

Aceite esencial de orégano: un potencial aditivo alimentario

Origanum essential oil: a potential food additive

Claudia Amadio
Rosa Medina
Cora Dediol

Mónica Érika Zimmermann
Susana Miralles

Originales: Recepción: 30/11/2009 - Aceptación: 10/12/2010

RESUMEN

Se trabajó con aceite esencial obtenido por arrastre por vapor de *Origanum x applii* (criollo) y *Origanum x majoricum* (mendocino), cultivados en La Consulta, Mendoza, Argentina. Para evaluar su poder antioxidante y conservante en alimentos se determinó: rendimiento, polifenoles totales, cuantificación de timol y carvacrol mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) y capacidad de secuestro de radicales libres (DPPH). La actividad conservante se evaluó *in vitro*, por el método de difusión en agar, frente a cultivos puros de cinco bacterias patógenas y seis cepas de bacterias lácticas que alteran alimentos. El rendimiento en aceite esencial de estos oréganos oscila entre los valores informados por distintos autores para variedades cultivadas en otras regiones. Se destaca el contenido de polifenoles de ambos en relación con los valores mencionados en la bibliografía para otros *Origanum*, prevaleciendo el timol sobre el carvacrol. Esto se condice con un superior nivel de secuestro de radicales libres de ambos respecto de los citados en la literatura. Los oréganos de La Consulta inhibieron todas las cepas ensayadas y fueron más efectivos contra *Staphylococcus aureus*. Lo expuesto corrobora el poder antioxidante y conservante del *Origanum x applii* y del *Origanum x majoricum*.

ABSTRACT

We worked with *Origanum x applii* (criollo) and *Origanum x majoricum* (mendocino), cultivated in La Consulta, Mendoza, Argentina. The essential oil was obtained by steam distillation. The antioxidant and antibacterial activity was evaluated as: yield, total phenols content, quantification of thymol and carvacrol by HPTLC, as well as the free radical scavenging capacity using the DPPH method. The antimicrobial activity was evaluated *in vitro*, by the agar diffusion method, against pure cultures of five pathogenic bacteria and six strains of lactic bacteria that affect food. Yields were higher as compared to those reported in the literature for samples of the oregano spices coming from different countries. The concentration of polyphenols shown, in both samples, was higher than that reported in literature, prevailing thymol over carvacrol. This is consistent with a higher level of free radicals scavenging capacity with regard to mentioned in the literature. They inhibited all strains tested and were more effective against *Staphylococcus aureus*. The exposed thing corroborates the antioxidant and preserving activity of the *Origanum x applii* and *Origanum x majoricum*.

Palabras clave

aceite esencial de orégano •
antioxidante • conservante

Keywords

origanum essential oil • antioxidant •
preservative

INTRODUCCIÓN

Existen en el mundo un gran número de especies a las que se designan con el nombre de orégano. El género más característico es el *Origanum*, sin embargo también se comercializan el orégano español (*Coridohymus capitatus* L.) y el orégano mexicano (*Limpia graveolens* Kunth). En Mendoza se han reconocido dos especies: *Origanum majorana* L. y *O. vulgare* L. y sus híbridos, *O. x majoricum* y *O. x applii* (21).

Todas ellas tienen múltiples usos: condimento en la industria de los alimentos, plantas decorativas, aromatizantes en la industria perfumera, producción de aceites esenciales y oleorresinas. En la medicina tradicional, las distintas especies de orégano también son usadas contra el asma, la indigestión, el dolor de cabeza y el reumatismo y, como desinfectantes (10, 14, 25). Actualmente muchas especies y hierbas, en particular de la familia Lamiaceae, a la que pertenece el orégano, han sido evaluadas como antioxidantes y conservantes en alimentos, aumentando así su importancia en la industria alimentaria por ser una alternativa a los aditivos sintéticos (9, 17, 22, 23, 24, 26). Sus principios activos pueden actuar en una o varias de las etapas de la secuencia oxidativa (8). Los polifenoles son los responsables de esta acción y en ella influye su estructura molecular, en especial, el grado de hidroxilación y la posición de los oxhidrilos (16). A pesar de que su actividad antioxidante está asociada a varios mecanismos, su elevada reactividad frente a radicales libres activos se considera el mecanismo principal (8).

La composición en polifenoles del aceite esencial de orégano es muy variable, depende principalmente de la parte de la planta que sea destilada y de la especie o subespecie. El timol y el carvacrol son los compuestos principales (1, 6). En el *Origanum vulgare* se ha comprobado el alto contenido en compuestos polifenólicos, que proveen una efectiva protección en todas las fases de la oxidación lipídica. (8).

La actividad antibacteriana también es afectada por el tipo, composición y concentración del aceite esencial, el tipo y concentración del microorganismo seleccionado, la composición del sustrato, y las condiciones de procesamiento y conservación (5).

Actualmente se desconoce la composición de los híbridos *Origanum x majoricum* y *Origanum x applii*, y en qué etapas de la oxidación lipídica actúan cada uno de ellos para proteger los alimentos. Se han publicado numerosos estudios sobre el efecto antimicrobiano de distintos oréganos que indican la inhibición de bacterias patógenas alimentarias (5, 7, 12, 13) pero ninguno referido a estos oréganos cultivados en la provincia de Mendoza, Argentina.

Objetivos

- Evaluar el efecto antioxidante de los aceites esenciales de *Origanum x applii* y *Origanum x majoricum* por su contenido en polifenoles y secuestro de radicales libres.
- Estudiar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Origanum x applii* y *Origanum x majoricum* frente a bacterias lácticas y patógenas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de *Origanum x applii* y *Origanum x majoricum* fueron obtenidas por productores del Valle de Uco de la provincia de Mendoza (Argentina), en época de floración (latitud 33° 42' 23" Sur, longitud 69° 4' 28" Oeste, altitud 954 m s.n.m). Las plantas fueron secadas a temperatura ambiente y se separaron las hojas y la inflorescencia (flores + brácteas) para su posterior extracción. Una muestra de cada una de ellas fue depositada en el Herbario del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo (MEN N° 3787 y 3788).

Los aceites esenciales (AE) fueron extraídos por arrastre con vapor de agua en un destilador de vidrio de laboratorio, el cual consta de un balón generador de vapor de 1000 mL, una columna de destilación en la cual se colocan 300 g de muestra seca y un refrigerante. Los componentes volátiles fueron recibidos en una bureta graduada luego de 40 minutos de destilación. Se conservaron en recipientes de vidrio bajo atmósfera inerte (N₂) y se almacenaron a 4-6°C hasta su análisis. Se hicieron cuatro repeticiones y se calculó el rendimiento para cada híbrido.

Los polifenoles totales fueron determinados según la técnica de Folin Ciocalteu (27). La concentración de polifenoles totales en los aceites se expresó como mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto seco del aceite esencial (mg EAG/g de extracto seco).

La cuantificación de timol y carvacrol se realizó mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC). Se usaron placas de HPTLC Silica gel 60 de 10 x 20 cm (Macherey- Nagel).

Las muestras se aplicaron con sembrador automático Linomat IV de Camag en bandas de 4 mm con 4 mm de separación. El desarrollo fue realizado en cuba de vidrio doble, con saturación de placa durante 15 minutos. El solvente usado fue tolueno y se hizo una corrida doble de 9,5 cm cada una. La detección se realizó con luz UV en espectrodensímetro Scanner II de Camag, con lecturas a 270 nm contra una curva de calibración preparada con soluciones estándares de timol y carvacrol cuya ecuación se determinó por el método de regresión polinomial para un α 0,05.

Para medir la reactividad con radicales libres se modificó el método de Münir Oktay *et al.* (18). Se preparó una solución etanólica (0,01 mmol/L) de 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH). A 10 mL de esta solución se le adicionaron 3 mL de

diferentes diluciones de los aceites (1:1, 1:11, 1:26, 5:15 y 5:30 que corresponden a 1000, 920, 307, 84 y 35 mg/L). Luego de 30 min se leyó la absorbancia a 517 nm. La concentración de DPPH en el medio se calculó a partir de la siguiente curva de calibración, determinada por regresión lineal (R^2 0,9765):

$$\text{Absorbancia} = 190,96 \times [\text{DPPH}]$$

La actividad de secuestro de radicales libres se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad secuestrante (\%)} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs control}} \times 100$$

La actividad antibacteriana se monitoreó por el método de difusión en agar (19), empleándose seis cepas de bacterias lácticas que alteran alimentos y cinco cepas patógenas: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Enterococcus sp.* y *Escherichia coli*. El método consiste en aplicar una cantidad determinada del extracto en estudio en un disco de papel sobre la superficie de la placa, donde se ha distribuido el inóculo con el microorganismo sobre el que se quiere probar el poder antimicrobiano. La sensibilidad del microorganismo al extracto se relaciona con el tamaño de la zona de inhibición de su crecimiento. Según el diámetro del halo de inhibición, los microorganismos se pueden clasificar en: no sensibles ($d < 8$ mm), sensibles ($9 \text{ mm} < d < 14$ mm), muy sensibles ($14 \text{ mm} < d < 19$ mm) y extremadamente sensibles ($d > 20$ mm) (20).

El tratamiento estadístico de los datos fue realizado empleando el análisis de la varianza (ANOVA) y posterior aplicación de la prueba de Tukey, para un 95% de confianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento y contenido fenólico

El rendimiento y el contenido fenólico de los aceites esenciales de *O. x aplii* y *O. x majoricum* se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Rendimiento y concentración de fenoles totales del *Origanum x aplii* y del *Origanum x majoricum*.

Table 1. Extract yield and total phenol content of *Origanum x aplii* and *Origanum x majoricum*.

	Rendimiento (mL/100 g extracto seco)	Fenoles totales (mg EAG/g extracto seco)
<i>Origanum x aplii</i> (criollo)	1,8 ± 0,1 a	104,3 ± 7 a
<i>Origanum x majoricum</i> (mendocino)	3,4 ± 0,2 b	185,3 ± 38 b

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) ($n = 4$).

Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$) ($n = 4$).

Según lo reportado por Albado *et al.* (1), el rendimiento del *O. vulgare* bajo estas mismas condiciones es de 1,3 mL, siendo de 2,8 mL para el *O. syriacum* L. (3). Los oréganos estudiados presentan un buen rendimiento, extrayéndose más del *O. x majoricum*.

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas, en las cuales desempeñan diversas funciones fisiológicas. Se ha demostrado que estas sustancias son las responsables de la actividad antioxidante de la plantas (11).

Los aceites de *Origanum syriacum* L., *Origanum minutiflorum* O. Schwarz et P. H. Dabis, y *Origanum onites* L. (9) tienen altos contenidos de polifenoles (119,1; 77,6 y 93,9 mg ac. gálico/g). El contenido total de fenoles es mayor en el *O. x majoricum* (185,3 mg ac. gálico/g).

Cuantificación de timol y carvacrol

Los resultados de los análisis de HPTLC se presentan en la tabla 2. El mayor componente de ambos aceites esenciales es el timol y el minoritario el carvacrol.

El contenido de timol en el orégano criollo fue significativamente mayor que en el mendocino y ambos superaron el contenido de carvacrol, cuyo tenor no superó el 1% en los dos híbridos.

Tabla 2. Concentración en timol y carvacrol del aceite esencial de *Origanum x aplii* y de *Origanum x majoricum*.

Table 2. Quantitative composition in thymol and carvacrol of essential oil of the *Origanum x aplii* and *Origanum x majoricum*.

	Timol (mg/100 mg AE)	Carvacrol (mg/100 mg AE)
<i>Origanum x aplii</i> (criollo)	33,8 ± 1,0 a	Menor a 1 a
<i>Origanum x majoricum</i> (mendocino)	12,9 ± 0,1 b	Menor a 1 a

AE = aceite esencial. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) ($n = 4$).
Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$) ($n = 4$).

Aligiannis *et al.* (2) y Alma *et al.* (3) han encontrado como componente mayoritario el carvacrol en *Origanum scabrum* (74,86%) y en *Origanum syriacum* (26,97%).

Estos resultados inducen a estudios posteriores, sobre un potencial empleo como antioxidante en alimentos que se conservan a bajas temperaturas, pues se ha demostrado que el timol, a temperatura ambiente, actúa mejor que el carvacrol como antioxidante de lípidos (25).

Reactividad con radicales libres

Los antioxidantes se caracterizan por ceder hidrógeno a partir de los grupos fenólicos, interrumpiendo así la propagación de la oxidación a través de la cadena de radicales libres. De esta manera se forman compuestos estables que no pueden iniciar o propagar la oxidación lipídica. El método de la reactividad con los radicales libres se usa como un indicador de la donación de hidrógeno y de esta manera de la actividad antioxidante (8).

La reactividad con radicales libres se presenta en la tabla 3.

Tabla 3. Porcentaje de reactividad con radicales libres del *Origanum x apalii* y del *Origanum x majoricum*

Table 3. Measurement of the DPPH-scavenging activity of *Origanum x apalii* and *Origanum x majoricum*

Concentración AE (mg/L)	% Inhibición DPPH		Relación % inhib. <i>O. x apalii</i> / <i>O. x majoricum</i>
	<i>O. x majoricum</i>	<i>O. x apalii</i>	
920	94 ± 1,5 ab	95 ± 0,97 a	1
307	48 ± 1,4 c	94 ± 0,91 ab	2
84	17 ± 1,2 d	85 ± 0,8 b	5
35	10 ± 1,1 d	61 ± 0,8 c	6

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) ($n = 4$).

Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$) ($n = 4$).

El radical libre estable DPPH fue oxidado y decolorado en presencia de los dos tipos de oréganos. La inhibición se incrementó con la concentración del aceite esencial.

El *Origanum x apalii* presentó mayor poder secuestrante que el *O. x majoricum* para las menores diluciones. A concentraciones mayores no se encontraron diferencias significativas entre ellos.

Alma *et al.* (3) trabajaron con orégano sirio (*Origanum syriacum* L.) y reportaron menores porcentajes de inhibición para concentraciones similares de aceite esencial.

Comparando los porcentajes de secuestro de radicales libres, los oréganos estudiados presentan capacidad de captura de radicales libres y de ellos, el aceite esencial de *O. x apalii* es más efectivo en todas las concentraciones ensayadas.

Determinación de la actividad antibacteriana

Se ha demostrado que una de las especies que tiene efecto antimicrobiano es el orégano, ya que inhibe el crecimiento de numerosas bacterias patógenas en alimentos (4, 5). Esta actividad es debida, principalmente, a que sus aceites esenciales contienen compuestos volátiles, especialmente timol y carvacrol cuyo efecto antimicrobiano se ha comprobado individualmente para cada uno de ellos (15).

Los resultados de inhibición microbiana se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Actividad antimicrobiana del *Origanum x apalii* y del *Origanum x majoricum*.

Table 4. Antimicrobial activity of *Origanum x apalii* and *Origanum x majoricum*.

Microorganismo	<i>Origanum x apalii</i>		<i>Origanum x majoricum</i>	
	Diámetro inhibitorio (mm)	Clasificación	Diámetro inhibitorio (mm)	Clasificación
<i>Enterococcus faecalis</i>	8,5	no sensible	10	sensible
<i>Escherichia coli</i>	12,5	sensible	17	muy sensible
<i>Listeria monocytogenes</i>	16,5	muy sensible	17,5	muy sensible
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	sensible	19,5	muy sensible
<i>Salmonella enteridis</i>	9	sensible	12	sensible
láctica 1	8	no sensible	0	no sensible
láctica 2	13	sensible	15,5	muy sensible
láctica 3	10,5	sensible	15	muy sensible
láctica 4	40	extremadamente sensible	24,5	extremadamente sensible
láctica 5	9	sensible	18	muy sensible
láctica 6	8	no sensible	0	no sensible

Ambos oréganos presentaron halos de inhibición frente a las bacterias patógenas ensayadas. El *Enterococcus faecalis* fue calificado como no sensible al *Origanum x apalii* y la efectividad de éste fue menor que la del *Origanum x majoricum*. Las bacterias lácticas 1 y 6 no fueron sensibles a los dos aceites esenciales estudiados; la láctica 4 fue extremadamente sensible a ambos y las 2, 3 y 5 fueron más sensibles al *Origanum x majoricum*.

CONCLUSIONES

- Los aceites esenciales de oréganos producidos en Mendoza (*O. x apalii* y *O. x majoricum*) contienen compuestos fenólicos, entre los que se destaca el timol.
- Si bien el rendimiento en aceite esencial del *O. x majoricum* ($3,4 \pm 0,2\%$) es superior al del *O. x apalii* ($1,8 \pm 0,1$), su contenido de timol es significativamente menor.
- En bajas concentraciones (35 mg/L) es seis veces más efectivo, por su capacidad de captura de radicales libres el *O. x apalii* que el *O. x majoricum* y en mayores dosis (920 mg/L), su actividad es similar: ambos capturan más del 90% del DPPH.
- Ambos oréganos inhiben el desarrollo de las bacterias patógenas y la mayoría de las lácticas ensayadas. El *Origanum x majoricum* es más efectivo que el *Origanum x apalii*.

- Los aceites esenciales de *Origanum x majoricum* y el de *Origanum x applii* son una buena fuente de compuestos fenólicos capaces de proteger contra la oxidación, secuestrando radicales libres y con acción antibacteriana que se podrían incorporar a alimentos para prolongar su vida útil.

BIBLIOGRAFÍA

1. Albado Plaus, E.; Saez Flores, G.; Grabiell Ataucusi, S. 2001. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). Rev. Med. Hered. Lima. 12(1): 16-19.
2. Aligiannis, N.; Kalpoutzakis, E.; Mitaku, S.; Chinou, I. 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* Species. J. Agric. Food Chem. 49: 4168-4170.
3. Alma, M.; Mavi, A.; Yildirim, A.; Digrak, M.; Hirata, T. 2003. Screening chemical composition and *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. Pharm. Bull. 26(12): 1725-1729.
4. Avila-Sosa, R.; Gastélum-Franco, M.; Camacho-Dávila, A.; Torres-Muñoz, J.; Nevárez-Moorillón, V. 2010. Extracts of Mexican Oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) with antioxidant and antimicrobial activity. Food Bioprocess Technol. 3: 434-440.
5. Baydar, H.; Sağdıç, O.; Özkan, G.; Karadoğan, T. 2004. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. Food Control. 15: 169-172.
6. Bertelli, D.; Plessi, M.; Miglietta, F. 2003. Effect of microwaves on volatile compounds in *Origanum*. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie. 36: 555-560.
7. Busatta, C.; Altemir, J.; Alves Rodrigues, M.; Cansian, R.; de Oliveira, J. 2007. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. Braz. J. Microbiol. 38(4): 610-616.
8. Cervato, G.; Carabelli, M.; Gervasio, S.; Cittera, A.; Cazzola, R.; Cestaro, B. 2000. Antioxidant properties of oregano (*Origanum vulgare*) leaf extracts. Journal of Food Biochemistry. 24: 453-465.
9. Dorman, H.; Peltoketo, A.; Hiltunen, R.; Tikkanen, M.J. 2003. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. Food Chemistry 83: 255-262.
10. Faleiro, L.; Miguel, G.; Gomes, S.; Costa, L.; Venâncio, F.; Teixeira, A.; Figueiredo, A.; Barroso, J.; Pedro, L. 2005. Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L. J. Agric. Food Chem. 53: 8162-8168.
11. Gotsiou, P.; Naxakis, G.; Skoula, M. 2002. Diversity in the composition of monoterpenoids of *Origanum microphyllum* (Labiatae). Biochemical Systematics and Ecology. 30: 865-879.
12. Hinneburg, I.; Damien Dorman, H. J.; Hiltunen, R. 2006. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. Food Chemistry. 97: 122-129.
13. Lu, I.; Evrendilek, G. 2004. Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish Oregano (*Origanum minutiflorum*), Bay Laurel (*Laurus nobilis*), Spanish Lavender (*Lavandula stoechas* L.), and Fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. J. Agric. Food Chem. 52: 8255-8260.
14. Kamel, M.; Assaf, M.; Hasanean, H.; Ohtani, K.; Kasai, R.; Yamasaki, K. 2001. Monoterpene glucosides from *Origanum syriacum*. Phytochemistry. 58: 1149-1152.
15. Kim, J.; Marshall, M.; Cornell, J.; Freston, J.; Wei, C. 2006. Antibacterial activity of carvacrol, citral and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. Journal of Food Science. 60: 1364-1368.

16. Kulisic, T.; Radonic, A.; Katalinic, V.; Milos, M. 2004. Analytical, nutritional and clinical methods use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*. 85: 633-640.
17. Moller, J.; Madsen, H.; Aaltonen, T.; Skibsted, L. 1999. Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. *Food Chemistry*. 64: 215-219.
18. Oktay, M.; Gülçin, İ.; Küfrevioğlu, Ö. 2003 Determination of *in vitro* antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 36(2): 263-271
19. Ponce, A.; Fritz, R.; Del Valle, C.; Roura, S. 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 36(7): 679-684.
20. _____; Roura, S.; Del Valle, C.; Moreira, M. 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: *in vitro* and *in vivo* studies. *Postharvest biology and technology*. 49: 294-300.
21. Rouquaud, E.; Videla, M. E. 2000. Oréganos de Mendoza (Argentina). *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina*. 42(1): 23-32.
22. Škerget, M.; Kotnik, P.; Hadolin, M.; Rižner Hraš, A.; Simonič, M.; Knez, Z. 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some-plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. 89(1): 191-198.
- 23 Tepe, B.; Donmeza, E.; Unlub, M.; Candanc, F.; Dafererad, D.; Vardar-Unlub, G.; Polissioud, M.; Sokmena, A. 2004. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). *Food Chemistry*. 84(4): 519-525.
24. _____; Sokmen, M.; Askin Akpulat, H.; Daferera, D.; Polissiou, M.; Sokmen, A. 2005. Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. *Journal of Food Engineering*. 66(4): 447-454.
25. Yanishlieva, N.; Marinova, E.; Gordon, M.; Raneva, V. 1999. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*. 64: 59-66.
26. Yu, L.; Scanlin, L.; Wilson, J.; Schmidt, G. 2002. Rosemary extracts as inhibitors of lipid oxidation and color change in cooked Turkey products during refrigerated storage. *Journal of Food Science*. 67(2): 582-585.
27. Zoecklein, B. W.; Fugelsang, K.; Gump, B.; Nury, F. 2001. En el capítulo 7 del libro *Análisis y producción de vino*, p. 121-467. Editorial Acribia S. A. Zaragoza. España.