

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA  
Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo



**RETENCIÓN Y MIGRACIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE  
ORÉGANO EN FILMS DE BIOPOLÍMEROS**

**MÁSTER EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS**

Presentada por:  
María Gutiérrez Lucas

Directora Académica:  
María Vargas Colás

Directora Experimental:  
Ángela Perdonés Montero

# RETENCIÓN Y MIGRACIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO EN FILMS DE BIOPOLÍMEROS

Gutiérrez-Lucas, M., Perdonés, A<sup>1</sup>., Vargas, M<sup>1</sup>.

## RESUMEN

Se utilizaron films de metilcelulosa y de metilcelulosa y quitosano como vehículo de aceite esencial de orégano (*Origanum compactum*). Se determinó por cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC-MS) la composición del aceite esencial, siendo el carvacrol y el timol los compuestos mayoritarios. Se determinó las pérdidas de aceite esencial mediante gravimetría y GC-MS. En términos globales, las pérdidas de aceite esencial fueron del orden del 80%. Las mayores pérdidas se corresponden con los compuestos minoritarios y las menores con los ingredientes bioactivos: carvacrol y timol. Se determinó la migración de carvacrol y de timol utilizando distintos simulantes alimentarios. El ácido acético al 3% en medio acuoso fue el simulante en el que se detectó una mayor migración de carvacrol y timol cuando se incorporó quitosano en la matriz polimérica.

PALABRAS CLAVE: film, aceite esencial, carvacrol, timol, GC-MS, retención, HPLC, migración, simulante.

## RESUM

Es van utilitzar films de metilcel·lulosa i de metilcel·lulosa i quitosan com a vehicle d'oli essencial d'orenga (*Origanum compactum*). Es va determinar per cromatografia de gasos – espectrometria de masses (GC-MS) la composició de l'oli essencial, sent el carvacrol i el timol els compostos majoritaris. Es va determinar les pèrdues d'oli essencial mitjançant gravimetria i GC-MS. En termes globals, les pèrdues d'oli essencial foren de l'ordre del 80%. Les majors pèrdues es van correspondre amb els compostos minoritaris i les menors amb els ingredients bioactius: carvacrol i timol. Es va determinar la migració de carvacrol i de timol utilitzant diferents simulants alimentaris. L'àcid acètic al 3% en medi aquós va ser el simulant en què es va detectar una major migració de carvacrol i timol quan es va incorporar quitosan en la matriu polimèrica.

PARAULES CLAU: film, oli essencial, carvacrol, timol, GC-MS, retenció, HPLC, migració, simulant.

---

<sup>1</sup> Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Camino de Vera, s/n, 46022, Valencia.

## **ABSTRACT**

Chitosan and methylcellulose films were used as a vehicle for incorporating oregano essential oil (*Origanum compactum*). The composition of the essential oil was determined by gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS). The main compounds were found to be thymol and carvacrol. Essential oil loss was determined gravimetric analysis and by GC-MS. Overall losses of essential oil were around 80%. The greatest losses were obtained for the minor compounds of the essential oil and the lower losses were reported for the bioactive ingredients: carvacrol and thymol. Migration of carvacrol and thymol using several food simulants was determined. When chitosan was incorporated into the polymer matrix, acetic acid aqueous solution (3%) was the food simulant where the higher migration of carvacrol and thymol was detected.

**KEY WORDS:** film, essential oil, carvacrol, thymol, GC-MS, retention, HPLC, migration, simulant.

## INTRODUCCIÓN

Los films o recubrimientos biodegradables se presentan como una alternativa al embalaje tradicional, en línea con la demanda creciente de los consumidores de productos biodegradables, reciclables y no dañinos para el medio ambiente (Jiulin Wu et al., 2014). Además, los films formulados a base de biopolímeros pueden ser utilizados como vehículo de aceites esenciales (Sánchez-Gonzalez et al., 2009, 2011a, 2011b; Bonilla et al., 2013, 2014; Perdones et al., 2012, 2014). La matriz polimérica permite la liberación controlada de los agentes activos de los aceites esenciales. Estudios previos han demostrado que los films que incorporan aceites esenciales reducen la carga microbiana de los alimentos que recubren (Ouattara et al., 2000; Burt, 2004), aumentando así su vida útil y mejorando la seguridad alimentaria (Cerisuelo et al., 2012).

Los aceites esenciales, son sustancias muy aromáticas, que se obtienen mediante extracción de diferentes partes de plantas usando solventes orgánicos o mediante destilación. El aceite esencial de orégano (*Origanum compactum*), presenta hasta 20 veces más contenido en compuestos antioxidantes que otros aceites esenciales y presenta como ingredientes mayoritarios carvacrol y timol (Altintas et al., 2013; Ben Arfa et al., 2006). Numerosos estudios demuestran que estos dos compuestos son los principales responsables de las propiedades antibacterianas frente a microorganismos patógenos (Altintas et al., 2013).

El carvacrol es un monoterpenoide fenol con propiedades antibacterianas. Así, inhibe el crecimiento de varias bacterias cepas, como por ejemplo: *Enterobacterias* spp., *Listeria* spp., *Lactobacilos* spp. y *Pseudomonas* spp. (Gutiérrez et al., 2009; Ben Arfa et al., 2007). Es un compuesto aromático de olor dulce y por su naturaleza volátil puede ser utilizado para tratar productos sin estar en contacto directo con el envase, así como para protegerlos de un amplio espectro de bacterias y hongos mediante la inhibición de su crecimiento en la superficie de los alimentos (Lopez et al., 2007; Rodriguez et al., 2007; Mascheroni et al., 2011). El carvacrol también se ha utilizado para conservar alimentos porosos y en polvo, rallados, particulados o vegetales listos para comer como ensaladas (Han, 2005). Está reconocido legalmente como aditivo alimentario (en la categoría de aromas) de la UE y como “Generalmente reconocido como seguro” (GRAS) por la FDA de EEUU (López et al., 2007).

El timol también pertenece al grupo de los terpenoides fenoles con características fungicidas y desinfectantes, posee sabor agradable y olor característico. Es un compuesto antioxidante que controla la oxidación de los lípidos durante la elaboración de alimentos (Tomaino et al., 2005). Su poder antioxidante depende de muchos factores como la concentración, temperatura, luz, tipo de simulante y estado físico del sistema. Estudios previos mostraron que la capacidad antioxidante del timol es mayor a la del carvacrol (Wu et al., 2012). El timol es GRAS y también se incluye en la lista de aromas autorizados en la Decisión 2002/113/EC de la Comisión Europea.

Los requisitos específicos para la fabricación y comercialización de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos,

así como los límites de migración específicos (LME) están regulados en el Reglamento UE N° 10/2011. Para los componentes mayoritarios del aceite de orégano utilizado en este estudio (carvacrol y timol) no existe LME. En estos casos, se debe aplicar un LME general de 60 mg de sustancia por kg de alimento (mg/kg). Para demostrar la conformidad con el mencionado Reglamento de los materiales que aún no han estado en contacto con alimentos se utilizan diversos simulantes alimentarios que han sido asignados para cumplir con las características de distintos alimentos ya sean con carácter hidrofílico o lipofílico. Estudios previos han evaluado la migración de carvacrol y timol en films de polipropileno (Ramos et al., 2014). No obstante, no se dispone de información sobre la migración de estos ingredientes en matrices de polímeros biodegradables como el quitosano y la metilcelulosa.

Por otra parte, siempre que se incorporan aceites esenciales en las formulaciones formadoras de recubrimiento es importante determinar el nivel de retención (o las pérdidas) de aceite esencial puesto que la salida de agua de la matriz durante el secado del film produce el arrastre de los componentes volátiles del aceite esencial. En este sentido, se han utilizado métodos gravimétricos para estimar las pérdidas (Sánchez-González et al., 2011a, Perdonés et al., 2014). No obstante, los estudios previos en los que se evalúen las pérdidas de aceite esencial por cromatografía y en términos de cada uno de los compuestos son escasos.

El objetivo de este trabajo fue cuantificar la retención en el film de aceite esencial de orégano y la migración de sus ingredientes mayoritarios en diferentes simulantes alimentarios cuando dicho aceite se incorpora en la formulación de films biodegradables de metilcelulosa y de metilcelulosa-quitosano.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Preparación y acondicionamiento de los films

Se prepararon varias formulaciones formadoras de recubrimiento (FFR) con la composición que se muestra en la Tabla 1.

**TABLA 1.** Composición de las FFR.

FFR	Quitosano (% p/p)	Metilcelulosa (% p/p)	AE orégano (% p/p)
MC	-	0.5	-
MC-CH	0.5	0.5	-
MC-O_1	-	0.5	0.25
MC-O_2	-	0.5	0.5
MC-CH-O_1	0.5	0.5	0.25
MC-CH-O_2	0.5	0.5	0.5

Para obtener las FFR de metilcelulosa (MC) se realizó una disolución de metilcelulosa (MC) (VWR, 72757, España) en agua 0.5 (% p/p). El quitosano (CH) de alto peso molecular (Lote MKBG8530V, Sigma Aldrich, St. Louis,

EEUU) se disolvió al 1% (p/p) en una disolución de ácido acético glacial (Panreac, 435474, Castellar del Valles, España) al 1% (v/p). Para obtener las FFR MC-CH, la disolución de CH se mezcló con la disolución de MC, de manera que la concentración total de polímero se mantuvo al 0.5% y la ratio MC:CH fue de 1:1. Para preparar las FFR que incorporaron AE, se añadió a la disolución de polímero, una gota de silicona (Panreac, 147416, Castellar del Valles, España), una de Tween 85® (Sigma Aldrich, MKBN5970V, St. Louis, EEUU) y la cantidad adecuada del aceite esencial de orégano (AE) (Lote A3490: carvacrol (20-40%); timol (14-30%);  $\gamma$ -terpineno (10-25%);  $\rho$ -cimeno (4-21%), Herbes del Molí, Alicante, España), para obtener una ratio polímero-AE de 1:1 y 1:0.5. Las disoluciones fueron homogeneizadas con un rotor-stator (Ultraturrax DI 25 basic-Yellowline, Janke & Kunkel, Staufen, Alemania) a 13.500 rpm durante 4 minutos. Y se desgasificaron a vacío (Diaphragm Vacuum Pump MZ2CNT, Vacuubrand, Alemania).

Las FFR se vertieron en placas Petri manteniendo constante la densidad de sólidos superficiales (30 g sólidos/m<sup>2</sup>). Se dejaron secar en condiciones atmosféricas (20 °C, 54% HR) durante 72 h hasta obtener los films, que se almacenaron en desecadores con Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Panreac, Castellar del Vallés, España).

Para determinar el contenido en agua de las muestras equilibradas en Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, éstas se almacenaron en desecadores con P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (Panreac, 468754, Castellar del Valles, España) y se pesaron periódicamente en una balanza de precisión ( $\pm$  0.00001, Sartorius, España).

#### Caracterización del aceite esencial

El aceite esencial de orégano fue inyectado en un tubo Tenax® que fue introducido en un Termo desorbedor Turbo Matrix TD (Perkin Elmer, EEUU) acoplado en serie a un cromatografo de gases GC-MS (Trace GC 2000. ThermoQuest) equipado con una columna DBWax (SGE) (60m x 0.35mm; 1 $\mu$ m) y un espectrómetro de masas (Finnigan TRACE MS, software Xcalibur). Las condiciones de desorción fueron: 240 °C a 10 minutos, con una temperatura de inyección de 250 °C. Los compuestos fueron arrastrados por un gas portador (He, 1mL min<sup>-1</sup>). Las condiciones cromatográficas fueron: 40 °C durante 2min y calentamiento hasta 190 °C (4 °C/min) hasta alcanzar los 190 °C donde se mantuvo 25 min. A continuación, se aplicó una segunda rampa de calentamiento hasta 230 °C (10 °C/min), que se mantuvo 5 min.

#### Estimación de pérdidas de compuestos volátiles

Para la estimación del contenido en compuestos volátiles de los films se siguió el procedimiento descrito por Cerisuelo et al. (2012). Una porción de 1 cm<sup>2</sup> de film fue colocado en el tubo Tenax® de desorción (220 °C, 7 minutos) conectado al equipo GC-MS mediante una corriente de Helio a 230°C. Las condiciones cromatográficas fueron: helio como gas portador y 45 °C-7 min y calentamiento hasta alcanzar los 220 °C (18 °C/min) y 12 min a 220 °C. Una vez separados los distintos compuestos, éstos pasan al MS para su detección y cuantificación.

Por otro lado, se analizó el contenido en volátiles de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFR) y de los films disueltos, después de su acondicionamiento, en agua destilada de tal manera que se igualó la composición teórica igual a la de las FFR. Tanto en las FFR como en los films disueltos se analizó la cantidad equivalente a un film seco y acondicionado de 1 cm<sup>2</sup>. Dichas cantidades fueron introducidas en el tubo de arrastre junto con 300 µL de patrón 2-pentanol (Fluka, Alemania) de concentración conocida (100 mg/L). Se procedió al arrastre con N<sub>2</sub> (100mL/min) en un baño termostático (Grant GD100, UK) durante 30 min a 80 °C, colocando en el extremo del tubo el tubo Tenax® que se pasó al desorbedor (240 °C, 10 min) conectado al GC-MS mediante una corriente de Helio a 240°C. Las condiciones cromatográficas fueron: 40 °C durante 2 min, calentamiento hasta 90 °C (4 °C/min) hasta alcanzar los 90 °C donde se mantuvo 1 min. A continuación, se aplicó una segunda rampa de calentamiento hasta 220 °C (18 °C/min), que se mantuvo 12 min. Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

### Ensayos de migración

Los ensayos de migración se realizaron con 4 simulantes alimentarios (RD 866/2008, UE N°10/2011): simulante A, agua bidestilada (alimentos acuosos con pH>4.5); simulante B, ácido acético al 3 % (p/v) en solución acuosa (alimentos acuosos con pH<4.5); simulante C, etanol al 10 % (v/v) (Panreac, 484922, Castellar del Valles, España) en solución acuosa (alimentos alcohólicos); y simulante D, aceite refinado de girasol (Consum, Valencia, España) como simulante de alimentos grasos. Según lo descrito en el Reglamento (UE) N° 10/2011 para el ensayo de migración se tomaron films de 6 cm<sup>2</sup> que se introdujeron en viales con 10 mL de los simulantes y se almacenaron en estufas a temperatura controlada (JP Selecta, Barcelona, España). Los ensayos se realizaron en las peores condiciones de utilización previsible (20 °C y 40 °C y hasta 10 días de contacto). Para el análisis se adaptó el procedimiento descrito por Villa et al., (2007). A cada tiempo de almacenamiento, se tomaron 5 mL de simulante en contacto con el film, y se añadieron 4 mL de acetonitrilo (ACN, HPLC SuperGradient grade Scharlab S.L.). Los viales se introdujeron en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos (JP Selecta, Barcelona España) y se filtró con filtro de jeringuilla (0.45µm de poro). Se aforó a 10 mL con ACN. Finalmente, esta disolución se trasvasó a un vial de 2 mL para proceder a su inyección en un equipo HPLC integrado por una bomba e inyector (Waters 2685, Alliance) y un detector de fotodiodos (Waters 2996). Como eluyentes se utilizaron ACN y agua. El método se muestra en la Tabla 2. El detector de matriz de diodos escaneó desde 200 hasta 500 nm, y las adquisiciones cromatográficas fueron tomadas a 209.8 nm.

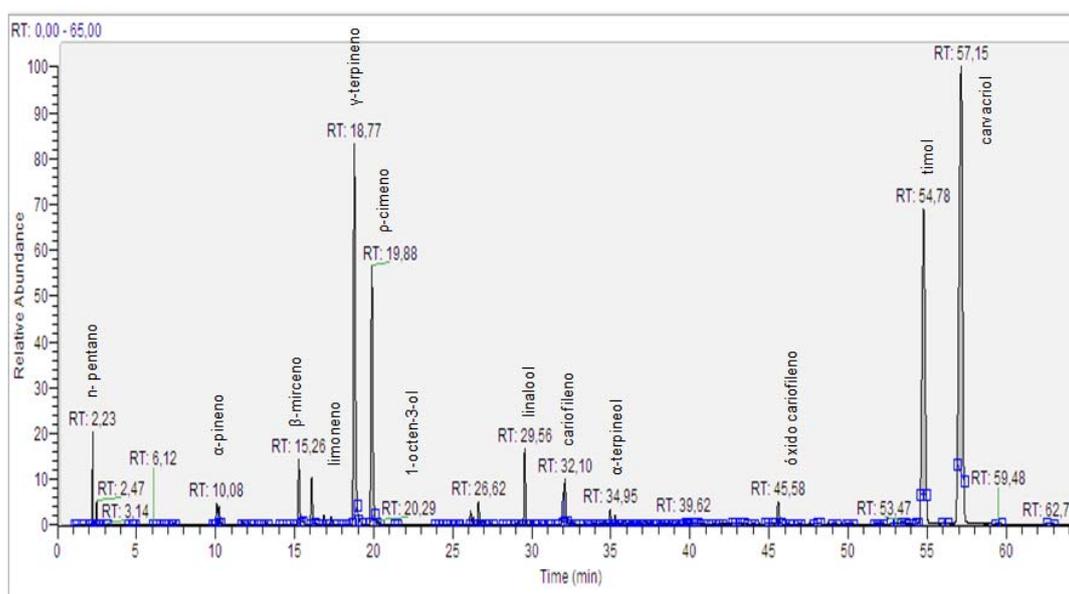
**TABLA 2.** Método HPLC.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	ACN (%)	Agua (%)
0.00	0.70	50	50
5.00	0.70	50	50
10.00	0.70	60	40
20.00	0.70	60	40
20.10	0.70	50	50
22.00	0.70	50	50

La recta de calibrado (área versus concentración) fue realizada en triplicado a partir de disoluciones con diferentes concentraciones (v/v) de los patrones de carvacrol  $\geq 98\%$  y de timol  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) en metanol (HPLC Gradient grade, Scharlab S.L., España).

## RESULTADOS

El cromatograma típico y la composición del aceite esencial de orégano obtenido mediante GC-MS se muestran en la Figura 1.



**FIGURA 1.** Cromatograma GC-MS típico del AE de orégano (*Oreganum compactum*).

En el cromatograma se ha indicado sobre cada pico los compuestos que se identificaron y el tiempo de retención (RT). En la Tabla 3, se muestra para cada compuesto su concentración en términos relativos (Área compuesto/Área total) y el punto de ebullición obtenido en bibliografía (Stetcher et al., 1968).

**TABLA 3.** Composición del AE de orégano (*Oreganum compactum*) obtenida en este estudio y en bibliografía.

Compuesto (punto de ebullición)	C (% fracción del área total)			
	Este estudio	Mezzoug et al., (2007)	Bouhdid et al., (2008)	Babili et al., (2011)
α-pineno (156 °C)	0.16	1.15	0.71	0.62
α-felandreno (171 °C)	-	0.40	0.25	0.04
β-mirceno (167 °C)	2.29	2.58	1.87	0.33
Limoneno (176 °C)	0.35	0.51	0.37	-
γ-terpineno (183 °C)	16.78	22.90	18.20	1.1
ρ-cimeno (177 °C)	11.36	13.26	7.89	24.31
1-octen-3-ol (174 °C)	0.44	-	0.36	0.23
Linalool (198 °C)	2.49	2.91	1.73	0.57
Cariofileno (134 °C)	1.64	3.47	2.85	-
Terpineol (219 °C)	0.5	0.56	0.60	-
Borneol (213 °C)	-	0.38	0.25	0.03
Óxido cariofileno (280°C)	1.08	0.14	0.10	0.86
Timol (232 °C)	19.77	19.36	27.50	29.74
Carvacrol (238 °C)	31.73	22.00	30.53	36.46

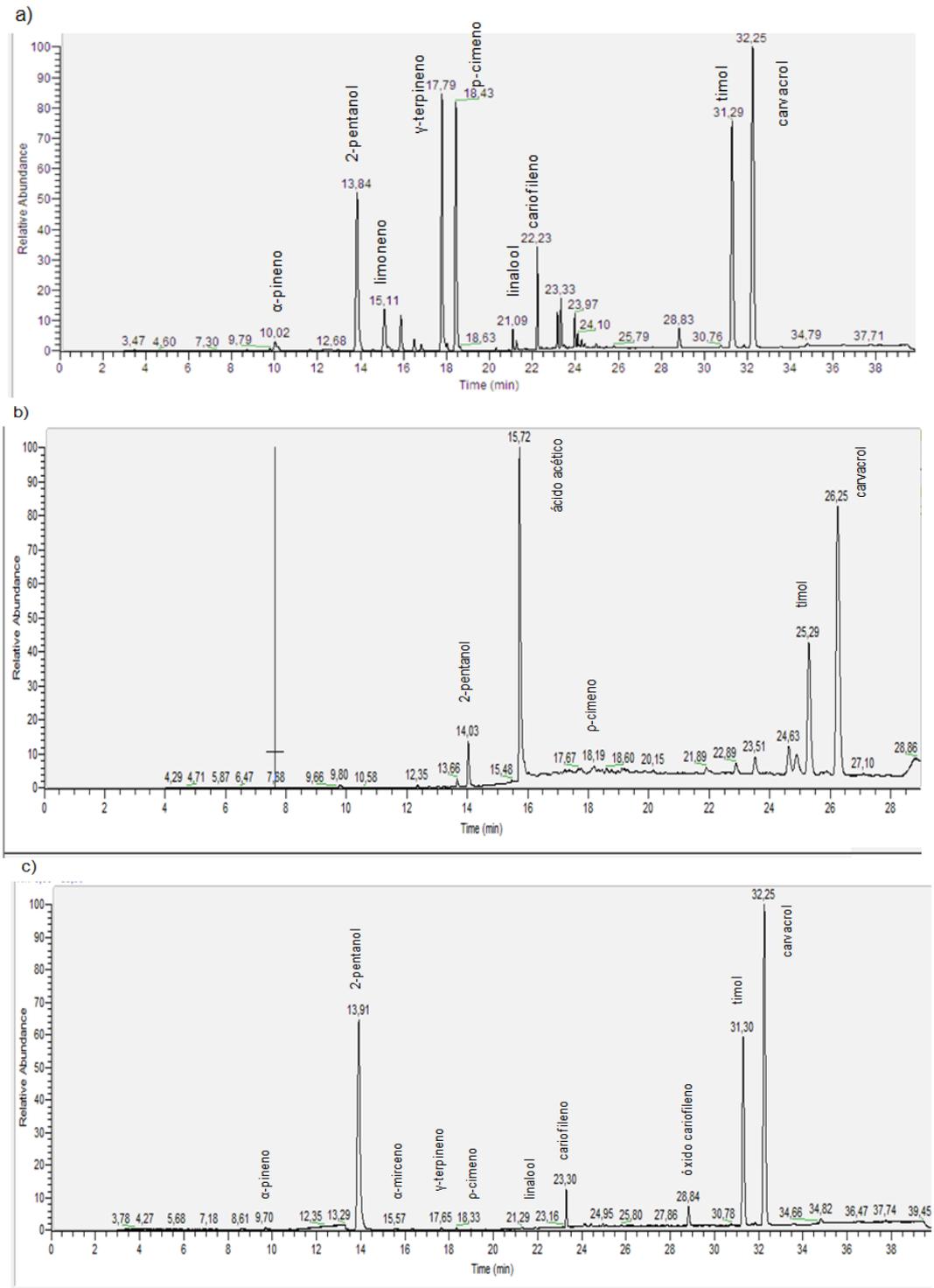
Las composiciones obtenidas para los compuestos mayoritarios en el AE utilizado en este estudio son las siguientes: 16.78% para el γ-terpineno, 11.36 % para el ρ-cimeno, 19.77 % para el timol y 31.73 % para el carvacrol. Dichas composiciones se encuentran en el rango recogido en la ficha técnica suministrada por el proveedor del AE. En la Tabla 3, se recogen también la composición encontrada por otros autores para AE de orégano de la misma especie. Se observa que a nivel cualitativo la composición es muy similar. Las diferencias observadas pueden deberse a numerosas variables relacionadas principalmente con el origen geográfico y factores agronómicos (Wogiatzi et al., 2009; Sánchez-González et al., 2011b). Es interesante señalar que en los tres estudios consultados, la proporción carvacrol:timol se encontró en un rango de 1.1-1.2 mientras que en este estudio dicha ratio fue de 1.6.

#### Retención y pérdidas de aceite esencial de orégano

Se determinaron las pérdidas de AE por pérdida de peso tal y como se ha descrito anteriormente. Se obtuvo pérdidas del 82% ± 11%, sin diferencias significativas entre las diferentes formulaciones. Dichas pérdidas son notablemente superiores a las determinadas en estudios previos. Así, se obtuvieron unas pérdidas de aceite esencial de bergamota del 33% y unas pérdidas de limoneno del 39% (Sánchez-González et al., 2011a) y unas pérdidas de AE de canela del 46% (Perdones et al., 2014) en films con una proporción CH:AE de 1:0.5 y utilizando una concentración del 1% (p/p) de CH en la FFR. En el presente estudio, se ha utilizado una concentración de de polímero del 0.5% (p/p). La menor concentración de polímero da lugar a una disminución de la viscosidad aparente de las FFR. Además las mezclas CH:MC presentan una menor viscosidad que las FFR de CH puro (García et

al., 2004). Todo ello podría favorecer un aumento de las pérdidas de AE durante el secado y formación del film.

Por otro lado, se determinaron las pérdidas de AE mediante GC-MS, comparando el perfil de volátiles de la FFR antes del secado del film con el perfil del films después del secado (tanto en el film seco como en el film disuelto). En la Figura 2 se muestra el cromatograma típico de una de las FFR antes del secado del film, así como del film seco y del film disuelto, respectivamente.



**FIGURA 2.** Cromatograma GC-MS típico de (a) la FFR antes del secado (b) del film seco y (c) del film disuelto para la formulación MC-CH-O\_2.

Se observa que en la FFR (Figura 2a) aparecen la mayoría de los compuestos identificados en el AE (Figura 1). En el film seco y el film disuelto no se detectan algunos de los compuestos del AE pero los mayoritarios (carvacrol y timol) siguen presentes.

A partir de la comparación y análisis de los cromatogramas se estimaron las pérdidas de volátiles para todos los films (Tabla 4).

**TABLA 4.** Pérdidas de AE y de sus compuestos mayoritarios (%)\* referidas al contenido en las FFR antes del secado del film. Valores medios y desviación estándar entre paréntesis.

Compuesto	MC-O_1	MC-O_2	MC-CH-O_1	MC-CH-O_2
AE	73 (6) <sup>c</sup>	57 (1) <sup>a</sup>	65 (1) <sup>b</sup>	77 (4) <sup>c</sup>
$\rho$ -cimeno	99.2 (0.4) <sup>b</sup>	99.4 (0.03) <sup>b</sup>	95 (1) <sup>a</sup>	96 (1) <sup>a</sup>
Timol	63 (8) <sup>bc</sup>	43.8 (0.6) <sup>a</sup>	60 (5) <sup>b</sup>	72 (9) <sup>c</sup>
Carvacrol	40 (11) <sup>b</sup>	22 (3) <sup>a</sup>	36 (7) <sup>ab</sup>	61 (12) <sup>c</sup>

Superíndices diferentes en la misma fila (a, b, c) indican 95% diferencias significativas entre las formulaciones. \*  $\frac{\text{Área FFR}-\text{Área film seco}}{\text{Área FFR}} \times 100$

Las mayores pérdidas se registraron para el  $\rho$ -cimeno en coherencia con su menor punto de ebullición (177 °C) con respecto al del timol (232 °C) y al carvacrol (238 °C). Para el  $\rho$ -cimeno, la incorporación de CH en la FFR supuso un descenso significativo en las pérdidas durante el secado del film, probablemente por el efecto del CH en el aumento de la viscosidad de las FFR, tal y como se ha comentado anteriormente. Para el carvacrol y el timol, las pérdidas fueron significativamente menores y, aumentaron con el incremento de la proporción de AE en los films que incorporaron CH. Una tendencia similar fue obtenida en estudios previos, con formulaciones de CH y diferentes proporciones de aceite esencial de bergamota (Sánchez-González et al., 2011a).

La Tabla 5 muestra las pérdidas de AE y de sus compuestos mayoritarios que se obtienen cuando se compara el perfil de volátiles del film seco disuelto y el de las formulaciones. Al disolver el film, se pudieron identificar un mayor número de compuestos y estimar así también sus pérdidas. En general, para las pérdidas de AE se mantuvieron las tendencias que se muestran en la Tabla 4. En el caso del timol y carvacrol, mediante esta metodología se obtuvieron mayores pérdidas, no existiendo diferencias significativas entre las formulaciones por la gran variabilidad obtenida en las determinaciones.

**TABLA 5.** Pérdidas de AE y de sus compuestos mayoritarios (%)\* obtenidas comparando el film disuelto y las FFR antes del secado del film. Valores medios y desviación estándar entre paréntesis.

Compuesto	MC-O_1	MC-O_2	MC-CH-O_1	MC-CH-O_2
AE	76 (4) <sup>a</sup>	64 (13) <sup>a</sup>	68 (4) <sup>a</sup>	69 (5) <sup>a</sup>
α-pineno	77 (5) <sup>a</sup>	88 (14) <sup>a</sup>	86 (12) <sup>a</sup>	76 (13) <sup>a</sup>
α-mirceno	96 (6) <sup>a</sup>	99.4 (0.4) <sup>a</sup>	97 (2) <sup>a</sup>	100 (0) <sup>a</sup>
2-caren	99.1 (1.5) <sup>a</sup>	98.1 (0.8) <sup>a</sup>	97 (2) <sup>a</sup>	100 (0) <sup>a</sup>
limoneno	90 (11) <sup>a</sup>	98.9 (1.4) <sup>a</sup>	92 (7) <sup>a</sup>	99 (2) <sup>a</sup>
γ-terpineno	95 (8) <sup>a</sup>	99.1 (0.6) <sup>a</sup>	97 (4) <sup>a</sup>	99.5 (0.4) <sup>a</sup>
p-cimeno	94 (9) <sup>a</sup>	99.3 (0.8) <sup>a</sup>	97 (4) <sup>a</sup>	99.6 (0.3) <sup>a</sup>
1-octano-3-ol	97 (6) <sup>a</sup>	99.6 (0.8) <sup>a</sup>	98 (4) <sup>a</sup>	99.8 (0.4) <sup>a</sup>
benceno-1-metil-4-(1-metiletenil)	77 (7) <sup>a</sup>	88 (9) <sup>b</sup>	74 (3) <sup>a</sup>	83 (2) <sup>ab</sup>
linalool	97 (5) <sup>a</sup>	99.1 (0.8) <sup>a</sup>	97 (4) <sup>a</sup>	99.3 (0.7) <sup>a</sup>
3-ciclohexeno-1-ol,4-metil-1-(1-metiletil)	98 (4) <sup>a</sup>	87 (19) <sup>a</sup>	70 (47) <sup>a</sup>	99.2 (1.0) <sup>a</sup>
cariofileno	91 (7) <sup>a</sup>	87 (15) <sup>a</sup>	73 (26) <sup>a</sup>	69 (12) <sup>a</sup>
benzeno,1-metoxi-4-(2-propenil)	97 (4) <sup>a</sup>	97 (3) <sup>a</sup>	97 (3) <sup>a</sup>	98.8 (0.4) <sup>a</sup>
α-terpineol	97 (3) <sup>a</sup>	95 (4) <sup>a</sup>	86 (8) <sup>a</sup>	92 (8) <sup>a</sup>
borneol	96 (6) <sup>b</sup>	95 (4) <sup>b</sup>	77 (14) <sup>a</sup>	95 (3) <sup>b</sup>
óxido cariofileno	95 (1) <sup>b</sup>	65 (23) <sup>ab</sup>	67 (11) <sup>ab</sup>	51 (20) <sup>a</sup>
timol	87 (2) <sup>b</sup>	60 (18) <sup>a</sup>	70 (5) <sup>ab</sup>	67 (12) <sup>ab</sup>
carvacrol	81 (3) <sup>b</sup>	46 (24) <sup>a</sup>	61 (8) <sup>ab</sup>	57 (16) <sup>ab</sup>

Superíndices diferentes en la misma fila (a, b, c) indican 95% diferencias significativas entre las formulaciones. \*  $\frac{\text{Área FFR}-\text{Área film disuelto}}{\text{Área FFR}} \times 100$

### Ensayos de migración en simulantes alimentarios

Las Tablas 6 y 7 muestran para cada uno de los simulantes utilizados, después de diferentes tiempos de contacto film-simulante, y dos temperaturas de almacenamiento la concentración en el simulante de carvacrol y de timol, respectivamente. Para la cuantificación se obtuvieron las rectas patrón de carvacrol ( $R^2 = 0.9857$ ) y de timol ( $R^2 = 0.9478$ ). Los

tiempos de contacto fueron escogidos de acuerdo con el Reglamento (UE) N° 10/2011.

Después de 5 minutos de contacto (C<sub>1</sub>), sólo se pudo detectar carvacrol y timol en los films MC-O\_1 y MC-O\_2, que se disolvieron completamente transcurridos 5 minutos. Por ello, en dichos films no se realizaron determinaciones a tiempos intermedios. Por otra parte, los films de MC-CH-O\_1 y MC-CH-O\_2 mostraron una menor solubilidad en todos los simulantes y la primera determinación se realizó a las 2 horas de contacto film-simulante (C<sub>2</sub>).

**TABLA 6.** Concentración de carvacrol (mg/Kg simulante) para cada uno de los simulantes y tiempo de contacto.

	MC-O_1		MC-O_2		MC-CH-O_1		MC-CH-O_2	
	20°C	40°C	20°C	40°C	20°C	40°C	20°C	40°C
<b>Agua</b>								
C <sub>1</sub>	61 (2)		18.1 (0.8)		*	*	*	*
C <sub>2</sub>	*	*	*	*	2.7 (0.7)	13.2 (0.7)	69 (9)	19 (9)
C <sub>3</sub>	64 (5) <sup>bx</sup>	57 (6) <sup>bx</sup>	35 (8) <sup>ax</sup>	26 (6) <sup>ax</sup>	57 (12) <sup>ax</sup>	6.5 (0.7) <sup>ax</sup>	66 (12) <sup>bw</sup>	60 (5) <sup>bw</sup>
<b>Acético 3%</b>								
C <sub>1</sub>	52 (4)		15.1 (0.3)		nd	nd	nd	nd
C <sub>2</sub>	nd	nd	nd	nd	24 (10)	35 (10)	33 (8)	97 (7)
C <sub>3</sub>	28 (8) <sup>cx</sup>	43 (7) <sup>cx</sup>	24 (10) <sup>cx</sup>	17 (5) <sup>cx</sup>	78 (4) <sup>az</sup>	76 (4) <sup>az</sup>	132 (3) <sup>bx</sup>	142 (3) <sup>bx</sup>
<b>Etanol 10%</b>								
C <sub>1</sub>	54 (4)		18 (3)		nd	nd	nd	nd
C <sub>2</sub>	nd	nd	nd	nd	3 (2)	10.9 (0.9)	3.7 (1.4)	71 (23)
C <sub>3</sub>	22 (13) <sup>ax</sup>	63 (2) <sup>ax</sup>	18 (6) <sup>bx</sup>	24 (10) <sup>bx</sup>	8 (5) <sup>abxy</sup>	65.1 (0.9) <sup>abxy</sup>	20 (12) <sup>ay</sup>	256 (7) <sup>ay</sup>
<b>Aceite</b>								
C <sub>1</sub>	6 (2)		18.3 (1.0)		nd	nd	nd	nd
C <sub>2</sub>	nd	nd	nd	nd	15.3 (0.4)	5 (3)	6 (3)	3 (4)
C <sub>3</sub>	44 (15) <sup>cx</sup>	16.0 (1.2) <sup>cx</sup>	28 (9) <sup>cx</sup>	25 (3) <sup>cx</sup>	53 (13) <sup>ay</sup>	48 (6) <sup>ay</sup>	79 (5) <sup>bz</sup>	75 (5) <sup>bz</sup>

C<sub>1</sub>: 5 minutos; C<sub>2</sub>: 2 horas; C<sub>3</sub>: 10 días; nd: No detectado.

Superíndices diferentes indican diferencias significativas por efecto de la formulación (a, b, c) o del simulante (w, x, y, z) (p<0.05).

**TABLA 7.** Concentración de timol (mg/Kg simulante) para cada uno de los simulantes y tiempo de contacto.

	MC-O_1		MC-O_2		MC-CH-O_1		MC-CH-O_2	
	20°C	40°C	20°C	40°C	20°C	40°C	20°C	40°C
<b>Agua</b>								
C <sub>1</sub>	26.7 (0.2)		12 (7)		nd	nd	nd	nd
C <sub>2</sub>	nd	nd	nd	nd	5 (7)	3 (3)	22 (13)	8 (4)
C <sub>3</sub>	27 (2) <sup>ax</sup>	24 (3) <sup>ax</sup>	15 (4) <sup>bx</sup>	11 (3) <sup>bx</sup>	18 (13) <sup>bx</sup>	2 (0) <sup>bx</sup>	23 (10) <sup>abx</sup>	22 (6) <sup>abx</sup>
<b>Acético 3%</b>								
C <sub>1</sub>	22 (2)		11 (10)		nd	nd	nd	nd
C <sub>2</sub>	nd	nd	nd	nd	14 (8)	11 (8)	15 (4)	45 (5)
C <sub>3</sub>	30 (23) <sup>ax</sup>	20 (5) <sup>ax</sup>	9 (4) <sup>bx</sup>	6 (2) <sup>bx</sup>	35 (2) <sup>cy</sup>	55 (21) <sup>cy</sup>	61.1 (1.1) <sup>dy</sup>	65.9 (1.2) <sup>dy</sup>
<b>Etanol 10%</b>								
C <sub>1</sub>	23 (2)		7 (1)		nd	nd	nd	nd
C <sub>2</sub>	nd	nd	nd	nd	1.2 (0.6)	10 (10)	1.7 (0.7)	32 (11)
C <sub>3</sub>	29 (15) <sup>bx</sup>	26 (0) <sup>bx</sup>	22 (12) <sup>abx</sup>	14 (8) <sup>abx</sup>	3 (2) <sup>abx</sup>	26 (4) <sup>abx</sup>	5 (5) <sup>az</sup>	10 (3) <sup>az</sup>
<b>Aceite</b>								
C <sub>1</sub>	2.3 (0.9)		7.5 (0.9)		nd	nd	nd	nd
C <sub>2</sub>	nd	nd	nd	nd	23 (6)	23 (5)	nd	nd
C <sub>3</sub>	4 (6) <sup>ay</sup>	10 (9) <sup>ay</sup>	11 (4) <sup>ax</sup>	10 (1) <sup>ax</sup>	7 (6) <sup>ax</sup>	5 (3) <sup>ax</sup>	18 (6) <sup>bx</sup>	19 (3) <sup>bx</sup>

C<sub>1</sub>: 5 minutos; C<sub>2</sub>: 2 horas; C<sub>3</sub>: 10 días; nd: No detectado.

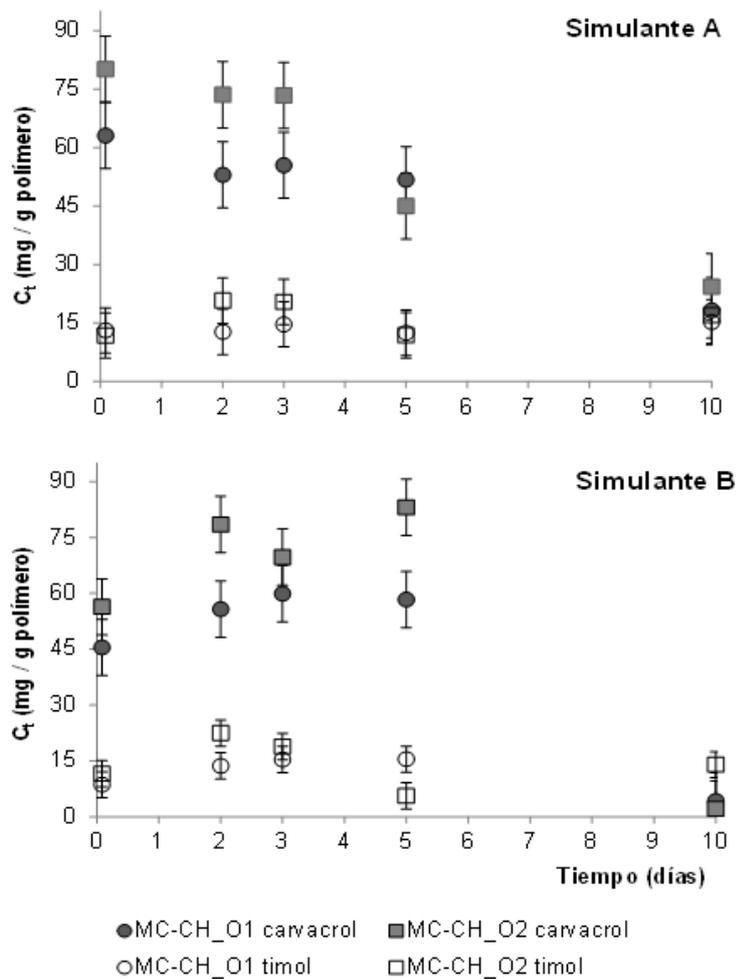
Superíndices diferentes indican diferencias significativas por efecto de la formulación (a, b, c) o del simulante (w, x, y, z) (p<0.05).

Los valores después de 10 días (C<sub>3</sub>), donde se pudieron obtener datos a las dos temperaturas y para todos los films y simulantes, fueron sometidos a un ANOVA multifactorial con interacciones triples. Los factores significativos fueron film y simulante así como la interacción entre ambos factores.

Se observan diferencias significativas, tanto para el carvacrol como para el timol, para cada simulante por efecto de las formulaciones. El efecto del simulante, para un mismo tipo de films, fue significativo en las formulaciones que incorporaron CH, haciéndose más evidente estas diferencias en los films MC-CH-O\_2, donde se obtuvo una migración significativamente mayor en el simulante B (ácido acético al 3%). El aumento de la solubilidad del CH en medio ácido y la mayor hidratación de la matriz polimérica podría explicar que se produzca una mayor migración hacia el simulante B. Por otra parte, en el simulante C (etanol 10%) y D (aceite refinado girasol), simulantes de alimentos grasos, o se observó una mayor migración a pesar de la mayor solubilidad del carvacrol y timol en medio apolar.

Por otra parte, se determinó el contenido en carvacrol y en timol en el film para cada uno de las formulaciones que incorporaron CH teniendo en cuenta la cantidad de ingrediente activo migrada en cada simulante y su contenido inicial en el film. El contenido en carvacrol inicial fue de 65.29 mg/g polímero y de 98.12 mg/g polímero para los films MC-CH-O\_1 y MC-CH-O\_2, respectivamente mientras que para el timol el contenido inicial fue de 17.28 mg/g polímero para la formulación MC-CH-O\_1 y de 30.55 mg/g polímero para la MC-CH-O\_2.

En la Figura 4 se muestra la concentración de carvacrol y de timol en el film (mg de ingrediente activo/g polímero) para cada tiempo de contacto simulante-film, para los simulantes agua (A) y ácido acético al 3% (B).



**FIGURA 4.** Contenido en carvacrol y en timol en el film a diferentes tiempos de contacto film-simulante a 20°C Valores medios e intervalos LSD al 95%.

Para todos los films, en medio acuoso (simulante A), el contenido en timol en el film se mantuvo prácticamente constante a lo largo del tiempo mientras que el carvacrol experimentó un descenso a lo largo del tiempo alcanzando a los 10 días valores próximos a los del timol, no existiendo diferencias significativas por efecto de las formulaciones.

Por otro lado, en el simulante B (ácido acético al 3%) la concentración de carvacrol y de timol se mantuvo prácticamente constante hasta los 5 días de almacenamiento. Para el carvacrol, se produjo un descenso hacia valores prácticamente nulos a tiempo 10 días, donde los valores se acercan a 0, mientras que el timol mantuvo un contenido en el film similar al inicial, no existiendo diferencias significativas por efecto del aumento del contenido de aceite esencial de orégano en el film.

La concentración de carvacrol y de timol en el film a distintos tiempos de contacto para el simulante C (etanol al 10%) se muestra en la Tabla 8.

**TABLA 8.** Concentración de carvacrol o de timol en el film para cada tiempo de contacto film-simulante C (etanol al 10%). Valores medios y desviación estándar entre paréntesis.

Tiempo (días)	Carvacrol (mg / g polímero)		Timol (mg / g polímero)	
	MC-CH-O_1	MC-CH-O_2	MC-CH-O_1	MC-CH-O_2
0.0833	62.9 (1.3) <sup>aw</sup>	94 (2) <sup>bw</sup>	16.3 (0.6) <sup>aw</sup>	28.7 (0.8) <sup>bw</sup>
0.17	50 (2) <sup>ax</sup>	73 (3) <sup>bx</sup>	10.9 (1.4) <sup>aw</sup>	20 (2) <sup>aw</sup>
0.33	49 (3) <sup>ax</sup>	75 (2) <sup>bx</sup>	10.7 (1.1) <sup>aw</sup>	21.4 (1.0) <sup>bw</sup>
10	59 (4) <sup>aw</sup>	89 (5) <sup>bw</sup>	12 (2) <sup>aw</sup>	28 (3) <sup>bw</sup>

Superíndices diferentes indican diferencias significativas por efecto de la formulación (a, b) o del tiempo (w, x) ( $p < 0.05$ ).

Se obtuvo un ligero descenso no significativo de la concentración de carvacrol y timol en el film para las dos matrices poliméricas. El aumento de la concentración de AE en el film dio lugar a un incremento del contenido en carvacrol y en timol en el film durante el almacenamiento ( $p < 0.05$ ).

La evolución del contenido en carvacrol y timol en el film para el simulante D (aceite de girasol) se muestra en la Tabla 9.

**TABLA 9.** Concentración de carvacrol o de timol en el film para cada tiempo de contacto film-simulante D (aceite de girasol). Valores medios y desviación estándar entre paréntesis.

Tiempo (días)	Carvacrol (mg / g polímero)		Timol (mg / g polímero)	
	MC-CH-O_1	MC-CH-O_2	MC-CH-O_1	MC-CH-O_2
0.0833	53.4 (0.3) <sup>aw</sup>	91 (2) <sup>bw</sup>	23.8 (0.1) <sup>aw</sup>	44 (3) <sup>bw</sup>
10	19 (3) <sup>ax</sup>	17 (6) <sup>ax</sup>	12 (5) <sup>aw</sup>	12 (7) <sup>ax</sup>

Superíndices diferentes indican diferencias significativas por efecto de la formulación (a, b) o del tiempo (w, x) ( $p < 0.05$ ).

Se obtuvo una disminución significativa del contenido en carvacrol y timol en el film al final del almacenamiento. El efecto de la formulación fue significativo durante el primer tiempo de contacto ( $p < 0.05$ ). Al final del almacenamiento, no existieron diferencias significativas por efecto del aumento del contenido en AE en el film.

## CONCLUSIONES

Las pérdidas globales de aceite esencial de orégano (*Origanum compactum*) en los films de metilcelulosa y de metilcelulosa-quitosano cuantificadas mediante GC-MS fueron del mismo orden de las obtenidas por pérdida de peso. Además, la metodología GC-MS utilizada permitió determinar las pérdidas para los ingredientes mayoritarios del aceite esencial: carvacrol y timol. Dichas pérdidas fueron significativamente menores que las globales y no se vieron afectadas significativamente por la composición de la matriz polimérica. Los ensayos de migración mostraron una disminución del contenido de carvacrol y de timol en los films que incorporaron quitosano después de 10 días de almacenamiento, sobre todo en agua y ácido acético al 3% donde se produce la hidratación de la matriz polimérica.

## REFERENCIAS

- Altintas, A.; Tabanca, N.; Tyihác, E.; Ott, P.G.; Móricz, A.M.; Mincsovcics, E.; Wedge, D.E., 2013. Characterization of volatile constituents from *Origanum onites* and their antifungal and antibacterial activity. *J AOAC Int* 96(6), 1200-8.
- Babili, F. E., Bouajila, J., Souchard, J. P., Bertrand, C., Bellvert, F., Fouraste, I., Moulis, C. and Valentin, A., 2011. Oregano: Chemical Analysis and Evaluation of Its Antimalarial, Antioxidant, and Cytotoxic Activities. *Journal of Food Science* 76, C512–C518
- Bektas Tepe, Munevver Sokmen; 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, 447-454.
- Ben Arfa, A.; Combes, S.; Preziosi-Belloy, L.; Gontard, N.; Chalier, P., 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology* 43, 149–154.
- Ben Arfa, A.; Chalier, P.; Preziosi-Belloy, L.; Gontard, N., 2007. Antimicrobial paper based on a soy protein isolate or modified starch coating including carvacrol and cinamaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 2155–2162.
- Bouhdid, S.; Skali, S. N.; Idaomar, M.; Zhiri, A.; Baudoux, D.; Amensour, M.; Abrini, J., 2008. Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (10), 1563-1570.
- Burt, S., 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223-253.
- Cerisuelo, J.P.; Muriel-Galet, V.; Bermúdez, J.M.; Aucejo, S.; Catalá, R.; Gavara, R.; Hernández-Muñoz, P., 2012. Mathematical model to describe the release of an antimicrobial agent from an active package constituted by carvacrol in a hydrophillic EVOH coating on a PP film. *Journal of Food Engineering* 110, 26–37.
- DIRECTIVA 97/48/CE DE LA COMISIÓN de 29 de julio de 1997 por la que se modifica por segunda vez la Directiva 82/711/CEE del Consejo que establece las normas de base necesarias para la verificación de la migración de los componentes de los materiales y objetos de materia plástica destinados a entrar en contacto con productos alimenticios.
- Emiroglu, Z.K.; Yemis, G.P.; Coskun, B.K.; Candogan, K., 2010. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science* 86(2), 283-288.
- Fasseas, M.K.; Mountzouris, K.C.; Tarantillis, P.A.; Polissiou, M.; Zervas, G., 2007. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chemistry* 106, 1188-1194.
- García, M.A.; Pinotti, A.; Martino, N.M.; Zaritzky, N. E., 2004. Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymers* 56, 395-345.

- Gutiérrez, J.; Barry-Ryan, C.; Bourke, P., 2009. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology* 26, 142-150.
- Han, J.H. and Gennadios, A., 2005. Edible films and coatings: a review. *In Innovations in Food Packaging (II edition)*, 213-255.
- Bonilla, J.; Talón, M.; Atarés, L., Vargas, M., Chiralt, A., 2013. Effect of the incorporation of antioxidants on physicochemical and antioxidant properties of wheat starch–chitosan films. *Journal of Food Engineering* 118, 271–278.
- Bonilla, J.; Atarés, L., Vargas, M., Chiralt, A., 2014. Effect of Chitosan Essential Oil Films on the Storage-Keeping Quality of Pork Meat Products. *Food Bioprocess Technol* 7, 2443–2450.
- Jiullin Wu; Shangying Ge; Hui Liu; Shuang Wang; Shanfei Chen; Jianhua Wang; Jianhua Li; Qiqing Zhang., 2014. Properties and antimicrobial activity of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin-chitosan films incorporated with oregano essential oil for fish preservation. *Food Packaging and Shelf Life* 2, 7-16.
- López, P.; Sánchez, C.; Batlle, R.; Nerín, C., 2007. Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8814–8824.
- Mascheroni, E.; Guillard, V.; Gastaldi, E.; Gontard, N.; Chalier, P., 2011. Anti-microbial effectiveness of relative humidity-controlled carvacrol release from wheat gluten/montmorillonite coated papers. *Food Control* 22, 1582-1591.
- Mezzoug, M.; Elhadri, A.; Dallouh, A.; Amkiss, S.; Skali, N.S.; Abrini, J.; Zhiri, A.; Baodoux, D.; Diallo, B.; El Jaziri, M.; Idaomar, M., 2007. Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 629, 100–110.
- Monedero, F. M.; Hambleton, A.; Talens, P.; Debeaufort, F.; Chiralt, A.; Voilley, A., 2010. Study of the retention and release of n-hexanal incorporated into soy protein isolate-lipid composite films. *Journal of Food Engineering* 100, 133–138.
- Ouattara, B.; Simard, R.E.; Piette, G., Begin, A.; Holley, R.A., 2000. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology* 62, 139–148.
- Perdones, A.; Sánchez-González, L.; Chiralt, A.; Vargas, M., 2012. Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. *Postharvest Biology and Technology* 70, 32-71.
- Perdones, A.; Vargas, M.; Atarés, L.; Chiralt, A., 2014. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan-cinnamon leaf oil films as affected by oleic acid. *Food Hydrocolloids* 36, 256-264.
- Ramos, M.; Beltrán, A.; Peltzer, M.; Valente, A.; Garrigós, M.C., 2014. Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. *LWT-Food Science and Technology* 58, 470-477.
- RD 866/2008 de 23 de mayo de 2008 por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo.
- REGLAMENTO (UE) N° 10/2011 DE LA COMISIÓN de 14 de enero de 2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos.
- Rodríguez, A.; Batlle, R.; Nerin, C., 2007. The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging. Part II. *Progress in organic coatings* 60, 33-38.
- Sánchez-González, L.; Vargas, M.; González-Martínez, C.; Cháfer, M.; Chiralt, A., 2009. Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil. *Food Hydrocolloids* 23, 2102-2109.
- Sánchez-González, L.; Cháfer, M.; González-Martínez, C.; Chiralt, A.; Desobry, S., 2011a. Study of the release of limonene present in chitosan films enriched with bergamot oil in food simulants. *Journal of Food Engineering* 105, 138–143.
- Sánchez-González, L.; Vargas, M.; González-Martínez, C.; Chiralt, A.; Cháfer, M., 2011b. Use of Essential Oils in Bioactive Edible Coatings. *Food Eng. Rev.* 3, 1–16.
- Stetcher, P.G.; Windholz, M.; Leahy, D.S., 1968. The Merk Index. Merk and Co., Inc. Rahway, N.J., EEUU.

- Tomaino, A.; Cimino, F.; Zimbalatti, V.; Venuti, V.; Sulfaro, V.; De Pasquale, A.; Saija, A., 2005. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chemistry* 89, 549-554.
- Villa, C.; Gambaro, R.; Mariani, E.; Dorato, S., 2007. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of 24 fragrance allergens to study scented products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44, 755-762.
- Wogiatzi, E.; Gougoulas, N.; Papachatzis, A.; Vagelas, I.; Chouliaras, N., 2009. Greek oregano essential oils production, cytotoxicity and antifungal activity. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 1150-1152.
- Wu, Y.; Luo, Y.; Wang, Q., 2012. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. *LWT-Food Science and Technology* 48, 283-290.