor contenido en fenoles totales mayor capacidad antioxidante.

Tabla 7. La actividad antioxidante de hinojo ecológico (*Foeniculum vulgare*), perejil ecológico (*Petroselinum crispum*), lavanda ecológica (*Lavandula officinalis*) y lavanda convencional utilizando las concentraciones correspondientes (A = 5 g/L, B = 10 g/L, C = 20 g/L, D = 50 g/L) medido por el método FRAP.

	FRAP			
	TEAC* (mmol/L Trolox)			
	A	B	C	D
<i>Foeniculum vulgare</i>	0.19 ^{aC} ±0.01	0.26 ^{bB} ±0.03	0.31 ^{cC} ±0.01	0.37 ^{dB} ±0.02
<i>Petroselinum crispum</i>	0.40 ^{aD} ±0.00	0.56 ^{bC} ±0.07	0.82 ^{cD} ±0.06	0.93 ^{dC} ±0.07
<i>Lavandula officinalis</i>	0.14 ^{aB} ±0.02	0.18 ^{bA} ±0.02	0.23 ^{cB} ±0.02	0.24 ^{cA} ±0.01
<i>Lavandula officinalis c</i>	0.07 ^{aA} ±0.01	0.15 ^{bA} ±0.03	0.16 ^{bA} ±0.03	0.19 ^{cA} ±0.05
BHT	2.08±0.05 ^{aE}	2.57±0.09 ^{bD}	2.94±0.06 ^{cE}	3.39±0.05 ^{dD}

* (TEAC): Capacidad antioxidante equivalente Trolox.

Los valores seguidos de letras minúsculas dentro de la misma línea no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) según el Test de Rango Múltiple de Tukey.

Los valores seguidos de letras mayúsculas dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) según el Test de Rango Múltiple de Tukey.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Viuda et al., (2011) en los que se muestra que el AE de perejil ecológico obtuvo los valores altos de actividad antioxidante en todas las concentraciones (en este caso de 5, 10, 20 y 50 g/L) usando este método, en nuestro caso seguidos por la actividad del hinojo ecológico y lavanda ecológica que presentaron los valores más bajos.

Comparando el AE de lavanda convencional, observamos un estudio elaborado por Martucci, Gende, Neira y Ruseckaite, (2015), en que añaden aceite a films comestibles y estudian su capacidad antioxidante, obtienen valores de FRAP en films superiores a los de nuestro estudio en aceite, su capacidad antioxidante es concentración dependiente, al igual que en nuestro estudio y no refieren valores absolutos para el aceite por lo que no podemos realizar una comparación directa de resultados.

4.3.3 TBARS

Este método se caracteriza por ser muy sensible, requiere pequeñas cantidades de muestras y presenta una elevada correlación con el comportamiento en muestras reales, es decir, se pueden obtener datos de aplicaciones reales. Daker et al., (2008) señalaron que el método del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) se emplea para determinar la cantidad de productos secundarios de la oxidación lipídica (malonaldehído) presentes en los aceites. Durante esta oxidación se producen varios compuestos primarios de oxidación (fundamentalmente hidroperóxidos) los cuales se van transformando, y como consecuencia, originando nuevos compuestos (secundarios). El malonaldehído, reacciona con el ácido 2-tiobarbitúrico y forma un compuesto rosado que puede medirse en un espectrofotómetro. El ensayo de TBARS se llevó a cabo para determinar la capacidad los AEs para inhibir la peroxidación de fosfolípidos presentes en la yema de huevo comparándolo con la capacidad de BHT.

La **Tabla 8** muestra los resultados obtenidos para los AEs hinojo ecológico (*Foeniculum vulgare*), perejil ecológico (*Petroselinum crispum*), lavanda ecológica (*Lavandula officinalis*) y lavanda convencional para inhibir la formación de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), metabolito secundario de la oxidación lipídica. Todos los AEs analizados presentaron un alto porcentaje de inhibición de TBARS, excepto el AE de perejil ecológico que mostró una actividad pro-oxidante a concentraciones superiores a 5g/L, ya que en ocasiones los fenoles pueden actuar

como pro-oxidante reduciendo los iones de metales de transición. Dicha inhibición no se produjo de forma dependiente respecto a la concentración. No se observaron diferencias significativas a medida que aumentaba su presencia. Además tampoco aparecen diferencias entre el AE de hinojo ecológico y lavanda convencional. En cambio el AE de lavanda ecológica presentó mayor capacidad de inhibición de la formación de radicales de la oxidación medidos como TBARS. Es el aceite que mayor contenido de fenoles mostró entre todas las muestras. Todos los aceites estudiados fueron agentes de barrido de radicales menos eficaces que el BHT usado como referencia, que obtuvo valores superiores al 90 %.

Viuda et al., (2011) en su estudio de AEs ecológicos procedentes de Egipto, llegaron a la conclusión de que a bajas concentraciones la capacidad de inhibición peroxidación lipídica era reducida, sin demasiado poder, pero a medida que las concentraciones iban incrementándose, su capacidad para inhibir dicha peroxidación se fue haciendo más significativa, principalmente en el AE de lavanda. Éste aceite obtuvo el mayor % de inhibición, existiendo diferencias significativas respecto a la referencia (BHT). Fue seguido por el hinojo y el perejil, que mostró actividad pro-oxidante a concentraciones superiores a 5 g/L de aceite esencial. De nuevo vemos que el contenido en fenoles totales no se correlaciona con los resultados de TBARS, al igual que sucedía con la inhibición del radical DPPH.

Tabla 8. Actividad antioxidante de aceites esenciales de hinojo ecológico (*Foeniculum vulgare*), perejil ecológico (*Petroselinum crispum*), lavanda ecológica (*Lavandula officinalis*) y lavanda convencional utilizando las concentraciones correspondientes (A = 5 g/L, B = 10 g/L, C = 20 g/L, D = 50 g/L) medidos mediante el ensayo TBARS.

	% Inhibición TBARS			
	A	B	C	D
<i>Foeniculum vulgare</i>	51.06 ^{ab} ±1.04	53.24 ^{aA} ±1.98	51.46 ^{aA} ±1.37	52.35 ^{ab} ±1.50
<i>Petroselinum crispum</i>	12.33 ^A ±16.81			
<i>Lavandula officinalis</i>	61.52 ^{aC} ±0.21	60.38 ^{ab} ±2.42	57.50 ^{ab} ±1.19	56.91 ^{ab} ±3.15
<i>Lavandula officinalis c</i>	52.01 ^{ab} ±1.89	54.04 ^{aA} ±2.25	47.50 ^{aA} ±6.55	46.36 ^{aA} ±3.15
BHT	84.85±0.02 ^{aC}	87.32±0.08 ^{bC}	89.21±0.16 ^{cC}	90.75±0.10 ^{dC}

--- actividad pro-oxidante

Los valores seguidos por la letra minúscula dentro de la misma línea no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) según el Test de Rango Múltiple de Tukey.

Los valores seguidos por la letra mayúscula dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) según el Test de Rango Múltiple de Tukey.

4.4 Resultados de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales.

4.4.1 *Listeria innocua* y *Pseudomonas fluorescens*.

El objetivo de estos estudios fue la determinación de la actividad antibacteriana (mediante el empleo de la técnica de difusión en disco) de los AEs obtenidos de hinojo ecológico, perejil ecológico, lavanda ecológica y lavanda convencional, frente a dos bacterias relacionadas con el deterioro de alimentos o indicadoras del mismo, *Listeria innocua* CECT 910 y *Pseudomonas fluorescens* CECT 844.

La **Tabla 9** muestra la inhibición del crecimiento bacteriano obtenido para cada uno de los AEs analizados a diversas concentraciones.

Como puede observarse, el aceite esencial que presentó un mayor halo de inhibición bacteriana para *Listeria innocua* fue la lavanda ecológica, que resultó sensible a dicho AE a concentraciones más altas (de 40 y 20 %) con 17 y 13,25 mm respectivamente. En el caso del AE de perejil ecológico, presentó actividad antibacteriana sobre *Listeria innocua* en cuatro de las cinco concentraciones analizadas. Seguidamente, fueron los AEs de lavanda convencional e hinojo ecológico los que inhibieron a *Listeria innocua* solamente a concentraciones altas de aceite.

Es importante resaltar que ninguno de los aceites esenciales analizados presentó actividad antibacteriana frente a las cepas de *P. fluorescens*. Se trata de una bacteria Gram-negativa, cuya sensibilidad a los aceites esenciales suele ser menor a la de las bacterias Gram-positivas como *L. innocua*.

A pesar de que diversos autores han demostrado que los AEs poseen una gran actividad antibacteriana, el motivo por la que ésta se produce todavía no se conoce, no por completo. Esta actividad puede que sea provocada por la composición química de los aceites esenciales, es decir, por las sustancias principales que los conforman y sus características, o también a un efecto sinérgico entre compuestos que se hallan en menor proporción, o a correlaciones entre los compuestos principales y los de menor concentración, tal y como establece Carović-Stanko et al., (2010). Al igual que se desconoce cuál es el compuesto responsable de provocar la actividad antibacteriana en los aceites, tampoco se conoce el método por el que se obtiene esta cualidad.

Tabla 9. Efecto de la concentración (CE) de aceites esenciales de hinojo ecológico (*Foeniculum vulgare*), perejil ecológico (*Petroselinum crispum*), lavanda ecológica (*Lavandula officinalis*) y lavanda convencional.

Aceite esencial	*Dosis (%)	‡ Diámetro de la zona de inhibición (mm) incluyendo el diámetro de disco de 9 mm	
		<i>Listeria innocua</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Foeniculum vulgare</i>	40	10.75 ^b ±0.35	N.A.
	20	5.50 ^a ±1.77	N.A.
	10	N.A.	N.A.
	5	N.A.	N.A.
	2	N.A.	N.A.
<i>Petroselinum crispum</i>	40	11.42 ^b ±0.11	N.A.
	20	11.16 ^b ±0.05	N.A.
	10	10.25 ^b ±0.00	N.A.
	5	10.20 ^b ±0.35	N.A.
	2	N.A.	N.A.
<i>Lavandula officinalis</i>	40	17.00 ^d ±0.00	N.A.
	20	13.25 ^c ±1.77	N.A.
	10	N.A.	N.A.
	5	N.A.	N.A.
	2	N.A.	N.A.
<i>Lavandula officinalis C</i>	40	11.00 ^b ±0.00	N.A.
	20	N.A.	N.A.
	10	N.A.	N.A.
	5	N.A.	N.A.
	2	N.A.	N.A.

‡(media y DE)

*Las dosis de aceite esencial se refieren a volume inicial (40 µL).

^{a-c} Para el mismo aceite esencial, los valores seguidos por letras diferentes dentro de la misma columna son significativamente diferentes (P < 0,05) según la prueba de rango múltiple de Tukey.

N.A., No Activa.

Oussalah et al., (2006), Viuda-Martos et al., (2011) y varios autores intentan explicar el motivo por el que se produce dicha actividad, la rotura de la bicapa lipídica de la membrana celular de la bacteria, la interrupción de los sistemas enzimáticos, la coagulación del citoplasma celular, ataques sobre el material genético o daños sobre las proteínas de membrana que permiten el flujo de electrones al exterior. Estos argumentos justificarían la diferente respuesta de bacterias Gram-positivas y negativas, aunque por supuesto pueden darse diferencias especie-específicas. Bourgou et al., (2010) probó que el AE de hinojo no logró la inhibición en *Pseudomonas fluorescens*.



Conclusiones

5. CONCLUSIONES

El estudio de investigación realizado sobre los aceites esenciales ecológicos de hinojo (*Foeniculum vulgare*), perejil (*Petroselinum crispum*), lavanda (*Lavandula officinalis*) y lavanda convencional para determinar su actividad antioxidante y antimicrobiana es una aportación de gran relevancia para la industria alimentaria puesto que, además de su aplicación originaria en productos alimentarios para mejorar el sabor, color, y en general sus características organolépticas, también pueden mejorar su vida útil al adicionarlos como aditivos naturales, sustituyendo así los conservantes sintéticos.

- ✓ Los aceites esenciales estudiados muestran una gran variedad de sustancias en su composición química. Entre los distintos grupos existentes, se han encontrado fundamentalmente terpenos (limoneno, pineno, felandreno), cetonas (fenchona), alcoholes (linalol), fenoles (anetol)...En el caso del AE de hinojo ecológico los componentes principales son limoneno (26,44%), anetol (23,5%), fenchona (21,68%) α -felandreno y α -pineno (9,26% y 6,22%, respectivamente). Para el AE de perejil ecológico las sustancias químicas que más altos % presentaron fueron miriscitina en un 36,09%, apiol en un 20,93%, α -pineno en un 15,47% y nerilacetato en un 10,41%. Seguido de éstos, en proporciones menores, aparecen el allitetrametoxibenceno, sabieno y elemicina (6,45%, 4,73% y 2,74%, respectivamente). En el caso de la lavanda ecológica su compuesto predominante es el linalol (34,44%) seguido del acetato de linalilo (34,19%), y en porcentajes mucho más inferiores otros tales como *trans*- α -cimene (5,05%), acetato lavandulilo (4,08%), *trans*-cariofileno (3,83%), β - α -cimeno (3,44%) y β -farneseno (3,03%). Por último la lavanda convencional está compuesta por un 39,78% de linalol y con un 35,51% de acetato de linalilo como compuestos más significativos.
- ✓ Los aceites esenciales analizados en este estudio presentan un alto Contenido en Fenoles Totales, siendo el aceite esencial de perejil

ecológico el que mayor contenido mostró, seguido de hinojo y lavanda ecológica, respectivamente, y por último el de lavanda convencional.

Aunque se han observado algunas diferencias entre los aceites esenciales de lavanda (ecológica y convencional), dado el distinto origen de los aceites y la comparación con otros estudios no podemos concluir que dichas diferencias se deban al cultivo ecológico.

- ✓ Todos los aceites esenciales ensayados muestran actividad antioxidante, casi siempre lineal con las concentraciones. El aceite esencial de perejil ecológico mostró los mayores valores de actividad antioxidante en dos de los tres métodos empleados (DPPH y FRAP) que correlacionaron positivamente con el contenido en fenoles totales, y sin embargo presentó los valores más bajos en el método TBARs, e incluso manifestó actividad prooxidante. es necesario tener en cuenta esta actividad de cara a evaluar su inclusión en la formulación de alimentos.
- ✓ En cuanto a la actividad antibacteriana de los aceites esenciales estudiados, es moderada para *Listeria innocua*, siendo el AE de lavanda ecológica el que mayor inhibición presenta frente a dicha bacteria a altas concentraciones (Gram-positiva), seguida del AE de perejil ecológico en la mayoría de sus concentraciones, y por último lavanda convencional e hinojo ecológico. y no presentan actividad antimicrobiana frente a *Pseudomonas fluorescens*. De este modo, en vistas a futuros estudios, estos aceites deberían estudiarse en combinación con otros aceites o conservantes naturales para estudiar posibles sinergias o combinación de efectos (antioxidante y antimicrobiano).



Bibliografía

6.- Bibliografía.

- Agnani, H.; Makani, T.; Akagah, A.; Menut, C.; Bessièrre, J.M., (2004): Volatile constituents and antioxidant activity of essential oils from *Lippia multiflora* Mold growing in Gabon. *Flavour Frag. Journal*, 20: 34-38.
- Alankararao, G.S.J.G.; Baby, P.; Rajendra-Prasad, Y., (1991): Leaf oil of *Coleus amboinicus* Lour. the in vitro antimicrobial studies. *Perfumerie Kosmetics*. Vol.72: 744-745.
- Barros, L.; Heleno, S.A.; Carvalho, A.M.; Ferreira, I.C.F.R., (2009): Systematic evaluation of the antioxidant potential of different parts of *Foeniculum vulgare* Mill. From Portugal. *Food and Chemical Toxicology* 47, 2458–2464.
- Baruah, P.; Sharma, R.K.; Singh, R.S.; Ghosh, A.C., (1996): Fungicidal activity of some naturally occurring essential oils against *Fusarium moniliforme*. *Journal of Essential Oils Research*. Vol.8: 411-441.
- Bauer, K.; Garbe, D.; Surburg, H., (2001): Common fragrance and flavour materials: Preparation, properties and uses. *Wiley-VCH, Weinheim*. 293.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., (1995): Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28: 25-30.
- Bergey, D.; Krieg N.R., (1989): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.
- Bourgou, S.; Bettaieb, I.; Saidani, M.; Marzouk, B., (2010): Fatty acids, essential oil, and phenolics modifications of black cumin fruit under NaCl stress conditions. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 12399–12406.
- Brenes, A.; Roura, E., (2010): Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. *Anim. Feed Sci. Technol.* 158: 1–14.
- Burt, S., (2004): Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal Food Microbiol*, 94: 223-253.
- Cairo, M., (2003): Aceite esencial a partir de la corteza del limón (*Citrus limonium*). [Consulta de 04 de Junio de 2015] Disponible en Web: <http://www.monografias.com/trabajos12/aceitesc/aceitesc.shtml>.

- Carović-Stanko K.; Orlić, S.; Politeo, O.; Strikić, F.; Kolak, I.; Milosm, M.; Satovic, Z., (2010): Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. *Food Chemistry*, 119,196-201
- Cerpa-Chávez, M. G., (2007): Hidrodestilación de aceites esenciales: Modelado y caracterización. Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente. *Universidad de Valladolid*.
- Comisión europea, (2010): An analysis of the EU organic sector. *Directorate General for Agriculture and Rural Development*.
- Conforti, F.; Sosa, S.; Marrelli, M.; Menichini, F.; Statti, G.A.; Uzunov, D.; Tubaro, A.; Menichini, F., (2009): The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: The role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents. *Food Chemistry*, 112, 587–594.
- Daker, M.; Abdullah, N.; Vikineswary, S.; Goh, P.C.; Kuppusamy, U.R., (2008): Antioxidant from maize and maize fermented by *Marasmiellus* sp. As stabilizer of lipid-rich foods. *Food Chem.* 107: 1092-1098.
- Davis, J.; Camper, D., (2001): Lavender, History, Taxonomy, & Production. [Consulta de 04 de Junio de 2015]. Disponible en Web: <http://www.ces.ncsu.edu/fletcher/staff/jmdavis/lav.html>.
- De la Torre-Carreras, R.; López-González, J., (2010): Las plantas aromáticas y medicinales. Futuro y potencialidad en Extremadura. *Universidad de Extremadura*. España.
- Deans, S.G.; Ritchie, G., (1987): Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 5: 165–180.
- Díaz, C., (2011): Adherencia y colonización de *Pseudomas fluorescens* sobre sustratos sólidos: Influencia de la topografía y composición química de la superficie. *Trabajo de Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata*.
- Djeridane, A.; Yousfi, M.; Nadjemi, B.; Boutassouna, D.; Stocker, P.; Vidal, N., (2006): Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, 654–660.
- Edris, A.E., (2007): Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essecial Oils and their individual volatile constituents. *Phytotherapy Research*, 21: 308-323.
- Essam, E., (2001): Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 130: 325–337.

- Faller, A.L.K.; Fialho, E., (2010): Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. *Journal of Composition and Analysis*, 23: 561-568. Elsevier.
- FAO, (2011): Estudio sobre el uso de las plantas aromáticas y sus aceites esenciales en la industria alimentaria. *Centro Tecnológico Tecnova*.
- Fitzgerald, D.J.; Stratford, M.; Gasson, M.J.; Ueckert, J.; Bos, A.; Narbad, A., (2004): Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli plantarum* and *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 104-113.
- Foti, M.C.K.U.; Ingold, (2003): Mechanism of inhibition of lipid peroxidation by β -terpinene; an unusual and potentially useful hydrocarbons antioxidant. *Journal Agric. Food Chem.*, 51: 2758-2765.
- Fuentealba, J., (1999): Cultivo de la lavanda para la obtención de aceite esencial. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. *Universidad Austral de Chile*.
- George, D. R.; Smith, T. J.; Shiel, R. S.; Sparagano, O. A. E.; Guy, J. H., (2009): Mode of action and variability inefficacy of plant essential oils showing toxicity against the poultry red mite. *Dermanyssus gallinae*. *Vet. Parasitol.* 161: 276–282.
- Gogoi, R.; Baruah, P.; Nath, S.C., (1997): Antifungal activity of the essential oil of *Litsea cubeba*. *Journal of Essential Oils Research*. Vol.9: 213-215.
- Günther, E., (1948): The Essential Oils. Vol. 1: History and origin in Plants Production Analysis. *Krieger Publishing*: New York, USA.
- Harborne, J., (1998): Phytochemical methods: A guideto modern techniques of plant analysis. *Chapman & Hall*. London, UK. 200 p.
- Hassiotis, C.N.; Tarantilis, P.A.; Daferera, D.; Polissiou, M.G., (2010): Etherio, a new variety of *Lavandula angustifolia* with improved essential oil production and composition from natural selected genotypes growing in Greece. *Industrial Crops and Products*, 32, 77–82.
- Hendricks Bergey, D., (1994): Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology, 9ª edition. Regular, nonsporing gram-positive rods. Group 19. Ed. *Williamn & Wilkins*.
- Hinneburg, I.; Damien-Dorman, H.J.; Hiltunen, R., (2006): Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*, 97, 122–129.

- Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L., (2005): The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal Agric. Food Chem.* 53: 1841-1856.
- Kalembe, D.; Kunicka, A., (2003): Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10: 813–829.
- Kim, S.I.; Roh, J.Y.; Kim, D.H.; Lee, H.S.; Ahn, Y.J., (2003): Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. *J Stored Prod Res*, 39: 293–303.
- Kouřimská, L.A; Sabolová, M.B; Dvořáková, B.A.; Roubíčková, I.B; Pánek, J.B.; Nový, P.A., (2014): Antioxidant activity of herbs *Lamiaceae* grown in organic and conventional agriculture, for its antioxidant power and its use in the food industry. *Czech Journal of Food Sciences*, 32 (4), 398-405.
- Lee, K.G.; Shibamoto, T., (2002): Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. *Journal Agric. Food Chem.*, 50: 4947-4952.
- Lim, Y.Y.; Lim, T.T.; Tee, J.J., (2006): Antioxidant properties of guava fruit: Comparison with some local fruits. *Sunway Academic Journal*, 3, 9–20.
- Maestri, D. M.; Nepote, V.; Lamarque, L.; Zygadlo, J.A., (2006): Natural products as antioxidant. *Phytochemistry: Advances in Research*, 105-133.
- MAGRAMA, (2013): Agricultura Ecológica: *Estadísticas 2012*. España.
- MAGRAMA, (2014): Evolución de la caracterización de la tipología y perfil socio-demográfico del consumidor de alimentos ecológicos en España. *GFK*.
- Mahecha, C.A., (2010): Actividad antibacteriana y antioxidante de Aceites Esenciales extraídos de hojas y frutos de *Siparuna sessiliflora*. *Facultad de Ciencias de Bogotá*.
- MARM, (2009): Conoce y vive la Agricultura Ecológica. España. [Consulta de 12 de Junio de 2015]. Disponible en Web: http://www.alimentacion.es/imagenes/es/folleto_Agricultura_Ecologica_tcm5-38375.pdf.
- Martínez, A., (2003): Aceites esenciales, facultad de química farmacéutica, Medellín. [Consulta de 20 de Junio de 2015] Disponible en Web: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf>.
- Martínez-Tomé, M.; Jiménez, A. M.; Ruggieri, S.; Frega, N.; Strabbioli, R.; Murcia, M.A., (2001): Antioxidant Properties of Mediterranean Spices compared with common food additives. *Journal Food Protection*, 64: 1412-1419.

- Martucci, J.F.; Gende, L.B.; Neira, L.M.; Ruseckaite, R.A., (2015): Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. *Industrial Crops and Products*, 71, pp. 205-213.
- Meepagala, K.M.; Sturtz, G.; Wedge, D.E., (2002): Antifungal constituents of the essential oil fraction of *Artemisia drancunculus* L. var. *drancunculus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol.50: 6989–6992.
- Miguel, M. G.; Figueiredo, A. C.; Costa, M. M.; Martins, D.; Barroso, J. G.; Pedro, L., (2003): Effect of essential volatile oil isolated from *Thymbra capitata* (L.) Cac. On olive and sunflower oils. *Grasa y Aceites*, 54, 219-225.
- Montes, M.; Wilkomirsky, T.; Valenzuela, L., (1992): Plantas medicinales. Concepción, Chile. *Ediciones Universidad de Concepción*.
- Motamed, S.M.; Naghibi, F., (2010): Antioxidant activity of some edible plants of the Turkmen Sahra region in northern Iran. *Food Chemistry*, 119, 1637–1642.
- Muñoz, F., (2002): Plantas medicinales y aromáticas: Estudio, cultivo y procesado. 4ª Reimpresión. *Ediciones Mundi-Prensa*: Madrid, España.
- Nikaido, H., (1994): Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 264: 382–388.
- Nikaido, H., (2003): Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol.Mol.Biol. Rev.* 67: 593–656.
- Nijveldt, R.; Nood, E.; Hoorn, D.; Boelens, P.G.; Norren, K.; Leeuwen, P.A.M., (2001): Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 418–25.
- Ortuño, M.F., (2006): Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Ediciones Aiyana.
- Osawa, T.; Uritani, I.; García, V. V.; Mendoza, E. M., (1994): Novel natural antioxidants for utilization in food and biological system. In postharvest Biochemistry of plant Food-Materials in the Tropics, *Japan Scientific Societies*, Tokyo, Japan, 241-251.
- Oteo, J., Alós, J.I., (2004): Listeria y Listeriosis. Servicio de Microbiología. Hospital de Móstoles. Madrid. *Control de Calidad SEIMC*. [Consulta de 15 de Julio de 2015] Disponible en Web: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/listeria.pdf>.

- Oussalah, M.; Caillet, S.; Saucier, L.; Lacroix, M., (2006): Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Sci.*; 73, 236–244.
- Oussalah, M.; Caillet, S.; Saucier, L.; Lacroix, M., (2007): 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*. *Food Control* 18: 414–420.
- Oyaizu, M., (1986): Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japan Journal of Nutrition*, 44: 307-315.
- Parry, E. J., (1921): The Chemistry of Essential Oils and Artificial Perfumes. 4th Edition. *Van Nostrand Co.*, NY, USA.
- Peter, K.V., (2004): Handbook of Herbs and Spices. *Woodhead Publishing Limited*: London, England.
- Pitarokili, D.; Tzakou, O.; Couladis, M.; Verykokidou, E., (1999): Composition and antifungal activity of the essential oil of *Salvia pomifera* subsp. *Calycina* growing wild in Greece. *Journal of Essential Oils Research*, Vol.11: 655–659.
- Politeo, O.; Jukic, M.; Milos, M., (2006): Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils of twelve spice plants. *CCAACAA*, 79: 545-552. *Croatica Chemica Acta*.
- Reider-Vicanco, T.; Enrique-León, S.; Américo-Castro, L.; Norma, J.; Ramos, C., (2012): Composición química del aceite esencial de *Petroselinum crispum* y determinación de su actividad antibacteriana. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM. *Ciencia e Investigación*, 15 (2), 78-83.
- Reuveni, R.; Fleisher, A.; Putievsky, E., (1984): Fungistatic activity of essential oils from *Ocimum basilicum* chemotypes. *Phytopathology*. Vol.110: 20-22.
- Ricciardi, G., (2003): Aceites esenciales. [Consulta de 04 de Junio de 2015] Disponible en Web: <http://www.members.tripod.com/aromaticas/Aceites.htm>.
- Ruberto, G. y Baratta, M., (2000): Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.*, 69: 167-174.
- Ruiz de Maya, S.; López-López, I.; Munuera, J.L., (2011): Organic food consumption in Europe: International segmentation based on value system differences. *Ecological Economics*, 70, 1767-1775.

- Russo, M.; Gallet, G.C.; Bocchini, P.; Carnacini, A., (1998): Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3741-3746.
- Schnitzler, J.; Barraclough, T.G.; Boatwright, J.S., (2011): Causes of plant diversification in the Cape Biodiversity Hotspot of South Africa. *Systematic Biology*, 60, 343-357.
- SENA (2012): Introducción a la Industria de los aceites esenciales extraídos de las plantas medicinales y aromáticas. *Servicio Nacional de Aprendizaje*. Bogotá. [Consulta de 20 de Junio de 2015] Disponible en Web: http://repositorio.sena.edu.co/sitios/introduccion_industria_aceites_esenciales_plantas_medicinales_aromaticas/#.
- Shellie, R.; Mondello, L.; Marriot, P.; Dugo, G., (2002): Characterisation of lavender essential oils by using gas chromatography-mass spectrometry with correlation of linear retention indices and comparison with comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography*, 970, 225 - 234.
- Silva, F.; Ferreira, S.; Duarte, A.; Mendonça, D.I.; Domingues, F. C., (2011): Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*, 19: 42–47.
- Singh, G.; Marimuthu, R.; De Heluani, C.S.; Catalan, C., (2005): Antimicrobial and Antioxidant Potentials of Essential Oil and Acetone Extract of *Myristica fragrans* Houtt. *Journal Food Sci.*, núm. 3, vol. 70; 141-144.
- Singleton, V. L., Rossi, J.A., (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdate-diphenylpicrylhydrazyl reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.
- Strack, D., (1997): Phenolic metabolism. In: Dey PM, Harborne JB (eds). *Plant Biochemistry*. Academic Press, London, 387–416.
- Telci, I., Demirtas, I., Sahin, A., (2009): Variation in plant properties and essential oil composition of sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) fruits during stages of maturity. *Industrial Crops and Products*, 30: 126-130.
- Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., & Polissiou, M., (2005): Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90, 333-340.
- Teuscher, E.; Anton, R.; Lobstein, A., (2005): Plantes Aromatiques. Épices, aromates, condiments et huiles essentielles. *Editions Tec & Doc*, Paris, France.

- Trepat-Quílez, M., (2002): Incidencias y comportamiento de *Salmonella* y *Listeria* en pechugas de pavo curadas. *Universidad Autónoma de Barcelona*. Facultad de Veterinaria.
- Trombetta, D.; Castelli, F.; Sarpietro, M. G.; Venuti, V.; Cristani, M.; Daniele, C.; Saija, A.; Mazzanti, G.; Bisignano, G., (2005): Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 2474–2478.
- Tserennadmid, R.; Takó, M.; Galgóczy, L.; Papp, T.; Pesti, M.; Vágvölgyi, C.; Almássy, K.; Krisch, J., (2011): Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *Int.J.Food Microbiol.* 144: 480–486.
- Velioglu, Y.S.; Mazza, G.; Gao, L.; Oomah, B.D., (1998): Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal Agric. Food Chem*, 46: 4113-4117.
- Viuda-Martos, M.; Mohamady, M.A.; Fernández-López, J.; Abd-ElRazik, K.A.; Omer, E.A.; Pérez-Álvarez, J.A.; Sendra, E., (2011): In vitro antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control*, 22: 1715-1722.
- Viuda-Martos, M.; Ruiz-Navajas, Y.; Fernández-López, J.; Pérez-Álvarez, J. A., (2008): Antibacterial activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Journal of Food Safety*, 28, 567-576.
- Viuda-Martos, M.; Ruiz-Navajas, Y.; Sánchez-Zapata, E.; Fernández-López, J.; Pérez-Álvarez, J.A., (2009): Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour and Fragrance Journal*, 2010, 25: 13-19.
- Vogel, H.; Berti, M., (2003): Como producir plantas medicinales y aromáticas de calidad. *Ministerio de Agricultura*. Santiago, Chile.
- Wouters, P.C.; Dutreus, N.; Smelt, J.P.P.M.; Lelieveld, H.L.M., (1999): Effects of pulsed electric fields on inactivation kinetics of *Listeria innocua*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, No. 12: 5364-5371.
- Zhang, H.; Chen F.; Wang X.; & Yao H. Y., (2006). Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. *Food Research International*, 39, 833-839.
- Zhen, W.; Wang, S.Y.; (2001): Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal Agric. Food Chem*, 49: 5165-5170.