



**TESIS DOCTORAL**

**COMPUESTOS BIOACTIVOS EN EXTRACTOS DE  
PLANTAS AROMÁTICAS Y MEDICINALES DE LA DEHESA  
EXTREMEÑA**

**D. FRANCISCO RAMIRO BOY MENDO**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA DE LOS  
ALIMENTOS**

Conformidad de la directora y codirectoras

**María José Benito Bernáldez, Rocío Casquete Palencia y María de Guía Córdoba Ramos**

Esta tesis cuenta con la autorización de la directora y codirectoras de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.



**Gracias a la vida**, ese espacio  
maravilloso que comparto y compartí con las personas  
que contribuyeron para escribir esta tesis,  
**muchísimas gracias.**



**“El pasado es importante, pero más aún,  
compartir con la familia”**

**Con amor para ustedes.....**



## ÍNDICE

---





<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
1.- PLANTAS AROMÁTICAS Y MEDICINALES.....	15
1.1.- PLANTAS AROMÁTICAS Y MEDICINALES DE LA DEHESA EXTREMEÑA.....	16
2.- COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LAS PLANTAS.....	36
2.1.- COMPUESTOS FENÓLICOS.....	36
2.2.- TERPENOS Y TERPENOIDES.....	40
2.3.- COMPUESTOS BIOACTIVOS PRESENTES EN LAS PLANTAS AROMÁTICAS Y MEDICINALES DE LA DEHESA DE EXTREMADURA.....	42
3.- PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LAS PLANTAS.....	49
3.1.- ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	49
3.2.- ACTIVIDAD CARDIOPROTECTORA.....	52
3.3.- ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA.....	53
3.4.- ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA.....	56
3.5.- ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	57
3.6.- OTRAS BIOACTIVIDADES DE LOS COMPUESTOS.....	61
4.- MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS.....	64
5.- USOS DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA, TENDENCIAS: ACEITES ESENCIALES.....	66
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>71</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>75</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>85</b>
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>87</b>
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>103</b>
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>121</b>
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	<b>135</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>147</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>151</b>



## Índice Figuras

Figura 1. Distribución de la familia <i>Cistaceae</i> en la Región Mediterránea.....	18
Figura 2. <i>Cistus ladanifer</i> .....	19
Figura 3. <i>Cistus albidus</i> .....	20
Figura 4. <i>Cistus salviifolius</i> .....	21
Figura 5. <i>Cistus multiflorus</i> .....	22
Figura 6. <i>Lavandula stoecha</i> .....	23
Figura 7. <i>Calendula officinalis</i> .....	24
Figura 8. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	26
Figura 9. <i>Crataegus monogyna</i> .....	27
Figura 10. <i>Malva sylvestris</i> L.....	28
Figura 11. <i>Rubus ulmifolius</i> .....	30
Figura 12. <i>Quercus ilex</i> .....	31
Figura 13. <i>Morus alba</i> L.....	32
Figura 14. <i>Ulmus minor</i> Mill.....	33
Figura 15. <i>Asparagus officinalis</i> L.....	34
Figura 16. <i>Urginea maritima</i> .....	35
Figura 17. Ácidos benzoicos y cinámicos.....	37
Figura 18. Estructura flavonoides.....	38
Figura 19. Estructura de los principales flavonoles.....	39
Figura 20. Estructura estilbeno.....	39
Figura 21. Estructura básica de los terpenos.....	40
Figura 22. Estructura monoterpenos fenólicos.....	41
Figura 23. Estructura diterpenos.....	41
Figura 24. Estructura triterpenos.....	42
Figura 25. Estructura tetraterpenos.....	42
Figura 26. Procesos de extracción asistida por ultrasonido (EAU).....	65
Figura 27. Quince especies de plantas aromáticas recolectadas en la Dehesa de Extremadura.....	77
Figura 28. Especies de microorganismos utilizados durante el estudio.....	78
Figura 29. Diseño experimental del capítulo 1, publicación 1.....	79
Figura 30. Diseño experimental del capítulo 2, publicación 2.....	81
Figura 31. Diseño experimental del capítulo 3, publicación 3.....	83



## **RESUMEN**

---



Las plantas aromáticas son un grupo de plantas cuyos compuestos activos están constituidos, total o parcialmente, por esencias, representando alrededor del 0,7% del total de plantas medicinales. Sus extractos han sido utilizados con diversos fines, así como en medicina, alimentación, cosmética, farmacia y perfumería debido a su fuerte actividad antioxidante ya que contienen polifenoles, vitamina E, selenio, vitamina C,  $\beta$ -caroteno, luteína, licopeno, y otros carotenoides que juegan un papel fundamental en la adsorción y neutralización de radicales libres para mejorar la salud humana, frenando el desarrollo de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como el cáncer, la diabetes o la enfermedad de Alzheimer. Estas plantas se consideran una opción de futuro, especialmente para zonas con cualidades especiales (montañosas, matorrales, zonas áridas moderadas, etc.) donde los cultivos convencionales no son viables o rentables.

La Dehesa de Extremadura es una región española declarada Reserva de la Biosfera por la UNESCO y se caracteriza por ser un ecosistema muy diverso. Se puede encontrar una gran heterogeneidad de plantas aromáticas y medicinales. Entre ellas destacan *Calendula officinalis*, *Lavandula stoechas*, *Crataegus monogyna*, *Malva sylvestris*, *Rosmarinus officinalis*, *Asparagus* sp., *Cistus ladanifer*, *C. multiflorus*, *C. albidus*, *C. salviifolius*, *Morus alba*, *Ulmus* sp., *Urginea maritima*, *Rubus ulmifolius* y *Quercus ilex*. Los extractos obtenidos de estas plantas han sido destacados por sus propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, hepatoprotectoras, antidiabéticas, anticancerígenas, gastroprotectoras, antioxidantes y citotóxicas, es decir, sus actividades funcionales.

En esta **Tesis Doctoral** el **objetivo general** es la revalorización de plantas aromáticas autóctonas de la Dehesa Extremeña mediante la búsqueda de estrategias que permitan obtener compuestos bioactivos de las plantas para su uso en alimentación, con el objetivo de obtener productos sanos y seguros, favoreciendo la sostenibilidad del entorno de la Dehesa Extremeña.

Para la consecución de este objetivo general, la tesis se ha dividido en 3 capítulos en los que se abordan los diferentes **objetivos específicos**. En el

**capítulo 1** se realizó la selección de plantas aromáticas, escasamente estudiadas y obtenidas de la Dehesa Extremeña, cuyos extractos fenólicos poseían las mejores características funcionales, como antioxidante antihipertensivas y antimicrobianas, frente a 6 bacterias patógenas y 4 levaduras alterantes. Estos extractos fueron obtenidos mediante dos métodos, agitación y ultrasonido, que fueron estudiados para comprobar cuál era el método más eficaz y el que conservaba las características funcionales de los mismos. En el **capítulo 2**, se evaluaron los compuestos presentes en las plantas autóctonas de la Dehesa, encina, olmo, zarzamora y jara blanca, identificando los compuestos presentes en cada extracto y posteriormente ensayó su actividad antifúngica frente a dos cepas de micotoxigénicas de *Aspergillus flavus*, así como su influencia en la producción de aflatoxinas AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>2</sub> y la expresión de genes relacionados con estas micotoxinas. Y, finalmente, en el **capítulo 3**, se elaboraron aceites esenciales obtenidos de 6 plantas aromáticas autóctonas de la Dehesa Extremeña, y se estudió el efecto antimicrobiano frente a las 6 bacterias patógenas, las 4 levaduras alterantes y los 2 mohos productores de aflatoxinas, tanto en su crecimiento como en la producción de micotoxinas para el caso de los mohos.

Para el desarrollo de la Tesis se utilizaron 15 especies vegetales de la Dehesa y microorganismos de alimentos: 6 bacterias patógenas, 4 levaduras alterantes y 2 mohos micotoxigénicos.

En el Capítulo 1, se llevó a cabo un estudio de selección de plantas aromáticas de la Dehesa cuyos extractos, obtenidos por diferentes métodos de extracción, tenían las mejores características funcionales. Por lo tanto, se evaluaron los extractos fenólicos obtenidos mediante agitación o ultrasonido, analizando la influencia del método en las actividades antioxidantes, antihipertensivas y antimicrobianas, en bacterias y levaduras, de los extractos obtenidos. Los resultados mostraron que en general, cuando se compararon los **métodos de extracción** utilizados para obtener compuestos fenólicos, se observó que existían diferencias significativas, encontrándose los valores más altos en la extracción por **ultrasonidos**. Además, los extractos obtenidos de *Cistus albidus*, *Cistus salviifolius*, *Rubus ulmifolius* y *Quercus ilex* fueron los que presentaron **mayores concentraciones de compuestos fenólicos**. La **actividad antioxidante**



fue mayor en los extractos de *Cistus* y *Q. ilex* obtenidos por ultrasonidos, al igual que la **actividad antihipertensiva**. La **actividad antimicrobiana** también resultó ser mayor en los extractos obtenidos por **ultrasonidos**. Además, para **bacterias** los extractos de las plantas de *C. salviifolius* y *Q. ilex* fueron más efectivos y para las **levaduras** los de *C. ladanifer*.

Para el desarrollo del Capítulo 2, se evaluaron los compuestos presentes en las plantas autóctonas de la Dehesa, encina, olmo, zarzamora y jara blanca. Se utilizaron estas plantas al ser algunas de las que mejores resultados obtuvieron frente a eucariotas en el ensayo anterior. Se identificaron los compuestos presentes en cada extracto y posteriormente se ensayó su actividad antifúngica frente a dos cepas de micotoxigénicas de *Aspergillus flavus*, y se observó su influencia en la producción de aflatoxinas AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>2</sub>. También se realizó el estudio de la expresión de genes relacionados con estas micotoxinas. En el caso de los **mohos**, los extractos no influyen en su crecimiento, pero sí en la producción de **aflatoxinas**, siendo los extractos de *Q. ilex* los mejores para la inhibición de la producción de aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> producidas por dos cepas de *A. flavus*, seguido de *Ulmus* sp.

Finalmente, para el desarrollo del **Capítulo 3**, se llevó a cabo un estudio con aceites esenciales obtenidos de plantas aromáticas autóctonas de la Dehesa Extremeña. Se evaluó el efecto de 6 aceites esenciales obtenidos de diferentes plantas aromáticas (*Calendula officinalis*, *Cistus ladanifer*, *Cistus multiflorus*, *Cistus salviifolius*, *Lavandula stoechas* y *Rosmarinus officinalis*) frente a las 6 bacterias patógenas, las 4 levaduras alterantes y los 2 mohos productores de aflatoxinas que se utilizaron en esta Tesis. Los **aceites esenciales** utilizados de *Cistus ladanifer* y *Cistus salviifolius* tenían la mayor cantidad de compuestos fenólicos, y mostraron una **mayor actividad antimicrobiana contra todos los microorganismos utilizados, incluidas bacterias, levaduras y mohos, así como la producción de micotoxinas**. Sin embargo, el aceite esencial los aceites de *Lavandula stoechas* y *Calendula officinalis* mostraron una actividad significativa también con baja concentración de compuestos fenólicos.

**La utilización de extractos y aceites** de plantas autóctonas de la Dehesa Extremeña puede **favorecer la seguridad y salubridad** de los productos en los

que se utilicen al ser sustancias con **importantes actividades funcionales, naturales y no tóxicas**, además de ser un recurso **barato y disponible**, que favorecen la sostenibilidad del entorno de la Dehesa Extremeña. La concentración y composición, en cuanto a los compuestos, que se hayan presentes en estos extractos y aceites esenciales de las plantas, son muy importantes e influyen en las actividades funcionales de los mismos, de ahí que, podrían realizarse futuros análisis de los compuestos químicos puros presentes, para conseguir efectos más específicos en su aplicación.

**ABSTRACT**

---



Aromatic plants are a group of plants whose active compounds are constituted, totally or partially, by essences, representing about 0.7% of the total number of medicinal plants. Their extracts have been used for various purposes, as well as in medicine, food, cosmetics, pharmacy and perfumery due to their strong antioxidant activity as they contain polyphenols, vitamin E, selenium, vitamin C,  $\beta$ -carotene, lutein, lycopene, and other carotenoids that play a fundamental role in the adsorption and neutralization of free radicals to improve human health, slowing the development of diseases related to oxidative stress such as cancer, diabetes or Alzheimer's disease. These plants are considered a future option, especially for areas with special qualities (mountainous, scrublands, moderate arid areas, etc.) where conventional crops are not viable or profitable.

The Dehesa de Extremadura is a Spanish region declared a Biosphere Reserve by UNESCO and is characterized by being a very diverse ecosystem. A great heterogeneity of aromatic and medicinal plants can be found. Among them, the following are highlighted *Calendula officinalis*, *Lavandula stoechas*, *Crataegus monogyna*, *Malva sylvestris*, *Rosmarinus officinalis*, *Asparagus* sp., *Cistus ladanifer*, *C. multiflorus*, *C. albidus*, *C. salviifolius*, *Morus alba*, *Ulmus* sp., *Urginea maritima*, *Rubus ulmifolius* and *Quercus ilex*. The extracts obtained from these plants have been highlighted for their anti-inflammatory, antibacterial, hepatoprotective, antidiabetic, anticancer, gastroprotective, antioxidant and cytotoxic properties, i.e., their functional activities.

In this **Doctoral Thesis** the **general objective** is the revaluation of aromatic plants native to the Dehesa Extremeña by searching for strategies to obtain bioactive compounds from plants for use in food, with the aim of obtaining healthy and safe products, promoting the sustainability of the environment of the Dehesa Extremeña.

In order to achieve this general objective, the thesis has been divided into 3 chapters in which the different specific objectives are addressed. In **chapter 1**, the selection of aromatic plants, scarcely studied and obtained from the Dehesa Extremeña, whose phenolic extracts had the best functional characteristics, as antihypertensive antioxidant and antimicrobial, against 6 pathogenic bacteria and

4 spoilage yeasts, was carried out. These extracts were obtained by two methods, agitation and ultrasound, which were studied to verify which was the most effective method and the one that preserved the functional characteristics of the extracts. In **chapter 2**, the compounds present in the native plants of the Dehesa, holm oak, elm, blackberry and white rockrose, were evaluated, identifying the compounds present in each extract and subsequently tested for their antifungal activity against two mycotoxigenic strains of *Aspergillus flavus*, as well as their influence on the production of aflatoxins AFB<sub>1</sub> and AFB<sub>2</sub> and the expression of genes related to these mycotoxins. Finally, in **chapter 3**, essential oils obtained from 6 aromatic plants native to the Dehesa Extremeña were elaborated, and the antimicrobial effect was studied against the 6 pathogenic bacteria, the 4 altering yeasts and the 2 aflatoxin-producing molds, both in their growth and in the production of mycotoxins in the case of the molds.

For the development of the Thesis, 15 plant species from the Dehesa and food microorganisms were used: 6 pathogenic bacteria, 4 spoilage yeasts and 2 mycotoxigenic molds.

In **Chapter 1**, a study was carried out to select the aromatic plants from the Dehesa whose extracts, obtained by different extraction methods, had the best functional characteristics. Therefore, phenolic extracts obtained by shaking or ultrasound were evaluated, analyzing the influence of the method on the antioxidant, antihypertensive and antimicrobial activities, on bacteria and yeasts, of the extracts obtained. The results showed that in general, when the **extraction methods** used to obtain phenolic compounds were compared, it was observed that there were significant differences, with the highest values being found in the **ultrasound** extraction. In addition, the extracts obtained from *Cistus albidus*, *C. salviifolius*, *R. ulmifolius* and *Q. ilex* showed the **highest concentrations** of phenolic compounds. The **antioxidant activity** was higher in the extracts of *Cistus* and *Q. ilex* obtained by ultrasound, as was the **antihypertensive activity**. The **antimicrobial activity** was also higher in the extracts obtained by **ultrasound**. In addition, extracts of *C. salviifolius* and *Q. ilex* plants were more effective for bacteria and those of *C. ladanifer* for yeasts.

For the development of **Chapter 2**, the compounds present in the native plants of the Dehesa, holm oak, elm, blackberry and white rockrose, were evaluated. These plants were used since they were some of the ones that obtained the best results against eukaryotes in the previous test. The compounds present in each extract were identified and subsequently tested for their **antifungal activity** against two mycotoxigenic strains of *Aspergillus flavus*, and their influence on the production of **aflatoxins** AFB<sub>1</sub> and AFB<sub>2</sub> was observed. The expression of genes related to these mycotoxins was also studied. In the case of molds, extracts do not influence their growth, but they do influence aflatoxin production, with *Quercus ilex* extracts being the best for inhibiting the production of aflatoxins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> produced by two strains of *A. flavus*, followed by *Ulmus* sp.

Finally, for the development of **Chapter 3**, a study was carried out with essential oils obtained from aromatic plants native to the Dehesa Extremeña. The effect of 6 essential oils obtained from different aromatic plants (*Calendula officinalis*, *Cistus ladanifer*, *Cistus multiflorus*, *Cistus salviifolius*, *Lavandula stoechas* and *Rosmarinus officinalis*) was evaluated against the 6 pathogenic bacteria, the 4 spoilage yeasts and the 2 aflatoxin-producing molds used in this Thesis. The **essential oils** used from *Cistus ladanifer* and *Cistus salviifolius* had the highest amount of phenolic compounds and showed **higher antimicrobial activity against all the microorganisms used, including bacteria, yeasts and molds, as well as mycotoxin production**. However, the essential oil *Lavandula stoechas* and *Calendula officinalis* oils showed significant activity also with low concentration of phenolic compounds.

**The use of extracts and oils from native plants of the Dehesa Extremeña can favor the safety and healthiness** of the products in which they are used as they are substances with **important functional, natural and non-toxic activities**, besides being a **cheap and available** resource, which favor the sustainability of the environment of the Dehesa Extremeña. The concentration and composition of the compounds present in these plant extracts and essential oils are very important and influence their functional activities, hence, future analyses of the pure chemical compounds present could be carried out in order to achieve more specific effects in their application.





## **INTRODUCCIÓN**

---



## **1.- PLANTAS AROMÁTICAS Y MEDICINALES**

Las plantas aromáticas y medicinales engloban un número elevado de especies, que se caracterizan por sintetizar metabolitos secundarios o compuestos bioactivos. Principalmente, se encuentran compuestos fenólicos, terpenos, glicósidos y alcaloides (Agostini-Costa et al., 2012; Tanase et al., 2019; Yang et al., 2016). Estos compuestos se encuentran en diferentes partes de las plantas, como semillas, frutos, inflorescencias, flores, hojas y raíces, así como en sus aceites esenciales y extractos (Asensio, 2013; Bernhoff, 2010; Popović et al., 2016; Prakash y Kiran, 2016; Aftab et al., 2019).

La utilización de este tipo de plantas se lleva realizando desde la antigüedad, generando la necesidad de cultivarlas para poder obtener todas sus propiedades beneficiosas para el ser humano, como es el poder disponer de alimentos, condimentos, perfumes y, gracias a sus principios activos, medicamentos (Chang et al., 2000; Li et al., 2006).

Las propiedades características de cada planta se deben a la gran variedad de compuestos químicos complejos, por lo que a veces nos referimos a las plantas aromáticas como minas de oro químicas. En ocasiones, resulta imposible sintetizar en el laboratorio muchos de estos compuestos naturales (Skaria, 2007).

Durante la Edad Media se realizaban huertos que servían como ayuda a los boticarios, médicos y farmacéuticos en cuanto a sus labores sanitarias. Además, mejoraron la destilación de las plantas aromáticas. Durante el siglo XIII se vendían aceites esenciales, siendo el de romero el más utilizado, mientras en el siglo XVII fueron aisladas prácticamente todas las esencias. Aunque no fue hasta el siglo XIX cuando se realizaron los primeros análisis químicos de los principios activos y esencial que constituían las plantas aromáticas.

En el trascurso de 1811, cuando se separa la morfina del opio se produce un movimiento investigador a escala mundial cuya finalidad era el conocimiento de la composición química que obtienen los vegetales.

La importancia de estas plantas puede ser analizada desde diversas perspectivas. En primer lugar, desde su calidad como seres vivos: su nicho ecológico, su valor

intrínseco como plantas, sus genes y los nutrientes y metabolitos codificados por esos genes. Esta evaluación biológica está relacionada con su importancia económica, ya que tienen múltiples aplicaciones industriales en sectores como la farmacéutica, la alimentaria y la perfumería, que también dependen de sus características genéticas (Iannicelli et al., 2018).

En el caso de la industria alimentaria este tipo de plantas suele usarse para la fabricación de especias puesto que aportan bastante sabor y color a los alimentos de forma natural, por lo que es una opción muy utilizada siendo el 40% de la producción mundial de plantas aromáticas, siendo las industrias cárnicas los mayores consumidores de especias y aromas, mientras que en la láctea se utiliza mucho la vainilla.

También hay que resaltar que tienen propiedades antimicrobianas y es por ello por lo que son muy utilizados para combatir plagas y enfermedades de cultivos en sustitución de pesticidas pues estos productos no son tóxicos, ni residuales por lo que se conseguiría una protección vegetal natural.

Además, estas plantas tienen una relevancia social múltiple, ya que no solo representan saberes culturales y religiosos ancestrales, sino que también son el sustento de muchas familias.

### **1.1.- PLANTAS AROMÁTICAS Y MEDICINALES DE LA DEHESA EXTREMEÑA**

La Dehesa Extremeña destaca por ser un increíble ecosistema único en el mundo con gran biodiversidad y poblado de recursos muy beneficiosos para la salud. Dentro de las plantas aromáticas podemos encontrar distintas especies y variedades, unas 2000 especies de plantas (una cuarta parte de las que hay en toda España) y hasta 340 especies medicinales, muchas de ellas crecen de forma autóctona en la Dehesa de Extremadura (Pinto-Correia y Vos, 2004).

Dentro de la flora típica se pueden encontrar árboles de hoja perenne y xerófila, adaptada a períodos estival de sequía, como la encina (*Quercus ilex* L.) y el alcornoque (*Quercus suber* L.) y plantas leñosas y aromáticas, como las jaras (*Cistus* sp.), el romero

(*Rosmarinus officinalis* L.), la salvia (*Salvia officinalis*), la hierbabuena (*Mentha spicata*), la manzanilla (*Chamaemelum nobile*). En torno a los cauces y las zonas húmedas son abundantes los bosques de ribera, formada por árboles como el olmo (*Ulmus minor* Miller) entre otros muchos. Estas plantas tienen una gran importancia para el mantenimiento de los ecosistemas pero que no están valoradas aún en su justa medida (de la Torre Carreras, 2011). La mayoría de ellas han sido poco estudiadas en cuanto a sus posibles usos debido a los compuestos que poseen. Plantas como la caléndula, el romero, la lavanda, la salvia, hierbabuena o el tomillo son utilizadas como materia prima, y con total garantía sanitaria, en perfumería y en el mundo de la cosmética natural y ecológica por sus propiedades medicinales beneficiosas para la piel e infusiones (González et al. 2014).

### **Plantas pertenecientes al género *Cistus***

El género *Cistus*, también conocidas como jaras, pertenecen a la familia *Cistaceae* (orden Malvales) está compuesto por especies colonizadoras (Simões et al., 2009), que crecen preferentemente en áreas degradadas con suelo infértil (Attaguile et al. 2000; Nicoletti et al. 2014). Se caracteriza por ser arbustos y plantas herbáceas, sus ramas suelen ser rectas o corrugadas; pueden variar usualmente de 50 a 100 cm de altura (Catoni et al., 2012). Las hojas opuestas, simples, a veces con estípulas, inflorescencias cimosas o en racimo o flores solitarias a menudo grandes y vistosas, hermafroditas, actinomorfas. Las plantas del género son de polinización cruzada entre especies. Sus flores que aparecen durante la primavera (marzo-mayo) y tienen una vida útil de tres días, son visibles, hermafroditas, actinomorfas e hipóginas, con tres de cinco sépalos opuestos a los pétalos (Zalegh et al., 2021). El color de los pétalos varía de blanco a púrpura/rosa oscuro según el subgénero, con una llamativa mancha roja oscura en la base de cada pétalo presente en algunas especies (Pawluczyk et al., 2012; Viapiana et al., 2017). Además, tienen tallos y hojas viscosos que producen una oleorresina fragante (Guimarães et al., 2009). La mayoría de los miembros de la familia son muy olorosos y dulces, muy apreciados en la industria de la perfumería (Ben et al., 2013).

Los *Cistus*, son un género de arbustos autóctonos del mediterráneo que engloba unas 20 especies particularmente distribuidas en la región mediterránea desde Portugal

y Marruecos hasta Anatolia, la costa del Mar Negro y Palestina (Guzmán y Vargas, 2005; Lukas et al. 2021) (Figura 1).

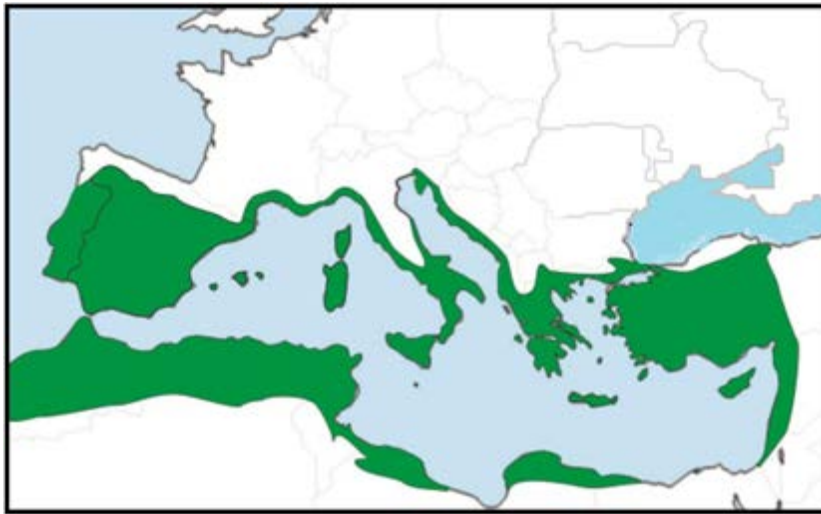


Figura 1. Distribución de la familia Cistaceae en la Región Mediterránea  
(Fuente: basada en Guzmán y Vargas, 2005).

Las especies más comunes son *Cistus ladanifer*, *Cistus monspeliensis*, *Cistus salviifolius*, *Cistus laurifolius*, *Cistus creticus* y *Cistus albidus*.

#### *Cistus ladanifer* L. (Jara pringosa)

La especie *C. ladanifer* incluye tres subespecies: *ladanifer* ( . . . ), *africanus* (Dans) y *sulcatus* (Demoly). La subespecie *ladanifer* se distribuye principalmente en la Península Ibérica, Francia y el norte de África; la subespecie *sulcatus* es endémica del suroeste de Portugal, en los acantilados costeros de Costa Vicentina; y la subespecie *africanus* se encuentra comúnmente en el norte de África y también se extiende por el sur de España (Ferreira et al., 2021; Guzmán et al., 2009). La subespecie *ladanifer* tiene un hábito erecto, generalmente con hojas lineal-lanceoladas y lanceoladas (Carlier et al., 2008); la subespecie *sulcatus* es un arbusto de hábito postrado (50 cm) cuando crece cerca del mar, o de hasta 200 cm y erecto cuando está protegido del viento, con flores blancas y hojas sésiles, generalmente elípticas u oblanceoladas, con nervaduras acentuadas en la superficie superior (Carlier et al., 2008); y la subespecie *africanus* tiene hojas con un pecíolo aparente, lanceolado-elípticas u oblongas a lineales generalmente lanceoladas-con nervios poco aparentes en el haz, y otras hojas ovales u obovadas, con nervios bien visibles en el haz (Demoly et al., 1993).

*C. ladanifer* es un arbusto de hasta 2-3 metros de altura, aunque en algunas ocasiones puede ser más alto, generalmente erecto con muchas ramas en su estructura, con un tallo de color marrón rojizo, madera dura y corteza pegajosa, con flores llamativas y vivas (Figura 2). Las hojas, de 40-80 mm de longitud, de un color verde muy intenso están impregnadas de ládano, lo que las hace pegajosas y les otorga un olor fuerte y específico. Se considera una especie de crecimiento y desarrollo rápido que se reproduce fácilmente mediante la propagación natural de semillas durante el invierno y el otoño (Alías et al., 2006).



Figura 2. *Cistus ladanifer* (fuente: [www.floresyplantas.net/](http://www.floresyplantas.net/))

La jara pringosa se encuentra en una amplia gama de altitudes, latitudes, crece en climas desde muy secos a hiperhúmedos y en suelos que son muy pobres en materia orgánica, con bajo pH y altas concentraciones de oligoelementos, así como a condiciones de estrés hídrico, altas temperaturas y radiación solar (Simões et al., 2008) pero prefiere los suelos ácidos y silíceos (Kidd et al., 2004; Rossini-Oliva et al., 2016).

Se estima que *C. ladanifer* se extiende aproximadamente a 2 millones de hectáreas en el sur y suroeste de la Península Ibérica (Pérez et al., 2011), donde es la especie de arbusto principal con un importante papel ecológico, pero también juega un papel en situaciones desafiantes, como los incendios rurales que ocurren en verano en estas regiones. La jara pringosa es un ejemplo de una especie subutilizada sin una explotación regular y completa, y actualmente se utiliza principalmente por la industria de la perfumería o como planta ornamental (Raimundo et al., 2018), generalmente asociada con pequeñas empresas familiares o vinculada a organizaciones rurales.

Las plantas de jara pringosa han sido tradicionalmente utilizadas como un recurso importante para la atención primaria de salud debido a su bajo costo, accesibilidad y experiencia ancestral acumulada. Las partes aéreas de la jara pringosa se utilizan para producir extractos, obteniendo exudados y aceites esenciales con una composición compleja y propiedades farmacológicas que resultan interesantes para futuras investigaciones y aplicaciones específicas (Lourenço et al., 2015). El uso tradicional de la jara pringosa ha contribuido al desarrollo socioeconómico de las comunidades rurales (Morgado et al., 2005). Tanto el ládano como el aceite esencial de *C. ladanifer* son muy apreciados en perfumería, cosmética, aromaterapia y sabores alimentarios (uso restringido), ya que se utilizan como ingredientes en aproximadamente el 30% de los perfumes modernos debido a sus excelentes propiedades fijadoras (Barrajón-Catalán et al., 2015).

*Cistus albidus* (Jara blanca)

*C. albidus* conocida como jara blanca es un arbusto de 1 – 1,5 metro de altura, muy ramoso, de color blanquecino, sus tallos son de color grisáceo. Hojas ovado-oblongas, obtusas y planas (Figura 3). Los brotes más jóvenes tienen muchos pelos estrellados y algunos simples. Su hábitat es en todo tipo de terrenos, aunque prefieren los suelos calizos, con un clima desde seco a subhúmedo, toleran las heladas que no son intensas ni continuas (Agnieszka et al., 2018).



Figura 3. *Cistus albidus* (fuente: [www.floresyplantas.net/](http://www.floresyplantas.net/))

Podemos encontrarlas por toda la zona Mediterránea occidental, en algunas zonas de la Península Ibérica (sur, este y noreste). Está en todo el territorio extremeño, pero sobre todo en la provincia de Badajoz.



La jara blanca antiguamente se utilizaba el ládano en forma de jarabe para la tos y para aliviar distintos dolores por su actividad analgésica. Además, sus hojas se utilizaban para limpiar distintos utensilios por la forma tienen estas, toda la suciedad se adhiere a ellas (Zalegh et al., 2021).

*Cistus salviifolius* (Jara negra)

Arbusto de hasta 1 metro de altura, erecto o procumbente, con muchas ramas y de un verde muy intenso. Sus tallos tienen un color pardo grisáceo o negruzco y sus flores son de colores rosados y son solitarias o en grupos muy reducidos (Figura 4) (Agnieszka et al., 2018).

Se desarrolla en climas húmedos, subhúmedos y secos, de inviernos fríos o suaves. Podemos localizarla por toda la región Mediterránea, dispersa por casi toda la Península Ibérica, mientras que en Extremadura podemos encontrarla por todo su territorio.



Figura 4. *Cistus salviifolius* (fuente: [https://es.wikipedia.org/wiki/Cistus\\_salviifolius](https://es.wikipedia.org/wiki/Cistus_salviifolius))

Sus hojas han sido empleadas en medicina por sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias y astringentes y la raíz como cicatrizante. En algunas zonas de Grecia se han consumido como sucedáneo del té (Zalegh et al., 2021).

*Cistus multiflorus* (Jaguarzo blanco)

Arbusto (20)40-70(100) cm, erecto, con la corteza gris, al final pardusca; ramillas más o menos densamente cubiertas de pelos simples largos y algo hirsutos, caedizos, más otros pequeños y aplicados. Hojas casi verticiladas en los brotes cortos

axilares, sentadas, de 10-26 x 1-2(4) mm, en general lineares, haz convexa, más o menos pelosa o subglabra, brillante, de margen revuelto, y envés con denso tomento de pelos estrellados, nervio medio muy marcado y algunos pelos largos, simples. Inflorescencias numerosas, de 1-8 flores, en cimas umbeliformes, laterales; pedúnculo y pedicelos más o menos pelosos; brácteas persistentes, bractéolas anchas, acuminadas, visibles en el botón floral y caedizas en el fruto. Botón floral 2-8 mm de ancho. Sépalos 3, caedizos en la fructificación, de 3-8 x 3-4 mm, de ovado-lanceolados a ovados o subredondeados, agudos, más o menos hirsutos. Pétalos de 8-15 mm, blancos (Figura 5).



Figura 5. *Cistus multiflorus* (fuente: [https://es.wikipedia.org/wiki/Cistus\\_clusii](https://es.wikipedia.org/wiki/Cistus_clusii))

*C. multiflorus* se encuentra en hábitats que incluyen terrenos calizos, incluso yesosos y arenosos, principalmente en ambientes característicos de pinares de pino carrasco y encinares. En cuanto a su distribución geográfica, esta especie se encuentra en el Mediterráneo occidental, extendiéndose hacia el este hasta el sur de Italia. También se encuentra en el norte de África, desde el Atlántico hasta la costa oriental de Túnez, y hacia el sur hasta el Atlas Medio y el Atlas sahariano. En la Península Ibérica, se encuentra principalmente en la mitad oriental y también está presente en las Islas Baleares.

### **Plantas pertenecientes al género *Lavandula***

El género *Lavandula* está compuesto aproximadamente por 39 especies, numerosos híbridos y casi 400 cultivares registrados (Upson y Andrews, 2004). Las especies más conocidas y valoradas económicamente son *Lavandula angustifolia*,

*Lavandula stoechas*, *Lavandula latifolia* y el híbrido *Lavandula x intermedia*. Estas plantas son subarbutos o a veces arbustos perennes de hasta un metro de altura. Están en plena floración entre mediados de junio y mediados de julio y prefieren suelos ácidos. Las inflorescencias son comunes en el género *Lavandula*. *L. stoechas* probablemente fue la primera especie utilizada por sus aceites esenciales. Romanos, griegos y árabes reconocieron sus propiedades medicinales.

*Lavandula stoecha* (Cantueso o tomillo borriquero)

*L. stoechas* es una planta de la familia *Lamiaceae* / *Labiatae*, llamada cantueso, es un arbusto perenne de hasta 1 metro de altura erecto o ascendente, con muchas ramas desde la base. Sus tallos y ramas más viejas tienen la corteza de color pardo grisáceo y agrietada y las más jóvenes son de color verde o rojizas, aunque algo blanquecinas por sus pelos blancos que la cubre (Camejo-Rodríguez et al., 2003; Mohd et al., 2016). Las flores, con pedicelo, están dispuestas en verticilos y se agrupan en racimos de cimas cilíndricas o cuadrangulares (Figura 6). Con frecuencia, presentan tonalidades púrpuras, azules, violetas, rosas o lilas, y florecen desde mediados de junio hasta mediados de julio. Las hojas, de tonalidad ligeramente grisácea, especialmente en el envés, son tomentosas, nacen de forma opuesta y son alargadas y estrechas.



Figura 6. *Lavandula stoecha* (fuente: <https://fichas.infojardin.com>)

*L. stoechas* se distribuye en toda la zona Mediterránea ya que se adapta a un rango de climas que va desde semiárido hasta subhúmedo e incluso húmedo. Es capaz de resistir heladas, siempre y cuando no sean frecuentes y recurrentes. Habita en matorrales abiertos que se desarrollan en suelos no calcáreos y silíceos, como pizarras, granitos, cuarcitas, entre otros. Puede crecer hasta altitudes de 1000 metros, e incluso algunas variedades pueden encontrarse a 1800 metros sobre el nivel del mar.

Es una especie vegetal muy conocida y utilizada en toda la región mediterránea por sus virtudes medicinales, atribuidas principalmente a su contenido en aceites esenciales. También se utiliza para la preparación de comidas tradicionales e infusiones, así como con fines cosméticos (Msaada et al., 2012; Zuzarte et al., 2013).

En cuanto a los usos de la *Lavandula stoecha* en Extremadura se ha usado como forraje para las cabras y los burros. Además, también ha sido utilizado en medicina como antiséptico y como una sustancia que se aplica con fines calmantes o curativas. Es una buena planta melífera, es decir, que producen néctar y polen.

### **Plantas pertenecientes al género *Calendula***

#### *Calendula officinalis* (Calendula)

*Calendula officinalis* llamada comúnmente Calendula es una planta medicinal bien conocida, perteneciente a la familia *Asteraceae*, compuesta. Es una planta herbácea, anual, con flores amarillas (Figura 7). Su floración dura casi todo el año, cerrándose de noche y abriéndose al amanecer. Tiene una altura promedio que oscila entre los 30-50 cm, su tallo es semi-erecto, angular y ramificado y sus hojas son alternas, lanceoladas y sésiles; sus capítulos o inflorescencias van desde los 3cm hasta los 5 cm de ancho, amarillos o anaranjados, con una corona de 15-20 lígulas (Ashwlayan y Verma, 2018). Sus frutos son encorvados, provistos casi todos de alas membranosas o púas dorsales. Desprende un olor generalmente desagradable y tiene un gusto amargo.



Figura 7. *Calendula officinalis*

(fuente: <https://www.florandalucia.es/index.php/calendula-officinalis>)

La Caléndula es una planta cultivada en Europa desde el siglo XII, existe localmente naturalizada en el sur y oeste de Europa, y casual para todos los lugares ya que se adapta a una amplia variedad de condiciones climáticas y edafológicas. En cuanto al suelo, es poco exigente, aunque prefiere los arcillosos. No es muy exigente en cuanto a la fertilidad del suelo y puede adaptarse a suelos pobres en nutrientes. Es una planta de clima templado, con temperaturas moderadas, pero resiste heladas y sequías.

Las flores de caléndula se utilizan ampliamente en productos para el cuidado de la piel, la cicatrización de heridas, la reducción de la inflamación y para suavizar y regenerar la piel debido a sus propiedades únicas de rejuvenecimiento celular (Muley et al., 2009). Además, las flores de caléndula se han utilizado como una fuente de ingredientes medicinales y son ampliamente utilizadas en la medicina homeopática para el tratamiento de diversas enfermedades desde hace siglos (Barajas-Farias et al., 2006). *C. officinalis* tiene un alto valor económico como planta medicinal y ha sido recientemente aprobada para su uso en alimentos en Estados Unidos, incluida en la lista de sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS) por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) (Gazim et al., 2008). Estudios científicos han demostrado diversas propiedades medicinales y que se utiliza ampliamente por su actividad antiinflamatoria, anti-edematosa y antioxidante; actividad antibacteriana y antifúngica; actividad antiviral y anti-VIH; actividad cicatrizante y estimulante del sistema inmunológico (Ashwlayan y Verma, 2018; Cruceriu et al., 2018).

### **Plantas pertenecientes al género *Rosmarinus***

#### ***Rosmarinus officinalis* L. (Romero)**

*Rosmarinus officinalis* L. es una planta medicinal que pertenece a la familia *Lamiaceae* / *Labiatae*, comúnmente conocida como romero. Es una planta aromática que crece de forma espontánea en toda el área mediterránea. *R. officinalis* L. es un arbusto perenne aromático con tallo leñoso altamente ramificado que alcanza una altura de 1-2 metros. Sus hojas son muy abundantes, largas y estrechas, con dimensiones entre 1,5 y 3 cm de largo por 2 o 3 mm de ancho. Tienen un color verde oscuro en la parte superior y una tonalidad blanquecina en el envés. Las flores son de color azulado, púrpura o rosa, con un tamaño aproximado de 5 mm (Figura 8). El fruto mide 1 mm y

aparece dentro del cáliz en forma de cuatro pequeñas nueces de color marrón (Ribeiro-Santos et al., 2015).



Figura 8. *Rosmarinus officinalis* L.

(fuente: <https://www.florandalucia.es/index.php/rosmarinus-officinalis-subsp-officinalis>)

Esta planta crece en suelos secos o moderadamente húmedos, no tolera suelos anaeróbicos o encharcados y presenta una tolerancia moderada a la salinidad. Su período de floración ocurre frecuentemente entre mayo y junio en un clima mediterráneo, y el período de fructificación se produce entre la primavera y el verano (Ribeiro-Santos et al., 2015).

El romero quizá sea una de las plantas de las que se encuentran un mayor número de preparados comercializados como remedio natural. Según la EMA (European Medicines Agency's) y ESCOP (European Scientific Cooperative on Phytotherapy), los preparados de hoja de romero se emplean por vía interna para el tratamiento de trastornos digestivos, principalmente en casos de deficiencias hepatobiliares, alivio sintomático de la dispepsia y leve, trastornos espasmódicos del tracto gastrointestinal. Por vía externa, los preparados de romero pueden presentarse en forma de aceites, pomadas o alcohol, para el tratamiento de dolores reumáticos, alteraciones circulatorias periféricas, cicatrización de heridas y antiséptico.

*R. officinalis*, es una rica fuente de compuestos funcionales, y aceites esenciales. El aceite esencial se utiliza en el tratamiento de la dispepsia y formas más leves de

trastornos gastrointestinales espasmódicos, anomalías circulatorias, como complemento en el tratamiento de dolores musculares o articulares e inflamaciones (Bajalan et al., 2017; Borges et al., 2017; Rašković et al., 2014; Selmi et al., 2017; Tai et al., 2012). El aceite esencial de romero, puede tener aplicaciones potenciales antivirales contra coronavirus debido a la inhibición in vitro de la enzima ACE2 (enzima convertidora de angiotensina 2) con efectos antiinflamatorios (Demirci et al., 2022).

### **Plantas pertenecientes al género *Crataegus***

#### ***Crataegus monogyna* Jacq. (Espino blanco)**

El género *Crataegus*, comúnmente conocido como espino, pertenece a la familia *Rosaceae*. Es un arbusto caducifolio o árbol bajo que puede alcanzar hasta 10 metros de altura, muy ramificado, con una copa redondeada y densamente ramificada. Su tronco puede tener hasta 30 cm de diámetro. La corteza es de color grisáceo-marrón, lisa cuando es joven y de color marrón rosáceo y escamosa cuando madura (Figura 9) (Deveci et al., 2020). Las hojas, flores y frutos se utilizan como planta medicinal. Las flores se recolectan a principios de la primavera cuando están completamente desarrolladas, las hojas se recolectan durante el verano y los frutos cuando están maduros, a mediados del otoño. La de vida media del espino puede superar los 200 años.



Figura 9. *Crataegus monogyna*

(fuente: <https://www.florandalucia.es/index.php/crataegus-monogyna>)

Esta planta habita en matorrales espinosos caducifolios, sotobosques y linderos. Es muy común en toda la Península Ibérica y en las Islas Baleares, aunque es menos frecuente en la en la parte meridional, donde se encuentra principalmente montañas y valles. No tolera muy bien las sequías en verano, es capaz de crecer en una amplia variedad de sustratos.

El espino es considerado una de las plantas cardioprotectoras (Alirezalu et al., 2018). Los frutos y las hojas del espino blanco tienen un efecto diurético y antiespasmódico suave (Nabavi et al., 2015). Asimismo, son beneficiosas para el sistema nervioso, y una amplia gama de actividades antioxidantes, antimicrobianas, antifúngicas, antiinflamatorias y antivirales (Dekić et al., 2020).

### **Plantas pertenecientes al género *Malva***

#### ***Malva sylvestris* L. (Malva común)**

*Malva sylvestris* L. es una de las plantas medicinales comúnmente reconocidas como malva común. *M. sylvestris* es una hierba bienal-perenne perteneciente a la familia *Malvaceae*. Esta planta puede alcanzar una altura de 100-120 cm. Las hojas son grandes, en forma de corazón, suaves, trenzadas y ligeramente séptiloides. Las flores de la planta se parecen mucho a las de la madreselva (Figura 10). Florece desde la primavera hasta mediados del verano y las flores hermafroditas miden entre 2 y 6 cm de diámetro, con pétalos de color púrpura o rosa y venas más oscuras (Alizadeh et al., 2016; Mousavi et al., 2021; Petkova et al., 2019).



*Figura 10. Malva sylvestris* L.

(fuente: <https://www.florandalucia.es/index.php/malva-sylvestris>)



La malva generalmente crece en áreas húmedas, como cerca de pantanos, zanjas, océanos, riberas de ríos y prados. Es muy abundante en terrenos baldíos, huertos, cultivos, márgenes de caminos, escombreras y jardines cuando están descuidados ya que crece en cualquier tipo de sustrato. Europa es su lugar de origen, y se encuentra en Asia occidental y Norte de África. Se ha introducido en Centroamérica y Norteamérica, donde está considerada como planta invasora.

*M. sylvestris* L. ha sido utilizado como alimento y medicina en Europa desde la época de la antigua Grecia y Roma. Tradicionalmente se utiliza para el tratamiento de heridas, inflamaciones, cicatrización de quemaduras, hinchazón, así como agente antiinflamatorio para las vías respiratorias y gastrointestinales, trastornos de la piel, tos e irritaciones bucales (tanto la hoja como la flor) (Petkova et al., 2019).

### **Plantas pertenecientes al género *Rubus***

#### ***Rubus ulmifolius* (Zarzamora)**

Este arbusto perteneciente a la familia *Rosaceae*, conocido comúnmente como zarzamora silvestre o zarzamora de hoja de olmo (da Silva et al., 2019) puede llegar hasta 2 metros de altura, espinoso y perennifolio se encuentra en el oeste de Europa, pudiéndose encontrar por toda la Península Ibérica y dominando la mayor parte de Extremadura. Crece en ambientes húmedos o subhúmedos, aunque también en ambientes secos e incluso semiáridos, pero sólo se encontrará en zonas de umbría o muy cerca del agua (Accame, 2016; Bandeira-Reidel et al., 2016). La época de floración ocurre entre mayo y junio, seguida de la maduración y desarrollo del fruto. Esta especie produce frutos comestibles de mora, que son de tipo agregado, globosos, de sabor acidulado y con coloración negra al final de la maduración (Accame, 2016; Bandeira-Reidel et al., 2016).

Esta especie es extraordinariamente variable ya que cuenta con numerosas subespecies, variedades y formas. Sus diferencias se basan en las hojas, el color de los pétalos y la cantidad de pelos (Figura 11).



Figura 11. *Rubus ulmifolius* (fuente: <https://www.jardineriaon.com>)

El uso de *Rubus ulmifolius* es principalmente por su fruto, la mora, ya que tiene un sabor muy agradable y refrescante, aunque sus frutos o brotes más jóvenes son astringente, por lo que es muy usado en la industria alimentaria para la realización de mermeladas y confituras, para dar color al vino y para preparar bebidas alcohólicas o jarabes (Manganelli y Tomei, 1999).

La mora madura ha sido ampliamente utilizada durante cientos de años como medicina tradicional debido a sus propiedades beneficiosas, que incluyen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, gastroprotectoras y cardioprotectoras, entre otras. Este fruto se caracteriza por su alto contenido en antioxidantes, polifenoles, fibra, minerales esenciales y vitaminas (Da Fonseca-Machado et al., 2015; Espada-Bellido et al., 2019).

### **Plantas pertenecientes al género *Quercus***

#### ***Quercus ilex* (Encina)**

Es un árbol perennifolio de la familia de las *Fagáceas*, de hasta 25 m de altura, de tronco recio y cilíndrico, corteza gris oscura que a veces se resquebraja con grietas poco profundas. Tiene una ramificación fuerte y profusa. Sus ramas principales son erecto-patentes, de corteza bastante tiempo lisa. Las ramillas son delgadas y están cubiertas por un denso tomento grisáceo. La copa es redondeada, densa y compacta, produciendo una sombra densa. Las hojas son simples y alternas, lampiñas y de color verde oscuro por el haz y blanquecinas o gris verdoso y muy pubescentes por el envés,

donde se aprecia bien la nerviación principal (Figura 12). Su forma es orbicular o elíptica y los bordes varían de enteros a dentado-espinosos (Villar-Salvador et al., 2013).



*Figura 12. Quercus ilex (fuente: <https://www.arbolapp.es>)*

Se distribuye por la región mediterránea, por la Península Ibérica y territorio extremeño.

La encina tiene la capacidad de poder colonizar en una gran variedad de hábitat, incluso en aquellos donde cualquier otro árbol no podría progresar. Ayuda a la formación del suelo por la descomposición de sus frutos, hojas y madera (Pulido, 1999). Sus hojas y, sobre todo, sus frutos tienen un alto poder nutritivo, siendo la bellota muy apreciada y explotada en la ganadería. También es muy apreciada la miel que producen las abejas a partir de la melaza que exudan las bellotas cuando son dañadas por algún insecto (Peñuelas et al., 1998).

Las encinas acogen diferentes variedades de especies con alto valor cinegético, además de ser durante millones de años un ecosistema con una gran cantidad de recursos alimenticios y energéticos del campo extremeño. Aunque su principal función es la creación y retención de humedad y suelo para luchar contra la erosión y desertificación (Pulido, 1999).

Los extractos de hojas, corteza y madera ricos en compuestos fenólicos se han utilizado como remedio natural para el tratamiento de inflamaciones y trastornos gastrointestinales debido a sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, antitumorales y gastroprotectoras (Sánchez-Gutiérrez et al., 2022).

**Plantas pertenecientes al género *Morus***

***Morus alba* L. (Morera Blanca)**

*Morus alba* L., también conocida como morera blanca, pertenece a la familia de las *Moráceas*. Árbol de tamaño medio, de unos 15 m de altura. Hojas grandes, alternas, pecioladas, redondeadas o acorazonadas y con el borde dentado, lisas y brillantes en el haz, glabras o ligeramente vellosas en los nervios del envés (Figura 13). En primavera producen flores unisexuales reunidas en grupos alargados y compactos. Las femeninas se vuelven carnosas en su conjunto al madurar, produciendo las bayas de color blanco dulzón, rosa a rojo oscuro.



*Figura 13. Morus alba L.*

(fuente: <https://www.florandalucia.es/index.php/morus-alba>)

Los frutos y hojas poseen potentes actividades biológicas, se han demostrado sus propiedades antioxidantes, diuréticas, antiobesidad, hipoglucemiantes, hipotensoras, antiolesterol, antidiabéticas y antimicrobianas (Hussain et al., 2017; Wen et al., 2019).

## **Plantas pertenecientes al género *Ulmus***

### *Ulmus* sp. (Olmo)

Los olmos son árboles caducifolios de tamaño medio, que crecen desde los 20 m (*Ulmus minor*) hasta los 40 m (*Ulmus glabra*). La forma de la copa generalmente es abierta, ancha, ondulada, de abovedada a cilíndrica, pero también cónica. La corteza es pardo-grisácea, profundamente surcada. Las hojas también son variadas en tamaño y forma. Son alternas, de color verde oscuro, generalmente asimétricas en la base y acuminadas en el ápice, con márgenes dentados, de 4-10 cm de largo en *U. minor* a 10-18 cm de largo (Figura 14). Los olmos son especies hermafroditas monoicas: las flores aparecen antes que las hojas a principios de primavera, dispuestas en racimos de 10-30 elementos (Caudullo y De Rigo, 2016).



Figura 14. *Ulmus minor* Mill.

(fuente: <https://www.florandalucia.es/index.php/ulmus-minor>)

Los olmos son nativos de la mayoría de los países europeos. Muestran preferencia por suelos ricos en agua y nutrientes, distribuidos principalmente cerca de ríos y arroyos o en llanuras de inundación (Martín et al., 2006).

Estos árboles han sido utilizados desde la antigüedad, sus brotes y hojas tiernas se utilizaban como verduras cocidas. Las ramas y hojas se aprovechan como alimento para los animales. El néctar se utiliza como atrayente de insectos para atraparlos. Sus hojas y brotes presentan diversas actividades funcionales en el sistema circulatorio, digestivo, genito-urinario, musculatura, piel y en el alivio del dolor de oídos. Varios autores han demostrado propiedades antiinflamatorias provenientes de varios compuestos aislados del extracto de sus frutos.

## **Plantas pertenecientes al género *Asparagus***

### *Asparagus* sp.

El espárrago (*Asparagus officinalis* L.) es una planta herbácea perenne de importancia nutricional y comercial, perteneciente a la familia *Asparagaceae*. El espárrago es una planta diclina con una flor masculina de color verde amarillento y una flor femenina menos conspicua en una planta separada (Figura 15) (Chitrakar et al., 2019). El espárrago se puede clasificar de forma sencilla en espárrago verde, espárrago blanco, espárrago verde púrpura, espárrago azul púrpura y espárrago rosa en función de las diferencias de color (Guo et al., 2020).



*Figura 15. Asparagus officinalis* L.

(fuente: <https://www.florandalucia.es/index.php/asparagus-officinalis>)

Es una planta que crece principalmente en el bioma templado y se distribuye en bosques y garrigas no muy secas, encinares, carrascales y alcornoques, zarzas, matorrales con romero y tomillares.

*Asparragus* posee fuertes propiedades funcionales como antioxidante, antifúngicas, antiproliferativas... y por ello se pueden utilizar como agentes naturales en la elaboración de productos saludables (Elsaid et al., 2015; Fadda et al., 2018; Fuentes-Alventosa et al., 2013; Miura et al., 2016; Sullivan et al., 2017; Wang et al., 2020).

### **Plantas pertenecientes al género *Urginea***

#### ***Urginea maritima* (Cebolla albarrana)**

*Urginea maritima* conocida como Cebolla albarrana, pertenece a la familia *Asparagaceae*, es una planta herbácea perenne con un gran bulbo, globoso (de hasta 15 cm de diámetro), que se encuentra enterrado muy superficialmente. Las hojas alternas, aparecen en primavera y se agrupan en rosetas en el interior del bulbo, no pecioladas con limbo lanceolado de hasta alcanzan hasta 40 cm de longitud, con márgenes ondulados o retorcidos en una espiral laxa (Figura 16). Presenta inflorescencia en racimo con muchas cada una de ellas en la axila de una pequeña bráctea lanceolada (Kazemi Rad et al., 2021).



Figura 16. *Urginea maritima*

(fuente:[https://es.wikipedia.org/wiki/Drimia\\_maritima#/media/Archivo:Urginea\\_maritima\\_-\\_flowers-sardinia.jpg](https://es.wikipedia.org/wiki/Drimia_maritima#/media/Archivo:Urginea_maritima_-_flowers-sardinia.jpg))

Se reparten en matorrales poco densos que se encuentran en terrenos pedregosos de la zona mediterránea más cálida de la Península Ibérica, pueden crecer tanto en suelos calcáreos como en suelos ácidos. La vegetación de estos matorrales está compuesta por una variedad de plantas adaptadas a las condiciones secas y cálidas del clima mediterráneo.

Esta planta ha sido ampliamente utilizada en trastornos cardíacos e infecciones fúngicas y como agente diurético (Ghosh et al., 2019). Por otro lado, se utilizan para acelerar la cicatrización de heridas, así como en trastornos digestivos, enfermedades reumatoides y en el tratamiento del cáncer (Kazemi Rad et al., 2021).

## **2.- COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LAS PLANTAS**

Los compuestos bioactivos son sustancias químicas que pueden ser componentes esenciales o no esenciales que provienen de la naturaleza, como las plantas, y cumplen funciones en el cuerpo que son beneficiosas para la salud. En las plantas los compuestos bioactivos permanecen con otros compuestos presentes en estas y su extracción se realiza a partir de diferentes partes de la planta como son las hojas, los tallos, las flores y los frutos (Bernhoff, 2010).

Los compuestos bioactivos en las plantas se producen como metabolitos secundarios, es decir, por un lado, se encuentran los metabolitos primarios que tienen funciones relacionadas con el crecimiento y desarrollo de la planta y, por otro lado, están los metabolitos secundarios que se cree que son compuestos que dan a la planta una capacidad de supervivencia al tener la facultad de interactuar con el entorno. Por lo que se podría decir que entonces los compuestos bioactivos de las plantas son metabolitos secundarios que provocan un efecto farmacológico o tóxico en los seres vivos (Bernhoff, 2010).

En cuanto a la clasificación de los compuestos aún no existe una determinada. Según Croteau et al. (2000) los compuestos bioactivos se clasifican en tres grupos principales: terpenos y terpenoides, alcaloides y compuestos fenólicos. Estos últimos son los más estudiados hoy días porque tienen un impacto directo en la calidad de los productos alimentarios ya que su función va ligada a su carácter sensorial.

### **2.1.- COMPUESTOS FENÓLICOS**

Los compuestos fenólicos son uno de los grupos más grandes de metabolitos secundarios en las plantas, pudiendo encontrarse en frutos, semillas, hojas, tallos, flores, etc con una gran importancia debido a sus propiedades beneficiosas para la salud (Kaur et al., 2011; Tanase et al., 2019). Los polifenoles se caracterizan por presentar al menos un anillo aromático con un grupo hidroxilo en su estructura (Yahia y Carrillo, 2018). En función al número de anillos fenólicos que contienen y en base a los elementos estructurales que unen estos anillos se pueden dividir en diferentes grupos, que se



clasifican en varias subclases, como los ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanas (Li et al., 2014; Sánchez-Paniagua, 2009). Estos compuestos pueden producirse a través de dos vías, a través del ácido shikímico (fenilpropanoides) o del ácido acético (fenoles) (Sánchez-Moreno et al., 2002) y han sido clasificados según su origen, su función biológica y su estructura química (Tsao, 2010).

Se ha demostrado que el consumo de estos compuestos puede desempeñar un papel en la prevención de diversas enfermedades crónicas, como enfermedades cardiovasculares específicas (principalmente niveles altos de colesterol, presión arterial alta) y enfermedades neurodegenerativas (como Alzheimer o Parkinson), diabetes tipo II, cáncer e infecciones del tracto urinario (9-13). Sin embargo, los efectos en la salud de los compuestos fenólicos dependen de su tipo, cantidad consumida y biodisponibilidad.

### Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos se caracterizan por presentar un grupo carboxílico además del anillo aromático y el grupo hidroxilo. Son los derivados del ácido benzoico (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) (es decir, ácidos hidroxibenzoicos) y del ácido cinámico (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) (es decir, ácidos hidroxicinámicos) (Figura 17) (Sánchez-Paniagua, 2009).

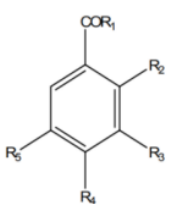
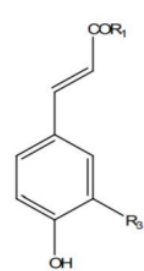
Ácidos Benzoicos; C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	
	OH	H	OH	OH	OH	Ácido gálico
	OH	OH	H	H	H	Ácido salicílico
	OH	H	OH	OH	H	Ácido protocatéquico
	OH	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	Ácido vanílico
	OH	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	Ácido siringico
	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	Vanillina
	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	Anisaldehído
Ácidos Cinámicos; C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>3</sub>				
	OH	OH				Ácido caféico
	OH	H				Ácido p-cumárico
	OH	OCH <sub>3</sub>				Ácido ferúlico
	Ácido tartárico	OH				Ácido cafeil-tartárico
	Ácido quínico	OH				Ácido clorogénico

Figura 17. Ácidos benzoicos y cinámicos. (fuente: Sánchez-Paniagua, 2009)

Los ácidos fenólicos pueden representar aproximadamente un tercio de los compuestos fenólicos en la dieta humana. Tienen una alta actividad antioxidante que puede ayudar a proteger el cuerpo de los radicales libres (Giada et al., 2013).

En las plantas medicinales, los ácidos fenólicos más abundantes son los ácidos hidroxicinámicos y entre ellos se encuentran el ácido ferúlico, el ácido cafeico, el ácido cumárico y el ácido sinápico. Estos ácidos suelen estar presentes en las plantas en formas combinadas, como derivados glicosilados o ésteres de ácido tartárico, ácido shikímico y ácido quínico, en lugar de estar en forma libre. Por otro lado, los ácidos hidroxibenzoicos más comunes son el ácido gálico, el ácido salicílico, el salicilaldehído y el ácido protocatequial (Pinto et al., 2021).

### Flavonoides

Los flavonoides estructuralmente están compuestos por dos anillos aromáticos (anillo A y B) unidos entre sí mediante tres átomos de carbono (C6-C3-C6) (Figura 18).

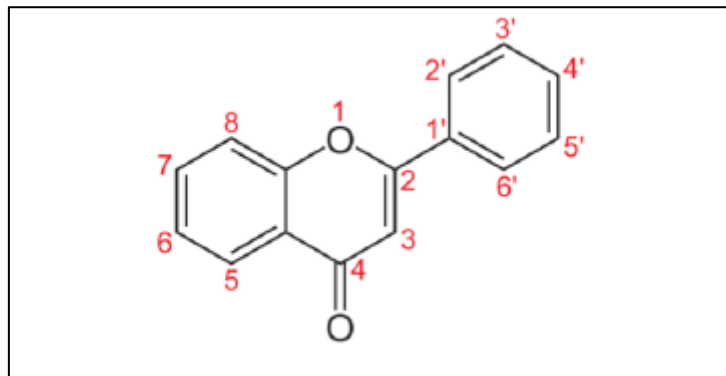


Figura 18. Estructura flavonoides.

Los flavonoides se subdividen en varias clases, como flavonas, flavonoles, flavanonas y flavanos según el estado de oxidación del anillo pirano central, antocianidinas, así como en isoflavonas, neoflavonas y chalconas (Nabavi et al., 2015).

Los flavonoles han sido muy estudiados y se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas (Shahidi y Naczk 2003; Manach et al., 2004). Frecuentemente se presentan en forma conjugada de glucósidos, como el kaempferol, quercetina y miricetina (Figura 19).

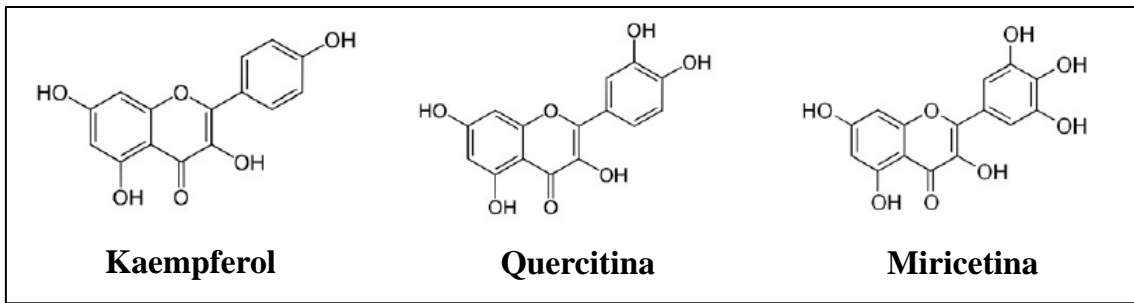


Figura 19. Estructura de los principales flavonoles.

Los flavanoles monoméricos incluyen catequina, epicatequina, galocatequina, galato de catequina, galato de epicatequina, epigalocatequina, epigalocatequina-3-galato y galato de galocatequina.

Las isoflavonas son flavonoides que tienen su anillo B fusionado con la posición C3 del anillo C, las isoflavonas tienen un grupo funcional cetona o hidroxilo. Este grupo funcional es importante para determinar las propiedades químicas y biológicas de las isoflavonas. La estructura básica de las isoflavonas es similar a la de los flavonoides, pero difieren en la posición del anillo C, que se encuentra en la posición C-ring en lugar de la posición B-ring en los flavonoides. Algunas isoflavonas comunes incluyen la genisteína, daidzeína y gliciteína. La forma común de las isoflavonas en las plantas es de glicósidos, donde están unidas a un grupo de azúcar (Pinto et al., 2021).

### Estilbenos

Los estilbenos son un grupo de compuestos fenólicos que comparten una estructura química similar a los flavonoides, en la cual los dos anillos aromáticos (A y B) están unidos por un puente de metileno (Figura 20). Uno de los compuestos más aromáticos de los estilbenos que se encuentra principalmente en formas glicosiladas es el trans-resveratrol (Pinto et al., 2021).

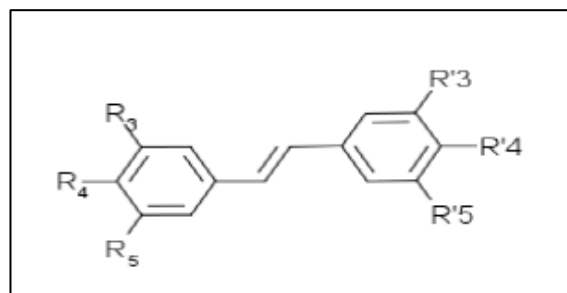


Figura 20. Estructura estilbeno.

### Lignanos

Los lignanos son un grupo diverso de compuestos fenólicos bioactivos formados por dos unidades de fenilpropano con enlaces  $\beta$ - $\beta$ . Se encuentran presentes en diferentes partes de especies vegetales en forma libre o combinada como derivados de glicósidos. Los lignanos presentan una fuerte actividad antioxidante y pueden ser efectivos en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, enfermedad coronaria y diabetes (Peterson et al., 2010).

## 2.2.- TERPENOS Y TERPENOIDES

Los **terpenos** junto con los compuestos fenólicos son una de la familia más grande de metabolitos secundarios de las plantas, distribuidos por las hojas, flores, tallos y raíces. Los **terpenoides** se forman de la oxigenación, hidrogenación o deshidrogenación de los terpenos. La estructura básica de esta familia química es el isopreno [C5] $n$  (Figura 21), donde  $n$  indica el número de unidades de isopreno presentes en la estructura, dando lugar a la formación de diferentes terpenos, desde hemiterpenos simples [C5] $1$  hasta tetraterpenos [C5] $8$  o incluso politerpenos [C5] $>8$  (de Elguea-Culebras et al., 2022).

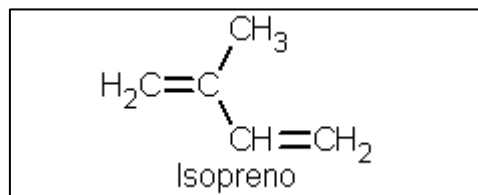


Figura 21. Estructura básica de los terpenos.

Los **monoterpenos fenólicos** están compuestos por dos unidades de isopreno (C $10$ ) e incluyen formas acíclicas, monocíclicas y bicíclicas (Figura 22). Son componentes de compuestos de aceites esenciales que otorgan aroma y sabor a las plantas y son vitales para una variedad de ingredientes activos con aplicaciones agrícolas, farmacéuticas, cosméticas y alimentarias. Dentro de estos ingredientes activos se encuentran el pineno, el carveol, el alcanfor, el mentol y el limoneno (Kang et al., 2016).

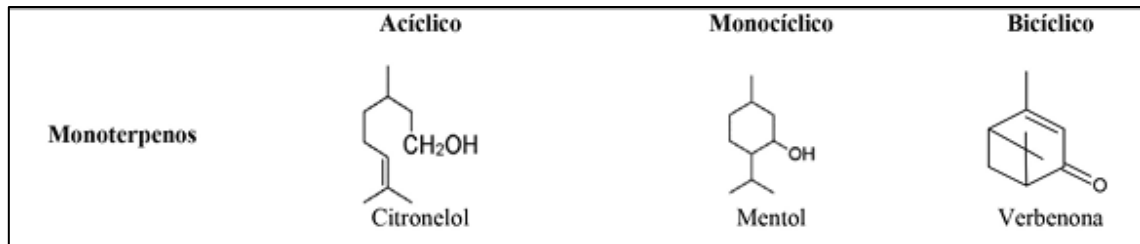


Figura 22. Estructura monoterpenos fenólicos.

Los **diterpenos** son hidrocarburos no volátiles (C<sub>20</sub>) derivados de cuatro unidades de isopreno, que pueden tener formas lineales, bicíclicas, tetracíclicas, pentacíclicas o macrocíclicas. Los diterpenos se caracterizan por tener grupos cetónicos e hidroxilo polioxigenados (Kang et al., 2016). En los residuos de destilación de plantas aromáticas los diterpenos fenólicos identificados más importantes son el ácido carnósico, el carnosol (Figura 23) y el derivado de metil carnosato (de Elguea-Culebras et al., 2022). El ácido carnósico es abundante en los residuos sólidos de la destilación de plantas aromáticas como el *R. officinalis* (de Elguea-Culebras et al., 2022).

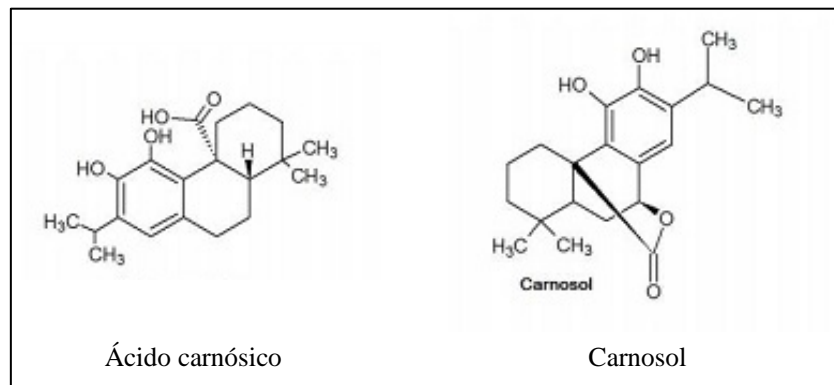


Figura 23. Estructura diterpenos.

Los **triterpenos** (C<sub>30</sub>) están compuestos por dos moléculas de sesquiterpeno unidas cabeza a cabeza (Figura 24) (Ludwiczuk et al., 2017). Dentro de este grupo, los triterpenos cíclicos (de 1 a 5 anillos) son los compuestos más significativos, siendo principalmente alcoholes, aldehídos o ácidos carboxílicos (Mander et al., 2010).

Dentro de los triperpenos, se encuentran los esteroides y fitoesteroides, que están compuestos por un sistema de anillo de perhidrofenantreno de ciclo pentano (Ludwiczuk et al., 2017). Los triterpenos glucosilados, como las saponinas, protegen a las plantas contra microorganismos patógenos y plagas de insectos.

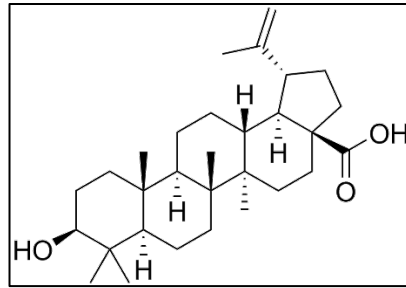


Figura 24. Estructura triterpenos.

Los **tetraterpenos** son unidades de 8-isopreno que consisten en las siguientes fórmulas moleculares: C<sub>40</sub> y C<sub>40</sub>-H<sub>64</sub> (Figura 25). Los carotenoides son los tetraterpenos más estudiados, con más de 750 compuestos (Maoka et al., 2020). Sus funciones biológicas incluyen la captación de luz, la función antioxidante y la protección de las plantas contra los radicales libres. También participan en la síntesis de hormonas vegetales y forman los componentes estructurales de las membranas celulares. Son ingredientes activos en las industrias farmacéutica y alimentaria (Domonkos et al., 2013).

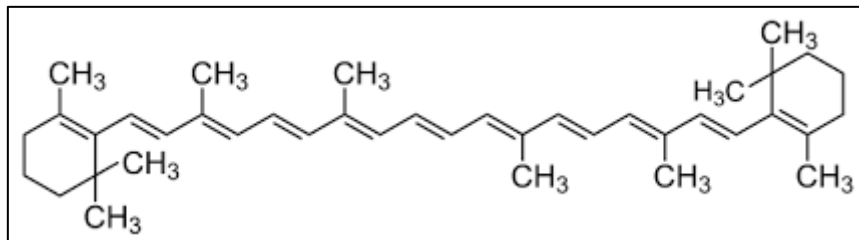


Figura 25. Estructura tetraterpenos.

### 2.3.- COMPUESTOS BIOACTIVOS PRESENTES EN LAS PLANTAS AROMÁTICAS Y MEDICINALES DE LA DEHESA DE EXTREMADURA

La Tabla 1 se resume los principales compuestos identificados en las plantas aromáticas y medicinales de la Dehesa de Extremadura. Además de la parte de la planta donde se han identificados.

Tabla 1. Principales compuestos bioactivos identificados en plantas aromáticas y medicinales de la Dehesa Extremeña (fuente: elaboración propia).

Plantas	Parte de la planta	Principales compuestos identificados	Referencias
<i>Cistus sp.</i>	Partes aéreas	Terpenoides: viridiflorol, $\alpha$ -pineno, ledol y acetato de bornilo	Teixeira et al. (2007)
	Botones florales	Compuestos fenólicos y flavonoides	Zalegh et al. (2021)
	Hojas	Ácidos fenólicos: ácidos ciclohexanocarboxílicos, ácido gálico, quercetina glucosilada y miricetina Flavonoides: ácido abdanoico, betulosido, apigenina, kaempferol y flavanoles galatoilados Taninos	Arnold et al. (2008)
<i>Lavandula stoechas</i>	Ramas, flores y hojas	Ácidos fenólicos: ácido protocatecuico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido clorogénico y ácido rosmarínico	Lee et al. (2011)
		Flavonoides: pinobanksina, pinocembrina, quercetina y luteolina Taninos catequínicos, esteroides, cumarinas, leucoantocianinas y mucílagos	
	Parte aérea	Aceites esenciales: fenchona, 1,8-cineol, alcanfor y linalool	Carrasco et al. (2015)
<i>Crataegus monogyna</i>	Frutos inmaduros	Ácidos fenólicos: ácido clorogénico y proantocianidinas	Rodrigues et al. (2012)
	Botones flores	Flavonoides: epicatequina, hiperósido, quercetina, rutina, vitexina y proantocianidinas	
<i>Malva sylvestris</i>	Hojas	Ácidos orgánicos: malonato, malato, oxalato, fumarato y citrato	Mazraedoost y Behbudi, (2021)
	Flores	Flavonoides: malvidina, malvina, delphinidina, miricetina, apigenina, quercetina, kaempferol y genisteína	Gasparetto et al. (2012)
<i>Rosmaryus officinalis</i>	Extracto de planta	Ácidos fenólicos: ácido rosmarínico, ácido clorogénico y ácido cafeico	Andrade et al. (2018)
		Flavonoides: apigenina, diosmina, luteolina y genkwanina	
		Terpenos: epirosmanol, carnosol, ácido carnósico, ácido ursólico y ácido oleanólico Aceites esenciales: alcanfor, 1,8-cineol, $\alpha$ -pineno, borneol, canfeno, $\beta$ -pineno y limoneno	Begum et al., (2013)
<i>Rubus ulmifolius</i>	Frutos	Ácidos fenólicos: ácido gálico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido siríngico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido p-cumárico, ácido salicílico y ácido sinápico	Chaves-Silva et al. (2018)
		Flavonoides: quercetina, kaempferol, catequina, crisina, epicatequina, naringenina, pinobancoseno, pinocembrina, rutina, sinadaldehído, isoquercitrina, isorhamnetina y luteolina	Schulz y Chim, (2019)
		Antocianinas: cianidina-3-glucósido y pelargonidina-3-rutinosido	

Tabla 1. Continuación.

Plantas	Parte de la planta	Principales compuestos identificados	Referencias	
<i>Quercus ilex</i>	Hojas	Ácidos fenólicos: ácido gálico, ácido protocatecuico, derivados del ácido elágico y ácido elágico	Castejón Martínez et al. (2019)	
		Flavonoides: rutina, quercetina, epicatequina, naringenina, hesperetina, formononetina, naringina y kaempferol		
		Taninos		
	Corteza	Flavonoides	Vargas-Segura et al. (2019)	
		Catequinas		
	Bellotas		Ácidos fenólicos: ácido gálico, ácido elágico y sus derivados	Ferreira et al. (2017) Rtibi et al. (2017)
Flavonoides: rutina, quercitrina, (+)-dihidroquercetina, quercetina, isoquercitrina y (+)-dihidrokaempferol				
Taninos				
<i>Morus alba</i>	Hojas	Ácidos fenólicos: ácido cafeoilquínico, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido gálico, ácido vanílico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido sirínico, ácido p-cumárico, ácido protocatecuico, ácido ferúlico y ácido m-cumárico	Thabti et al. (2012)	
		Flavonoides: kaempferol, quercetina y rutina	Memon et al. (2010)	
	Fruto	Ácido fenólico: ácido clorogénico, ácido cafeico y ácido gálico	Calín-Sánchez et al. (2013)	
		Flavonoides: rutina, quercetina, kaempferol y apigenina		
	Semillas		Ácido fenólico: ácido clorogénico, ácido protocatecuico, ácido cafeico y ácido 3,4-dihidroxibenzoico	Lee et al. (2011) Oh et al. (2013)
			Flavonoides: rutina, quercitrina, (+)-dihidroquercetina, quercetina, isoquercitrina y (+)-dihidrokaempferol	
Estilbenos: 4-prenilmoracina, moracina y trans-resveratrol				
<i>Asparagus sp.</i>	Tallo comestible	Flavonoides: rutina, antocianinas (peonidina, cianidina y sus derivados glucosilados)	Dong et al. (2019) Fuentes-Alventosa et al. (2013)	
		Saponinas: protodioscina, metilprotodioscina y sarsapogenina	Schwarzbach et al. (2006)	
<i>Calendula officinalis</i>	Flores	Terpenoides: sitosterol, estigmasterol, diésteres de diol, lupeol, eritrodiol, brein, ursadiol...	AshwlayanVD y Verma, (2018)	
		Aceite esencial: $\alpha$ -cadineno, $\alpha$ -cadinol, t-muurolol, limoneno y 1,8-cineol	Okoh et al. (2007)	
	Inflorescencias	Flavonoides: quercetina, isoquercetina, narcissina y rutina	Khare et al. (2004)	
		Cumarinas: escopoletina, umbeliferona y esculetina	Almanac, (2021)	
Hojas	Quinonas: plastoquinona, filoquinona, alfa-tocoferol, ubiquinona, filoquinona, alfa-tocoferol y filoquinona	Al-Snaf, (2013)		



Diferentes especies de *Cistus* contienen múltiples compuestos como flavonoides, cumarinas, derivados terpénicos e hidrocarburos. Las partes aéreas de *C. ladaniferus* son un ejemplo de la riqueza en terpenoides (sesquiterpenos oxigenados e hidrocarburos monoterpénicos), incluyendo viridiflorol,  $\alpha$ -pineno, ledol y acetato de bornilo (Teixeira et al., 2007). *C. albidus* fue estudiado por su composición en aceites esenciales, presentando altos contenidos en derivados sesquiterpénicos, siendo los principales componentes el  $\alpha$ -zingibereno,  $\alpha$ -curcumeno, (E)- $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -cadinol,  $\alpha$ -bisabolol,  $\delta$ -cadineno y germacreno D. (Paolini et al., 2008). Un análisis semicuantitativo de la composición de *C. albidus*, *C. ladanifer* y *C. salviifolius* realizado por RRLC-ESI-TOF-MS, reveló que no hay diferencias significativas en la composición de los extractos obtenidos de los cuatro *Cistus*. Los extractos estaban formados por compuestos como fenilpropanoides (ácidos fenólicos, flavonoides y derivados de taninos), ácidos ciclohexanocarboxílicos, ácido gálico, quercetina glicosilada y miricetina. Estos ácidos fueron más abundantes en los extractos de *C. albidus* y *C. salviifolius*. Sin embargo, el ácido labdánico, betulosida, apigenina, kaempferol y flavanoles galolilados fueron más abundantes en los extractos de *C. ladanifer* (Arnold et al., 2008).

En extractos hidro etanoicos obtenidos de *Lavandula stoechas* se encontraron compuestos como flavonoides, taninos catequínicos, esteroides, cumarinas, leucoantocianinas y mucílagos (Ez zoubi et al., 2016). Messaoud et al. (2012) identificaron muchos fenoles en el género *Lavandula*, incluyendo ácido protocatecuico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido clorogénico y ácido rosmarínico, pinobanksin, pinocembrina, quercetina y luteolina. También identificaron compuestos terpénicos, siendo los principales compuestos encontrados el fenchona, el alcanfor y el 1,8-cineol. Varios estudios han demostrado que los quimiotipos de fenchona/canfor son los principales compuestos en los aceites esenciales de *L. stoechas* (Benabdelkader et al., 2011; Carrasco et al., 2015).

En cuanto a *Crataegus monogyna*, los metabolitos secundarios extraídos de las diferentes partes de la planta van desde ácidos grasos simples hasta compuestos, terpenoides y polifenólicos. En general, se sabe que los flavonoides, especialmente los flavonoles y flavonas, son abundantes en las yemas florales, mientras que las proantocianidinas se encuentran en mayor cantidad en los frutos verdes (Rodríguez et al., 2012). Además, las flores contienen altos niveles de tocoferoles, ácido ascórbico y

muestran una buena relación n-6/n-3 de ácidos grasos, en comparación con los frutos maduros, mientras que los frutos verdes generalmente contienen mayores niveles de ácidos grasos poliinsaturados (Barros et al., 2011).

*Malva sylvestris* contiene diferentes compuestos, incluyendo derivados fenólicos, flavonoides, terpenoides, enzimas catalasas, oxidasa de sulfito, ácidos grasos y ciertas enzimas (especialmente ácidos grasos esenciales como omega-3 y omega-6), betacaroteno y vitaminas C y E (Mousavi et al., 2020). Se conocen un total de 13 ácidos orgánicos extraídos de las hojas de *M. sylvestris*, incluyendo malonato, malato, oxalato, fumarato y citrato (Mazraedoost y Behbudi, 2021). Por otro lado, se ha demostrado que las flores de *M. sylvestris* tienen una gran cantidad de flavonoides, junto con otros compuestos fenólicos (Petkova et al., 2019).

Los principales fitoquímicos presentes en *Rosmarinus officinalis* son compuestos fenólicos, terpenos y aceites esenciales (Aumeeruddy-Elalfi et al., 2016). Dentro de los flavonoides, los más comunes son apigenina, diosmina, luteolina, genkwanina, y los ácidos fenólicos son ácido rosmarínico, ácido clorogénico y ácido cafeico (Andrade et al., 2018). En cuanto a los terpenos, en romero se pueden encontrar diterpenos como el epirosmanol, carnosol, ácido carnósico, y triterpenos como ácido ursólico y ácido oleanólico (Begum et al., 2013). Por otro lado, los principales constituyentes del aceite esencial de romero son alcanfor, 1,8-cineol,  $\alpha$ -pineno, borneol, canfeno,  $\beta$ -pineno y limoneno (Begum et al., 2013).

*Rubus ulmifolius* es una planta rica en compuestos fenólicos como los ácidos fenólicos (ácido gálico, cafeico, ferúlico, salicílico, sinápico...), los flavonoides y flavonoles (quercetina, kaempferol, catequina, rutina...), y taninos (Schulz y Chim, 2019; Yang y Choi, 2017). Dentro del grupo de los flavonoides se encuentran las antocianinas siendo las principales antocianinas encontradas en esta planta cianidina-3-glucósido y pelargonidina-3-rutinosido. Estos compuestos son solubles en agua y dan a las bayas tonalidades azules, moradas, rojas y rosadas. Además, estos compuestos son importantes para atraer a los polinizadores y dispersores de semillas (Chaves-Silva et al., 2018).

Los principales compuestos fenólicos identificados en *Quercus sp.* pertenecen a los flavonoides y no flavonoides que median el metabolismo de los fenilpropanoides a

través de la vía del shikimato y se encuentran distribuidos por todos los órganos de la planta (hojas, corteza y bellotas) (Vogt., 2010). Hadidi et al. (2017) identificaron y cuantificaron flavan-3-oles, flavonoles y glucósidos acetilados de kaempferol en extractos de *Q. ilex*.

En *Morus alba* se pueden encontrar fitoquímicos en las hojas, frutos y semillas. Thabti et al. (2012) en extractos obtenidos de hojas encontraron la presencia de tres flavonoides (kaempferol-7-O-glucósido, quercetina-3-O-rhamnoside-7-O-glucósido y quercetina 3-O- $\beta$ -glucósido-7-O- $\alpha$ -rhamnoside), junto con otros 10 compuestos conocidos (1-ácido cafeoilquínico, 5-ácido cafeoilquínico, 4-ácido cafeoilquínico, ácido cafeico, rutina, quercetina-3,7-d-O- $\beta$ -d-glucopiranosido, quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-(6-malonil)- $\beta$ -d-glucopiranosido, kaempferol-3-O-glucopiranosido-(1,6)- $\beta$ -d-glucopiranosido y kaempferol-3-O-(6-malonil)glicósido). Ácido clorogénico, ácido gálico, ácido vanílico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido siríngico, ácido p-cumárico, ácido protocatecuico, ácido ferúlico y ácido m-cumárico fueron identificados como los principales ácidos fenólicos en las hojas (Memon et al., 2010). En frutos se encontraron un total de 17 compuestos fenólicos como derivados de ácido cinámico, flavonoles, antocianinas y derivados de ácido benzoico (Wang et al., 2013). Calin-Sanchez et al. (2013) encontraron 35 compuestos volátiles y los clasificaron en aldehídos, ésteres, cetonas, terpenos de benceno y terpenos oxigenados. Además, se encontró la presencia de rutina, ácido clorogénico, ácido cafeico, quercetina, ácido gálico, kaempferol y apigenina. Lee et al. (2011) encontraron y cuantificaron 11 compuestos polifenólicos en semillas desgrasadas de *M. alba*. Estos compuestos fueron rutina, 4-prenilmoracina, quercitrina, (+)-dihidroquercetina, quercetina, isoquercitrina, ácido clorogénico, moracina, ácido procatecuico y (+)-dihidrocampeferol, y trans-resveratrol. Oh et al. (2013) destacó el ácido cafeico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, rutina y cianida-3-rutinósido como los principales compuestos en las semillas de *M. alba*.

*Asparagus sp.* contiene muchos fitoquímicos bioactivos, incluyendo compuestos fenólicos (flavonoides, ácido fenólico y ácidos hidroxicinámicos) y saponinas que se encuentran en cantidades significativas, entre otros componentes (Fuentes-Alventosa et al., 2013). Los cultivares de espárragos morados y verdes son ricos en 14 antocianinas diferentes, siendo las principales peonidina, cianidina y sus derivados glicosilados (Dong et al., 2019). La rutina es el flavonoide principal en los espárragos, representando

entre el 60-80% de los compuestos fenólicos (Fuentes-Alventosa et al., 2013). Por otro lado, dentro de las saponinas destacan la protodioscina, la metil protodioscina y la sarsasapogenina que suponen el 90% de las saponinas totales, siendo la protodioscina la más abundante (Schwarzbach et al., 2006).

*Caléndula officinalis* presenta varias clases de compuestos químicos, siendo los principales en la planta los terpenoides, flavonoides, cumarina, quinonas, aceite volátil, carotenoides y aminoácidos. En extractos procedentes de las flores se han encontrado varios terpenoides, que incluyen sitosteroles, estigmasteroles, diésteres de diol, lupeol, eritrodiol, breín, ursadiol, entre otros compuestos (Ashwlayan y Verma, 2018). También se determinaron varios compuestos en la inflorescencia, incluyendo quercetina, isoquercetina, narcissin, rutina, etc. dentro del grupo de los flavonoides (Khare et al., 2004), y cumarinas como coumarina, escopoletina y esculentina (Almanac, 2021). Al-Snaf, (2013) identificaron en las hojas quinonas como plastoquinona, filoquinona, alfa-tocoferol, ubiquinona, filoquinona, alfa-tocoferol y filoquinona. Por último, se encontró que el aceite esencial es rico en  $\alpha$ -cadineno,  $\alpha$ -cadinol, t-muurolol, limoneno y 1,8-cineol (Okoh et al., 2007).

### 3.- PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LAS PLANTAS

Los compuestos bioactivos naturales han mostrado numerosas actividades biológicas y beneficios para la salud, principalmente como antioxidantes, pero también como antiinflamatorios, antienvjecimiento, citotóxicos y antitumorales, antidepresivos, reducen los lípidos sanguíneos y la glucosa en humanos, protegen los sistemas biológicos contra los efectos perjudiciales de los procesos oxidativos en las macromoléculas, tienen actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos, actividad antidiabética, aumentan la secreción biliar, reducen los niveles de colesterol y lípidos en sangre (Ghasemzadeh y Ghasemzadeh, 2011; Panche et al., 2016). En este sentido, son moléculas muy atractivas en campos como la farmacia, la cosmética, la agricultura o la agroindustria.

#### 3.1.- ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Entre las notables bioactividades de los compuestos fenólicos, se ha estudiado ampliamente su actividad antioxidante. La capacidad de los antioxidantes para capturar radicales libres de oxígeno tóxicos es muy importante. Las formas reactivas de oxígeno, como los peróxidos, el superóxido y los radicales peroxi e hidroxilo, desempeñan un papel importante en el estrés oxidativo, contribuyendo al desarrollo de muchas enfermedades como la diabetes y la enfermedad de Alzheimer (Agnieszka et al., 2018).

Entre las plantas autóctonas que podemos encontrar en la Dehesa de Extremadura, las especies de *Cistus sp.* son plantas ricas en compuestos principalmente flavonoides y polifenoles con propiedades antioxidantes. Barrajón-Catalán et al., (2010) demostraron una alta capacidad antioxidante de los extractos fenólicos de *C. populifolius* y *C. ladanifer* al inhibir la formación de radicales de peróxidos lipídicos. Agnieszka et al. (2018) evaluaron la capacidad antioxidante de extractos obtenidos con etanol, hexano y agua de las hojas de *C. monspeliensis* y *C. salvifolius*, y atribuyeron esta actividad antioxidante a la presencia de fenoles, flavonoides y taninos. Stepień et al. (2018) determinaron 26 tipos de antioxidantes presentes en hojas y brotes de flores de

*C. salviifolius*, encontrando la mayor concentración de fenoles y flavonoides en los extractos obtenidos a partir de los brotes de flores.

Por otro lado, Carrasco et al. (2015) mostraron que los compuestos linalool y timol fueron los responsables de la actividad antioxidante de aceites esenciales obtenidos de *Lavándula stoechas*. Ácidos fenólicos y flavonoides como rutina y ácido cafeico presentes en *L. stoechas*, también presentaron actividad antioxidante (Apak et al., 2004).

En *Crataegus monogyna* se han detectado muchos polifenoles con propiedades antioxidantes, entre ellos: ácido clorogénico, epicatequina, hiperósido, quercetina, rutina, vitexina y procianidinas (Simirgiotis et al., 2013; Sokól-Letowska et al., 2007; Tadic et al., 2008). En general, se sabe que los flavonoides, en particular los flavonoles y flavonas, son abundantes en los brotes de flores, mientras que las proantocianidinas se encuentran en mayor cantidad en los frutos verdes.

Marouane et al. (2011) evaluó el efecto protector de *Malva sylvestris* sobre los daños renales inducidos por la intoxicación con metavanadato de amonio en ratas. La toxicidad del vanadio está asociada a la producción de oxígeno, que causa peroxidación lipídica y alteraciones en la defensa enzimática antioxidante. Estos autores, demostraron que *M. sylvestris* poseía la capacidad de aumentar significativamente la formación de radicales libres y las actividades enzimáticas antioxidantes gracias a la presencia de flavonoides.

Por otro lado, varios estudios *in vitro* evaluaron la actividad antioxidante de los principales compuestos aislados del **romero**, como carnosol, ácido carnósico, rosmanol, ácido rosmarínico, ácido oleanólico y ácido ursólico. Estos compuestos bioactivos y el aceite esencial confirmaron su actividad antioxidante (Beretta et al., 2011; Klancnik et al., 2009). En estudios *in vivo*, se adicionaron a ratas aceites esenciales de romero y ácido carnósico para evaluar las actividades de catalasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y óxido nítrico sintasa, así como la peroxidación lipídica y las especies reactivas de oxígeno, en los tejidos cerebrales y cardíacos. Los resultados mostraron una disminución del estrés oxidativo, ya que el romero dietético eliminó los radicales libres, inhibió la peroxidación lipídica y mejoró el estado antioxidante en los tejidos de las ratas (Botsoglou et al., 2010; Raškovi et al., 2014).

En cuanto a **Rubus sp.**, Yang y Choi (2017) mostraron que los extractos acuosos de la frambuesa negra (*R. coreanus*) tenían una mayor capacidad antioxidante que los extractos acuosos de la zarzamora (*R. fruticosus*) y la frambuesa (*R. idaeus*). Por otro lado, Ahmed et al. (2015) midieron la actividad antioxidante mediante el método DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo) de los extractos metanólicos de *R. ellipticus*, *R. niveus* y *R. ulmifolius*, y la mayor capacidad antioxidante se mostró en las moras de *R. ulmifolius*, seguidas de las frambuesas de *R. niveus* y *R. ellipticus*. Estos estudios indicaron la correlación de los compuestos fenólicos con la actividad antioxidante, ya que los extractos que presentaron mayores actividades fueron los que contenían niveles más altos de compuestos fenólicos, como antocianinas y quercetina.

Ferrera et al. (2017) revelaron el efecto protector del extracto de bellota de *Q. ilex* contra la degradación oxidativa de lípidos y la carboxilación de proteínas. Estos efectos podrían estar relacionados con la intensa actividad antioxidante de los polifenoles de la bellota. La actividad antioxidante del extracto de *Quercus* se puede atribuir al ácido gálico y ácido elágico. Otros compuestos fenólicos comunes de las especies de *Quercus* son ellagitanninas, que incluyen castalagina, vescalagina y roburina. Se ha demostrado previamente que estos compuestos tienen una alta actividad antioxidante (Chiarini et al., 2013).

**Morus alba** es una planta rica en compuestos bioactivos como flavonoides que tienen una alta capacidad antioxidante. La propiedad antioxidante de los flavonoides inhibió la modificación oxidativa de las lipoproteínas humanas (Swapan et al., 2012). Jha et al. (2018) aislaron oligopéptidos de 0,5-3 kDa de hojas de *M. alba* que presentaron una alta actividad antioxidante por los métodos DPPH, ABTS (2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]-sal de diamonio), óxido nítrico y FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). El fruto de *M. alba* también presentó altas actividades antioxidantes, siendo los compuestos responsables de la actividad fenilpropanoides y flavonoles (D'urso et al., 2020).

Por otro lado, los extractos de **espárragos** contienen una variedad de compuestos activos antioxidantes como flavonoides (Zhang et al., 2019). Sun et al. (2007) compararon la actividad antioxidante del brócoli, los espárragos y sus jugos utilizando ensayos de blanqueo del  $\beta$ -caroteno, DPPH y ABTS. Los resultados indicaron que los espárragos y su jugo tenían una mayor actividad antioxidante que el

brócoli y su jugo, dicha actividad se atribuyó principalmente al mayor porcentaje de flavonoides en los espárragos. Extracto de espárragos aplicado a ratas mostró efectos protectores contra la toxicidad inducida por bisfenol A, al mejorar la capacidad antioxidante (Poormoosavi et al., 2018).

Preethi et al., (2006) evaluaron el potencial antioxidante de un extracto procedente de *Caléndula officinalis* mediante la administración oral a ratones albinos. La administración oral durante 1 mes aumentó significativamente la actividad de la catalasa, los niveles de glutatión reductasa en la sangre y el hígado, y el glutatión peroxidasa disminuyó después de la administración del extracto de caléndula.

### **3.2.- ACTIVIDAD CARDIOPROTECTORA**

Los polifenoles podrían reducir la hiperlipidemia postprandial y el estrés oxidativo, un factor de riesgo bien definido para la aterosclerosis. La aterosclerosis puede producir condiciones patológicas como el infarto agudo de miocardio, la angina inestable y la muerte cardíaca súbita (Vita et al., 2005). Numerosos estudios demostraron que los polifenoles dietéticos podrían reducir el riesgo de trombosis, que es una de las principales causas de infarto de miocardio, enfermedad cardíaca isquémica, etc. (Santhakumar et al., 2013, 2015).

*Crataegus monogyna* es una de las plantas autóctonas de la Dehesa de Extremadura que se utiliza principalmente para tratar enfermedades cardiovasculares, debido a su capacidad de reducir importantes factores de riesgo como la inflamación, la hipertensión y la trombosis (Nabavi et al., 2015). En un estudio *in vitro* realizado por Long et al. (2006) compararon los efectos de extractos de espino y fármacos cardioactivos convencionales, los resultaron mostraron diferencias entre ellos; el fármaco convencional indujo arritmia en la mayoría de los cardiomiocitos tratados, mientras que el extracto de espino mejoró la ritmicidad. Años después, los mismos autores publicaron resultados adicionales, mostrando que el extracto de espino reduce la frecuencia de contracción de los cardiomiocitos cultivados a través de la activación de los receptores muscarínicos (Salehi et al., 2009). Attard et al. (2006) mostraron la actividad inhibitoria del extracto hidroetanólico de *C. monogyna* contra la enzima



convertidora de angiotensina (ECA). La composición química de este extracto mostró la presencia de ácidos triterpénicos, flavonoides y cumarinas. Ferrugia et al. (2013) confirmaron estos resultados al demostrar que los terpenos poseen afinidades de unión más altas a los receptores de la ECA que las registradas para captopril, enalaprilat y lisinopril.

Además, *Calendula officinalis* también podría ser cardioprotector contra la enfermedad cardíaca isquémica. Mukesh et al. (2011) utilizaron dos grupos de corazones de ratas: corazones tratados con una solución tampón con extracto de *C. officinalis*, y otro grupo, el control, que fue tratado solo con tampón. Los resultados revelaron que los extractos de caléndula lograron protección cardiovascular, ya que estos estimularon la presión desarrollada del ventrículo izquierdo y el flujo aórtico, así como redujeron el tamaño del infarto de miocardio y la apoptosis de los cardiomiocitos.

### 3.3.- ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Los polifenoles podrían desempeñar un papel importante en la lucha contra el cáncer ya que se han observado efectos anticancerígenos de polifenoles en la boca, el estómago, el duodeno, el colon, el hígado, los pulmones, la glándula mamaria y la piel. Li et al. (2014) han probado la actividad anticancerígena de muchos compuestos como proantocianidinas, flavonoides, resveratrol, taninos, epigallocatequina-3-galato, ácido gálico y antocianinas.

Los extractos de hojas de *Cistus populifolius* y *Cistus ladanifer* son ricos en polifenoles solubles en agua que contienen elagitaninos, los cuales presentan efectos antioxidantes y citotóxicos, capaces de inhibir la proliferación de células de cáncer de páncreas (M220) y células de cáncer de mama (MCF7/HER2 y JIMT-1) (Barrajón-Catalán et al., 2010). El Euch et al. (2015) también analizaron actividad anticancerígena del extracto de hojas y botones de flores de *C. salviifolius*. Determinaron que el extracto del botón de flor mostraba actividad citotóxica contra las células carcinoma de ovario (OVCAR) y carcinoma de mama (MCF7). Sin embargo, el extracto obtenido de hoja no

presentó actividad citotóxica contra ninguna de las líneas tumorales. Los extractos obtenidos mostraron altos contenidos de polifenoles y flavonoides estando correlacionados con la actividad antitumoral.

Otros autores, evaluaron el efecto citotóxico de los aceites esenciales de *L. stoechas* contra algunas líneas celulares de cáncer: KB (carcinoma epidermoide humano), LNCaP (cáncer de próstata dependiente de hormonas humano), BC1 (cáncer de mama humano), P388 (leucemia de ratón), LU1 (cáncer de próstata humano), COL-2 (cáncer de colon humano) y KV-B (+VLB) (KB resistente a fármacos). Los aceites esenciales presentaron alta actividad contra COL-2 y moderada contra LNCaP; las células P388 fueron altamente sensibles al extracto de cloroformo de *L. stoechas* (Goren et al., 2002).

Otra de las plantas autóctonas de la Dehesa de Extremadura, *Malva sylvestris*, posee propiedades anticancerígenas. Danielle et al. (2007) demostraron en ratones la actividad citotóxica de los extractos de hojas de *M. sylvestris*, realizando un ensayo de MTT y líneas celulares de cáncer humano. Las pruebas biológicas mostraron que los extractos de *M. sylvestris* disminuyeron significativamente las líneas celulares de cáncer (Mazraedoost y Behbudi, 2021a, 2021b).

El **romero** es rico en compuestos fenólicos, y compuestos diterpenos como el ácido carnósico y el ácido carnosol, estos compuestos tienen una gran relevancia antitumoral. Se han realizado varios estudios *in vitro* sobre la citotoxicidad de estos ácidos en células de cáncer humano, como células de cáncer de mama y de colon. Estos estudios mostraron una disminución de la viabilidad celular utilizando el ácido carnosol de manera dependiente de la dosis, incluyendo células tumorales resistentes, lo que reveló que este compuesto es un enfoque antitumoral complementario (González-Vallinas et al., 2013). A partir de experimentos *in vivo*, realizando un modelo de lesiones gástricas inducidas por HCl/EtOH en ratones, se demostró que el ácido carnósico y sus derivados ésteres eran efectivos para prevenir las lesiones gástricas (Theoduloz et al., 2011).

El género *Quercus* ha sido ampliamente estudiado por su alta actividad contra la inflamación y la proliferación de células cancerosas. Los principales compuestos anticancerígenos identificados en las especies *Quercus* son el ácido elágico, la

kaempferol y sus glucósidos, la quercetina y la miricetina (Baliga et al., 2019; Calderón-Montaño et al., 2011). Farhad et al. (2016) evaluaron la actividad antiproliferativa del extracto de *Q. bratii*, los resultados revelaron que el extracto inhibió la proliferación de células de cáncer a través de mecanismo de la inducción de apoptosis temprana. Hasan et al. (2019) observaron la eliminación completa del cáncer de pulmón de células grandes debido a compuestos presentes como betulina en extracto de hojas de *Q. incana*. Elansary et al. (2019) estudiaron la actividad de extractos de corteza de *Q. macrocarpa* y *Q. robur* frente a diferentes células cancerosas como MCF-7 (línea celular de cáncer de mama), HeLa (células de cáncer cervical), Jurkat (células de linfocitos T humanos), HT-29 (línea celular de cáncer de colon humano), HEK 293 (células renales embrionarias humanas) y T24 (células de cáncer de vejiga urinaria humana). Los resultados mostraron una gran regresión de las células ensayadas al tratarlas con los extractos.

*Morus alba* presenta capacidad de protección contra el cáncer debido a la cantidad de antioxidantes disponibles que tiene. Se han realizado varios estudios en diversas células cancerosas humanas, incluyendo cáncer cervical, carcinoma de pulmón, carcinoma hepatocelular, cáncer de mama y cáncer colorrectal, para verificar la capacidad anticancerígena de *M. alba* (Fallah et al., 2016; Fathy et al., 2013; Soltanian et al., 2017; Zhang et al., 2018). Un estudio reciente informó que las hojas de *M. alba* tenían actividad citotóxica *in vitro* e *in vivo* debido a compuestos como morusina, morachalcona B, morachalcona C, moracina D, moracina X, calcomoracina y DNJ (Chan et al., 2020).

Por otro lado, Zhao, (2012) evaluó la actividad antitumoral de los extractos etanoicos ricos en saponinas del tallo de **espárragos**. Los resultados mostraron que las saponinas tenían una actividad citotóxica significativa dependiente de la dosis contra tres líneas celulares de tumor, cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de páncreas. Además, Xu et al. (2021) observaron efectos de inhibición dependientes de la dosis de los polisacáridos de espárragos en cuatro células de cáncer de endometrio.

### 3.4.- ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA

La inflamación excesiva se considera un factor crítico en muchas enfermedades humanas, incluyendo la obesidad, la diabetes tipo II, las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento. Las plantas son una buena fuente de compuestos bioactivos, por ello, la búsqueda continua de compuestos naturales de plantas con actividad antiinflamatoria ha sido ampliamente documentada.

Varios estudios han investigado la actividad antiinflamatoria y analgésica aguda de extractos acuosos obtenidos de *Cistus ladanifer* (El Euch et al., 2015) y *Cistus salviifolius* (Sayah et al., 2017) mediante la inducción de edema inyectando carragenina en la pata de ratas. Los extractos de ambas especies de *Cistus* redujeron significativamente la inflamación.

Algieri et al. (2016) encontraron un efecto antiinflamatorio en extractos obtenidos de *L. stoechas*, con valores similares a los registrados por un fármaco antiinflamatorio esteroideo (dexametasona glucocorticoide). Las ratas tratadas con el extracto de *L. stoechas* mostraron una reducción del edema del tejido de 1 cm a 2 cm. Por otro lado, extractos de flavonoides y mucílagos obtenidos de *L. stoechas* redujeron significativamente el edema en las patas de las ratas en un  $85,1 \pm 6,2\%$  y un  $61,71 \pm 7,3\%$ , respectivamente (Ez zoubi et al., 2016).

En un modelo de edema inducido por carragenina realizado en la pata de rata, la administración oral del extracto de espino (*C. monogyna*) mostró un efecto antiinflamatorio (Barros et al., 2012). En el mismo estudio se informó que a una dosis de 200 mg/kg, el extracto mostró una efectividad del 72,4%, frente a la indometacina que mostró una reducción del 50% en el edema.

Por otro lado, el extracto hidroalcohólico de hojas de *Malva sylvestris* mostró un efecto antiinflamatorio en la hinchazón inducida por aceite de croton en las orejas de ratones (Wilson, 1998). Varios estudios demostraron la actividad antiinflamatoria de *M. sylvestris* (Sleiman y Daher, 2009), confirmando que sus hojas tienen propiedades antiinflamatorias tópicas debido al compuesto malvidina 3-glucósido.

Entre varios compuestos de *R. officinalis*, el carnosol es uno de los más investigados por sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas. Varios estudios *in*

*vitro* han mostrado una aplicación potencial para la prevención de enfermedades inflamatorias (Kuo et al., 2011). El aceite esencial de romero se ha utilizado tópicamente para el dolor muscular y reumático, evaluado mediante pruebas de pleuritis inducida por carragenina y edema inducido por carragenina en pata de ratas. Estos estudios indicaron que el aceite esencial podría disminuir notablemente el edema inducido y reducir significativamente el volumen del exudado pleural, teniendo efectos antiinflamatorios y antinociceptivos (Lucarini et al., 2013). Rosenbaum et al. (2010) demostraron uso de triterpenos, ácido ursólico, ácido oleanólico y ácido micromérico como suplementos dietéticos para la osteoartritis y la artritis reumatoide. Estos compuestos (obtenidos de diferentes extractos de hojas de romero) fueron capaces de disminuir la actividad antiinflamatoria tópica en orejas de ratones.

En cuanto a los extractos fenólicos de las hojas de *Qercus ilex*, disminuyeron la infiltración de neutrófilos y redujeron las citocinas inflamatorias en ratas con colitis ulcerosa inducida por TNBS (Castejón et al., 2019).

Finalmente, Preethi et al. (2009) demostraron que el extracto etanólico de *Caléndula officinalis* tenía una actividad antiinflamatoria significativa contra el edema inducido por carragenina y dextrano en pata de ratas.

### **3.5.- ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

La mayoría de las plantas producen metabolitos secundarios antimicrobianos como alcaloides, flavonoides, terpenoides, fenólicos, glucósidos, taninos y ácidos grasos, ya sea como parte de su crecimiento y desarrollo, o en respuesta al estrés o ataque de patógenos (Ribera y Zúñiga, 2012). Estos compuestos han demostrado tener altas actividades antibacterianas, antifúngicas y antivirales (Eloff y McGaw, 2014; Raut y Karuppayil, 2014; Yaniha et al., 2020). Muchos aceites esenciales inhiben las infecciones fúngicas y prolongan la vida útil de muchos cultivos en condiciones de almacenamiento (Tripathi y Dubey, 2004). Los aceites esenciales también inhiben la producción de micotoxinas de varias especies de hongos (Sivakumar y Bautista-Banos, 2014).

Se han estudiado la actividad antimicrobiana de plantas autóctonas de la Dehesa como la especie *Cistus ladanifer*. Compuestos fenólicos como punicalagina y galato resultaron ser eficaz contra *Candida albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* (Barros et al., 2013). Barraón-Catalán et al. (2010) también observaron que el extracto de *C. ladanifer* inhibió el crecimiento de la bacteria Grampositiva *Staphylococcus aureus*. Mahmoudi et al. (2016) observaron la actividad de extractos acuosos obtenidos de hojas de *C. monspeliensis* y *C. salvifolius* contra bacterias patógenas Gramnegativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*), dos bacterias Grampositivas (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*) y dos especies de hongos y levaduras (*Aspergillus niger* y *Cándida albicans*).

Varios estudios han demostrado que los aceites esenciales de *Lavándula stoechas* son más efectivos contra bacterias Grampositivas que contra bacterias Gramnegativas, posiblemente debido al lipopolisacárido de su pared celular (Bouzouita et al., 2005; Kaplan et al., 2007). Entre los principales compuestos con actividad antimicrobiana de los aceites de *L. stoechas*, se destacan el alcanfor y el 1,8-cineol, especialmente contra *S. aureus*, *E. coli* y *Listeria monocytogenes* (Hendry et al., 2009; Mahboubi et al., 2009).

Benabdelkader et al. (2011) evaluaron la actividad antifúngica de 11 aceites esenciales de *L. stoechas* y observaron la inhibición del crecimiento de hongos filamentosos como *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum* y levaduras (*C. albicans*). Además, los aceites esenciales de *L. stoechas* se probaron en cultivos de diversas cepas de origen clínico (*C. albicans*, *C. krusei* y *C. guilliermondii*). Se ha determinado que la actividad antifúngica de estos aceites esenciales está relacionada con la presencia de compuestos antifúngicos como alcanfor, 1,6-cineol y fenchona, y el efecto sinérgico de los componentes principales y secundarios de este aceite (Benabdelkader et al., 2011; Zuzarte et al., 2013).

También fue evaluada la actividad antimicrobiana del extracto de espino (*C. monogyna*), que mostró una actividad bactericida moderada, especialmente contra bacterias Grampositivas como *Micrococcus flavus*, *Bacillus subtilis* y *L. monocytogenes*, sin tener efecto contra *Candida albicans* (Barros et al., 2012).

En estudios anteriores se ha evaluado la actividad antimicrobiana del extracto de *Malva sylvestris* contra algunas bacterias patógenas. Razavi et al. (2011) demostraron que el extracto de flores de *M. sylvestris* tenía altos efectos antibacterianos contra bacterias patógenas, como *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*. En un estudio realizado por Shadid et al. (2021), el extracto de acetona de esta planta mostró una alta actividad antibacteriana contra *Proteus vulgaris* y *S. aureus*. Otros estudios también han demostrado las propiedades citotóxicas del extracto de *M. sylvestris* contra *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (Mohammed et al., 2011), *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus* (Zohra et al., 2013), *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (Razavi et al., 2011), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Vahabi et al., 2019) y especies de *Candida* (Cardoso et al., 2012).

Varios estudios experimentales *in vitro* han evaluado un posible efecto sinérgico entre los compuestos antimicrobianos presentes en el aceite esencial de **romero**. Estos estudios se llevaron a cabo probando el ácido carnósico, el carnosol, el ácido rosmarínico, el ácido oleanólico, el ácido ursólico y el aceite esencial, contra bacterias Grampositivas (*Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* y *Bacillus subtilis*), tres bacterias Gramnegativas (*Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa* y *E. coli*) y dos hongos (*C. albicans* y *A. niger*). Todos mostraron actividad antibacteriana y antifúngica (Luqman et al., 2007; Swamy et al., 2016). También otros estudios han demostrado la actividad antibacteriana del aceite de romero contra *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *Clostridium perfringens*, *Aeromonas hydrophila*, y *Salmonella choleraesuis* (Burt et al., 2004). Este aceite esencial se incorporó en carne, mostrando actividad antibacteriana contra *Brochothrix thermosphacta* y *Enterobacteriaceae* (Sirocchi et al., 2013).

En el caso de la *Rubus ulmifolius* (zarzamora), se estudió la actividad antimicrobiana de sus extractos frente a 6 cepas de bacterias (*E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus agalactiae* y *Candida albicans*). Todos ello, mostraron un buen efecto contra los patógenos analizados, especialmente frente a *E. coli*, *S. agalactiae* y *C. albicans* (Hajaji et al., 2017).

El extracto de la corteza de *Quercus* contiene importantes compuestos antimicrobianos como el ácido gálico, el ácido elágico, la vescalagina o castalagina, efectivos contra diferentes cepas de *Pseudomonas* (Sorrentino et al., 2017). Otras

investigaciones han atribuido la capacidad inhibitoria del crecimiento de varios microorganismos patógenas transmitidas por alimentos (*E. coli* y *Salmonella*) al principal compuesto fenólico en *Q. ilex*, las catequinas (Ma et al., 2019; Rashidinejad et al., 2021; Zhou et al., 2022). Por otro lado, el extracto en polvo de hojas de *Q. ilex* mostró una alta actividad antimicrobiana frente a *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* y *S. aureus* (Sánchez-Gutiérrez et al., 2022).

También se ha demostrado el efecto antimicrobiano de los compuestos fenólicos presentes en extractos de hojas de *Morus alba* frente a bacterias patógenas como *S. aureus*, *B. cereus* y *Pseudomonas* (Suwansri et al., 2008). Thabti et al. (2014) encontraron que el extracto de hojas de *M. alba* mostraron actividad antibacteriana contra *Salmonella ser. Typhimurium*, *S. epidermis* y *S. aureus*. Por otro lado, la morina aislada de los frutos de *M. alba* ejerció una actividad moderada inhibitoria del crecimiento contra *Streptococcus* spp. (Yang et al., 2012). La pectina aislada del fruto de *M. alba* mostró actividad antibacteriana contra bacterias Grampositivas y Gramnegativas: *B. cereus*, *S. aureus*, *Streptococcus mutans*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. typhimurium* (Kumar et al., 2020).

Por último, extractos de *Calendula officinalis* inhibieron el crecimiento de bacterias como *S. aureus* y *E. coli*, mostrando mayor efecto inhibitorio sobre *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *C. albicans* y *A. niger* (Roopashree et al., 2008). Se estudió la actividad antimicrobiana de extractos de *C. officinalis* extraídos con diferentes solventes (etanol, metanol, acetona y cloroformo) frente a bacterias Grampositivas (*E. coli* y *S. aureus*), y Gramnegativas (*Salmonella typhae* y *Vibrio cholerae*). Los extractos obtenidos con etanol fueron los más efectivos contra *E. coli*, *Vibrio cholerae* y *C. albicans*, mientras que el extracto metanoico solo fue activo contra *C. albicans*. Sin embargo, el extracto clorofórmico presentó actividad frente a todos los microorganismos ensayados y el acetónico sólo frente *E. coli* (Dahake et al., 2009).



### 3.6.- OTRAS BIOACTIVIDADES DE LOS COMPUESTOS

Además de las bioactividades mencionadas anteriormente, los compuestos bioactivos de las plantas han mostrado tener otros efectos beneficiosos para la salud. Aziz et al. (2006) demostraron que el extracto acuoso de *Cistus ladanifer* presenta actividad frente a tratamientos curativos y preventivo para la hipertensión y la posibilidad de utilizarlo en el tratamiento de trastornos gastrointestinales.

Varios estudios han evaluado el uso de *Lavándula stoechas* para tratar la diabetes o reducir los niveles de hiperglucemia (Barkaoui et al., 2017; Bouayyadi et al., 2013). Un estudio *in vivo* realizado por Sebai et al. (2013) sobre la actividad antidiabética del aceite esencial de *L. stoechas* reveló un efecto protector contra la hiperglucemia y el estrés oxidativo.

Por otro lado, los extractos de pulpa y semillas de *C. monogyna* (espino) fueron aplicados animales de experimentación y causaron depresión del sistema nervioso central y disminución del comportamiento exploratorio y la actividad locomotora de los animales. Además, el espino también mostró efectos analgésicos, que fueron antagonizados por la naloxona (Can et al., 2010).

Los extractos etanoicos obtenidos de inflorescencias y hojas de *Malva sylvestris* tuvieron un impacto significativo sobre *Helicobacter pylori*. Esta cepa bacteriana desempeña un papel esencial en el tratamiento de úlceras pépticas y cánceres gástricos (Kumar et al., 2018). La aplicación tópica de estos extractos etanoico en ratas aumentó la velocidad de curación de úlceras cutáneas y redujo la duración de su proceso de reparación (Mousavi et al., 2021).

En varios estudios se ha demostrado que el **romero** disminuye la glucosa en sangre. En estudios *in vivo* con ratas han observado la inhibición de la lipasa gástrica en el estómago mejorando los perfiles de triglicéridos después del tratamiento con altos contenidos de ácido carnósico (Romo et al., 2012; Tu et al., 2013). Por lo tanto, el ácido carnósico junto con el carnosol resultaron ser los compuestos más relevantes en el control glucémico. Sin embargo, el ácido rosmarínico parece tener potencial contra enfermedades neurodegenerativas. Se encontró que este compuesto inhibe la

acetilcolinesterasa y tiene efectos colinérgicos y neuroprotectores (Ozarowski et al., 2013; El Omri et al., 2012).

La floridzina es un glucósido de dihidrocalcona detectado en concentraciones altas en las hojas de *Quercus*. Este compuesto es reconocido por sus propiedades astringentes y efectos antidiabéticos (Rocha-Guzmán et al., 2019). Uno de los efectos interesantes de extracto de hojas y corteza de *Q. salicina* fue vasodilatador en la arteria coronaria del endotelio porcino (Park et al., 2016). Youn et al. (2017) demostraron que extracto de hojas y corteza de *Q. gilva* inhibió el desarrollo de la urolitiasis en modelos animales. Por otro lado, *Q. infectoria* puede ser utilizado como analgésico para el alivio del dolor leve (Khairon et al., 2016) o por su actividad antiosteoporótica (Abdullah et al., 2018).

Ahn et al. (2017) suplementaron con extractos obtenidos de hojas de *M. alba* a ratones diabéticos durante 14 días y encontraron una reducción significativa en el colesterol total plasmático, colesterol TC hepático y concentraciones de triglicéridos. Además de una significativa disminución de la glucosa y la insulina plasmáticas, y niveles elevados de quinasa de proteína S6 (pS6K), proteína quinasa activada por fosforilación (pAkt) y proteína quinasa activada por fosforilación (pAMPK). También se ha demostrado que la suplementación durante dos semanas de ratones con extracto de fruta de *M. alba* pudo mejorar la sensibilidad a la insulina y reducir la producción hepática de glucosa en ratones diabéticos tipo 2 (Choi et al., 2016). Estos animales mostraron un nivel significativamente menor de glucosa en sangre y hemoglobina glicosilada (HbA1c) en comparación con los grupos de ratones diabéticos control. Por otro lado, las hojas de *M. alba* también mostraron habilidades para disminuir la obesidad, reducir la adiposidad visceral y las alteraciones cardio metabólicas, lo cual se atribuyó a sus compuestos fenólicos, en particular al ácido clorogénico, quercetina, ácido cafeico, rutina y kaempferol (Metwally et al., 2019).

Los extractos de **espárragos** mostraron efectos positivos en las actividades inmunomoduladoras (Tian et al., 2013). Se ha demostrado que los polisacáridos de espárragos mejoran significativamente la función fagocítica de los macrófagos peritoneales de ratones normales, promueven la formación de hemolisina y placas hemolíticas, y mejoran la tasa de conversión de linfocitos (Xie, 2008). Por otro lado, se evaluaron en ratas diabéticas inducidas por STZ los efectos antidiabéticos de los

extractos de espárragos, y mostraron la misma eficacia que el fármaco antidiabético glibenclamida a una dosis de 500 mg/kg (Wang y Zhou, 2016). Zhao (2010) también observó que extractos de tallos de espárragos mostraron notables efectos hipoglucémicos, siendo los principales componentes flavonoides totales, polifenoles, saponinas y polisacáridos. Demostraron que podían frenar eficazmente el aumento de azúcar en sangre y proteína sérica. Li, (2011) estudió la actividad reductora del colesterol de los polisacáridos del tallo viejo de espárragos utilizando el modelo de ratón de hiperlipidemia por vía gástrica, lo que mostró que los polisacáridos de espárragos tenían un cierto efecto inhibitorio sobre el crecimiento del peso corporal en ratones. Al mismo tiempo, los polisacáridos podrían reducir los niveles de colesterol sérico, colesterol de lipoproteínas de baja densidad e índice de aterosclerosis para regular el metabolismo de los lípidos sanguíneos.

Chakraborty et al. (2011) indujeron diabetes a ratas mediante una sola inyección intraperitoneal de aloxano lo que produjo un aumento significativo de los niveles de glucosa en sangre y los niveles de azúcares en la orina. Después le administraron mediante vía oral extracto de *Calendula officinalis* y observaron que la glucosa en sangre y el azúcar en la orina se redujeron significativamente en las ratas diabéticas en comparación con el grupo de ratas diabéticas. El extracto de cloroformo de las flores inhibió la replicación del VIH-1 en células linfocíticas MOLT-4 infectadas agudamente *in vitro*. Un extracto de cloroformo también inhibió la actividad de la transcriptasa inversa del VIH-1 de manera dependiente de la dosis (Kalvatchev et al., 1997).

## 4.- MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS

Las técnicas utilizadas para la extracción de compuestos bioactivos, como los compuestos fenólicos de plantas aromáticas y medicinales, se pueden dividir en tres grupos: convencionales, no convencionales y una combinación de ambos grupos o dos o más técnicas.

Entre las **técnicas convencionales** más utilizadas de extracción de compuestos fenólicos destaca la extracción sólido-líquido (ESL) o extracción Soxhlet, y la extracción líquido-líquido (ELL) o maceración (Alara et al., 2018a, Alara et al., 2018b).

La extracción sólido-líquido es un proceso sencillo que consiste en macerar una muestra pulverizada con un solvente adecuado, el más común es el etanol combinado con agua, donde se agita constantemente a temperatura ambiente durante un tiempo determinado (Casquete et al., 2022; Olejar et al., 2015). Una vez macerado, se aplica un proceso de separación para separar las partes sólidas del solvente, mediante filtración o decantación (Ćujić et al., 2016). Además, este método de extracción convencional a menudo implica una etapa de concentración del extracto mediante un proceso de evaporación que es demorado (Alara et al., 2021). Aunque esta técnica es fácil, generalmente son procedimientos manuales y requieren mucho tiempo y trabajo. Además de utilizar grandes volúmenes de solventes de extracción (Alara et al., 2018a; Alara et al., 2018b).

Buscando una solución a estas desventajas, se han realizado avances en los procesos de extracción con la aplicación de nuevas tecnologías utilizando **métodos no convencionales** como por ejemplo, la extracción con fluido supercrítico (Casquete et al., 2022; Gallego et al., 2019; Pimentel-Moral et al., 2019; Rivas et al., 2021), la extracción asistida por microondas (Cassol et al., 2019; Rodsamran y Sothornvit, 2019), la extracción con fluido presurizado (Santana et al., 2019) y la extracción asistida por ultrasonido (Casquete et al., 2022; Deng et al., 2017; Wen et al., 2018; Gudiño et al., 2022) han demostrado reducir el volumen de solvente y el tiempo de extracción, además de disminuir la temperatura y los requisitos de energía. Estos avances han mostrado procesos de extracción más eficientes y sostenibles.

Entre las técnicas no convencionales, la extracción asistida por ultrasonido (EAU) es un método prometedor y ampliamente utilizado para la extracción de compuestos fenólicos de plantas aromáticas y medicinales debido a su simplicidad, alto rendimiento y calidad de extracción, bajo costo y facilidad de escalamiento (Khoddami et al., 2013). La EAU es una técnica que propaga ondas ultrasónicas de baja frecuencia (es decir, 20 kHz) con una alta potencia de sonido o intensidad de sonido (generalmente superior a  $1 \text{ W cm}^{-2}$ ) en el solvente líquido utilizado para la extracción sólido-líquido. La extracción asistida por ultrasonido utiliza la energía ultrasónica de alta intensidad creada por la implosión de burbujas de cavitación (Figura 26). La alta presión rompe las partículas del material, destruye las membranas celulares, mejora la penetración del solvente y aumenta la superficie de contacto entre las caras sólida y líquida, lo que resulta en la liberación de compuestos fenólicos al solvente de extracción en un tiempo relativamente corto (Martínez-Ramos et al., 2020; Wen et al., 2018).

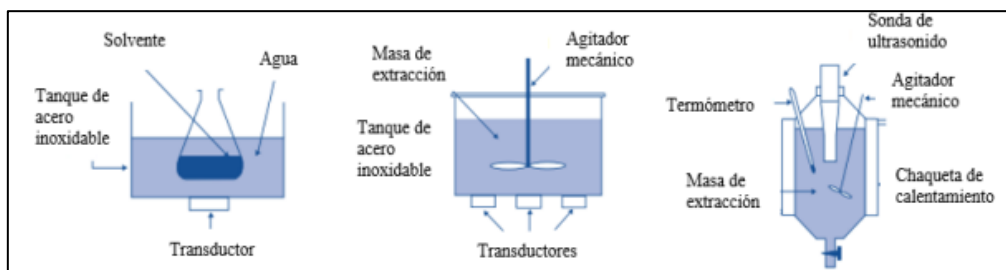


Figura 26. Procesos de extracción asistida por ultrasonido (EAU) (fuente: Azuola y Vargas, 2007).

Varios trabajos han utilizado la aplicación de ultrasonido para la extracción de compuestos fenólicos de diferentes matrices, incluyendo hojas de olivo (Irakli et al., 2018), salvado de sorgo rojo (Luo et al., 2018), flores de acacia negra (*Robinia pseudoacaciae*) (Savic-Gajic et al., 2019), hojas de árbol de té con aroma a limón (Saifullah et al., 2020), *Lavandula stoechas* (Ez Zoubi et al., 2021), *Lavandula pedunculata* subsp. *lusitánica* (Mansinhos et al., 2021). Estos trabajos han demostrado que el método de EAU requiere un menor volumen de solvente, un mayor volumen de muestra probada y un menor tiempo de extracción. También se ha acordado que un tiempo de sonicación más corto y temperaturas más bajas mejoran la extracción de compuestos fenólicos y la preservación de los compuestos termolábiles (Alara et al., 2021).

## **5.- USOS DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA, TENDENCIAS: ACEITES ESENCIALES**

Las plantas medicinales se utilizan ampliamente como agentes aromatizantes en bebidas, alimentos y suplementos dietéticos. Durante años, hemos empleado estas hierbas como condimentos y especias en nuestras comidas debido a su capacidad para aportar un sabor especial. Además, sus propiedades antioxidantes pueden desempeñar un papel fundamental en la mejora de la salud.

La incorporación de compuestos naturales a los alimentos con el fin de conservar sus propiedades nutricionales y sus niveles de calidad aumentando su vida útil, está experimentando un crecimiento sostenido a lo largo de los últimos años. Este crecimiento es debido a la tendencia que está adoptando la sociedad en referencia a la búsqueda de hábitos más saludables y a una mayor exigencia de la legislación en materia de seguridad alimentaria (Sacchetti et al., 2005).

En los últimos años, los compuestos antimicrobianos y antioxidantes se han considerado como alternativas para la conservación de los alimentos. Estos compuestos bioactivos, presentes en pequeñas cantidades en los alimentos, pueden modular uno o más procesos metabólicos que aportan beneficios para la salud y mejoran el valor nutricional (Sacchetti et al., 2005).

Los aceites esenciales son una fuente rica de compuestos bioactivos presentes en plantas aromáticas y medicinales, los cuales han sido ampliamente utilizados en diversas industrias debido a sus propiedades terapéuticas y beneficios para la salud. Se han utilizado en la industria alimentaria para aumentar la vida útil de los alimentos por sus propiedades antimicrobianas (Holley et al., 2005), antifúngicas (Bajpai et al., 2012) y antioxidantes (Roby et al., 2013; Teixeira et al., 2012).

Muchos estudios indican que los compuestos fenólicos tienen actividad antimicrobiana/antifúngica (Redondo-Blanco et al., 2019). Especialmente los derivados de ácidos hidroxicinámicos y cinámicos, como el ácido cafeico, el ácido clorogénico, el ácido p-cumárico y los ácidos ferúlicos son ampliamente reconocidos como fenólicos retardadores del crecimiento microbiano (Rodríguez et al., 2008; Vaquero et al., 2007).

de Elguea-Culebras et al. (2016) han utilizado especies de plantas pertenecientes a la familia *Lamiaceae* (*Hyssopus officinalis*, *Thymus mastichina*, *Lavandula*, *Salvia lavandulifolia*) para obtener extractos con capacidades antifúngicas frente a *Penicillium verrucosum*. Entre los extractos fenólicos ensayados, los de *Hyssopus officinalis* mostraron la mayor actividad antifúngica. También observaron que la capacidad antifúngica no estaba asociada a la cantidad de fenoles totales presentes en los extractos, lo que implica que sólo determinados compuestos y posibles efectos sinérgicos son los responsables de sus propiedades antifúngicas *in vitro*.

Además del uso de estos extractos como agentes antimicrobianos, los aceites esenciales, como el de limón y el de romero, actúan como potentes antioxidantes, protegiendo los alimentos de la oxidación y el deterioro. Extractos de romero ricos en ácido rosmarínico, camosol y ácido carnosídico han sido utilizados para enriquecer muestras de aceite de oliva (Rached et al., 2014). Observaron que algunos de los parámetros fisicoquímicos de calidad no se vieron significativamente afectados, como la acidez, el índice de peróxidos o los coeficientes de extinción en el ultravioleta. Sin embargo, el extracto de romero aportó compuestos antioxidantes al aceite de oliva y, por tanto, incrementó la actividad antioxidante y la estabilidad del aceite de oliva. Taleb et al. (2016) utilizaron plantas aromáticas (romero y laurel) como aditivo del aceite de oliva y vieron que estas plantas mejoraron la calidad fisicoquímica y organoléptica del aceite aumentando el valor del contenido de fenoles totales y preservándoles frente a la autooxidación. Díaz-Montaña et al. (2023) evaluaron el impacto en la evolución del proceso oxidativo durante un estudio de vida útil de seis meses del aceite de oliva virgen enriquecido con hierbas de romero y albahaca. Los resultados mostraron que las muestras de aceite de oliva virgen enriquecidas con las hierbas retardaron la oxidación del aceite, aunque este efecto fue más notorio a partir del 3 mes. Del mismo modo, los extractos fenólicos de plantas aromáticas y medicinales como del género *Lavanda* podrían utilizarse también para la mejora de las propiedades antioxidantes de los artículos de panadería. Vasileva et al. (2018) demostraron que extractos de lavanda y de melisa aumentaron la capacidad antioxidante y mejoraron la vida útil del pan.

Para controlar los cambios oxidativos en las carnes procesadas, se suelen utilizar antioxidantes sintéticos como el butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT). En este contexto, se empleó un extracto oleosoluble de romero en una

formulación de salchichas congeladas para reducir los valores de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) y disminuir la pérdida de color rojo (Sebranek et al., 2005); aparentemente, este aditivo natural fue más eficaz que el sistema BHA/BHT para prevenir las alteraciones de calidad en la salchicha congelada. Además, se ha informado de que los extractos hidrosolubles de romero muestran una protección significativa frente a la oxidación lipídica y el cambio de color en el pavo cocido durante el almacenamiento refrigerado, aumentando así la calidad y la vida útil del producto (Yu et al., 2002).

En general, los extractos fenólicos de subproductos de plantas aromáticas y medicinales no se consideran olorosos, ya que la eliminación de compuestos aromáticos volátiles se ha producido en gran medida durante el proceso de destilación de los aceites esenciales. La ausencia de estos constituyentes aromáticos (volátiles) podría considerarse ventajosa cuando dichos extractos están destinados a ser utilizados como aditivos en productos alimenticios. Además, también deben tenerse en cuenta otros factores cuando estos extractos fenólicos vayan a utilizarse en diferentes matrices alimentarias con fines de conservación; es decir, la composición de los extractos, la concentración de fenoles específicos, así como la posible interacción con otros constituyentes de la matriz alimentaria (Skendi et al., 2022).

El uso de envases activos presenta numerosas ventajas de conservación para mantener la frescura y otros atributos de calidad y, en consecuencia, aumentar la vida útil del producto. Por ello, el uso de envases activos representa una nueva tendencia en la conservación de alimentos y otros productos básicos sensibles al deterioro. Los materiales activos, según el artículo 3 del REGLAMENTO (CE) n° 450/2009 DE LA COMISIÓN sobre materiales y objetos activos e inteligentes en contacto con alimentos, son "materiales y objetos destinados a prolongar la vida útil o a mantener o mejorar el estado de los alimentos envasados". Los envases alimentarios activos e inteligentes destinados a ser utilizados en la Unión Europea están regulados por el citado Reglamento. En general, los materiales de envasado activos deben figurar en la lista comunitaria de sustancias admisibles antes de su comercialización y su composición debe ir acompañada de una declaración escrita de conformidad no sólo en el momento de su venta, sino también en todas las fases de su comercialización.



Recientemente, los compuestos naturales que presentan actividad antioxidante/antimicrobiana están resultando atractivos para la industria del envasado. Tanto la actividad antioxidante como la antimicrobiana, que marcan la funcionalidad de estos aditivos naturales, son necesarias para controlar eficazmente tanto el deterioro microbiano como las reacciones de oxidación en los alimentos, que a su vez están relacionadas con problemas de seguridad y deterioro de la calidad del producto; estos procesos de deterioro representan aspectos de calidad cruciales para la industria alimentaria.

Dado que los aceites esenciales son odoríferos y tienen una alta volatilidad, su participación en los envases convencionales es difícil de manejar. Sin embargo, otros compuestos fenólicos de las plantas aromáticas y medicinales han sido investigados para examinar sus usos potenciales como sustituto de los antioxidantes sintéticos en los envases, protegiéndolos al mismo tiempo de la oxidación y/o del crecimiento microbiano. Del mismo modo, los recubrimientos comestibles, representan un vehículo alternativo para preservar los atributos de calidad y controlar el crecimiento microbiano, particularmente cuando se incluyen en su formulación compuestos activos como los extractos fenólicos de plantas. Barbosa-Pereira et al. (2014) determinaron que películas activas con la incorporación de extracto comercial de romero redujeron sustancialmente la oxidación lipídica en lonchas de carne de vacuno e incluso detuvieron la oxidación durante 6 días cuando se utilizaron en niveles altos (20%). Además, demostraron que envolver las lonchas de vacuno con películas recubiertas de extractos naturales las protegía frente a la oxidación lipídica, de forma similar a la obtenida por la adición directa del extracto natural como aditivo en la carne. Nerín et al. (2006) también informaron de resultados similares cuando utilizaron otro extracto comercial de romero como aditivo en el envasado de película de polipropileno para proteger la oxidación en la carne de vacuno; han logrado sobre un 43% de inhibición de la oxidación lipídica en el día 14 de almacenamiento, comparable a la encontrada por la adición directa del extracto a las muestras de carne. Según Bolumar et al. (2011), el tipo de compuestos presentes en el material de envasado que está en contacto con la superficie del alimento es un factor importante que controla la tasa de oxidación lipídica. En este estudio, se aplicó un extracto etanoico de romero al 10% (que contenía un 4,5% de ácido carnósico) directamente sobre plástico doméstico ordinario y se envolvieron hamburguesas de pechuga de pollo picada. El paquete activo antioxidante fue eficaz

## *Introducción*

para retrasar la oxidación hasta 25 días tanto en la superficie como en el interior de las hamburguesas, mejorando así la vida útil del producto.

## **OBJETIVOS**

---



El **objetivo general** de esta **Tesis Doctoral** es la revalorización de plantas aromáticas autóctonas de la Dehesa Extremeña mediante la búsqueda de estrategias que permitan obtener compuestos bioactivos de las plantas para su uso en alimentación con el objetivo de obtener productos sanos y seguros, favoreciendo la sostenibilidad del entorno de la Dehesa Extremeña.

Para la consecución de este objetivo general son necesarios los siguientes **objetivos específicos**:

1. Selección de plantas aromáticas, escasamente estudiadas y obtenidas de la Dehesa Extremeña, cuyos extractos fenólicos posean las mejores características funcionales, como antioxidante antihipertensivas y antimicrobianas, frente a 6 bacterias patógenas y 4 levaduras alterantes. Estos extractos serán obtenidos mediante dos métodos, agitación y ultrasonido, que serán estudiados para comprobar cuál es el método más eficaz y el que conserva las características funcionales de los mismos.

2. Evaluar los compuestos presentes en las plantas autóctonas de la Dehesa, encina, olmo, zarzamora y jara blanca, identificando los compuestos presentes en cada extracto y posteriormente ensayar su actividad antifúngica frente a dos cepas de micotoxigénicas de *Aspergillus flavus*, así como su influencia en la producción de aflatoxinas AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>2</sub> y la expresión de genes relacionados con estas micotoxinas.

3. Elaborar aceites esenciales obtenidos de 6 plantas aromáticas autóctonas de la Dehesa Extremeña, y estudiar el efecto antimicrobiano frente a las 6 bacterias patógenas, las 4 levaduras alterantes y los 2 mohos productores de aflatoxinas, tanto en su crecimiento como en la producción de micotoxinas para el caso de los mohos.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---





Para el desarrollo del trabajo del Capítulo 1, 2 y 3 se utilizaron 15 especies vegetales de la Dehesa Extremeña (Figura 27) y microorganismos de alimentos: bacterias patógenas, levaduras alterantes y mohos micotoxigénicos (Figura 28).

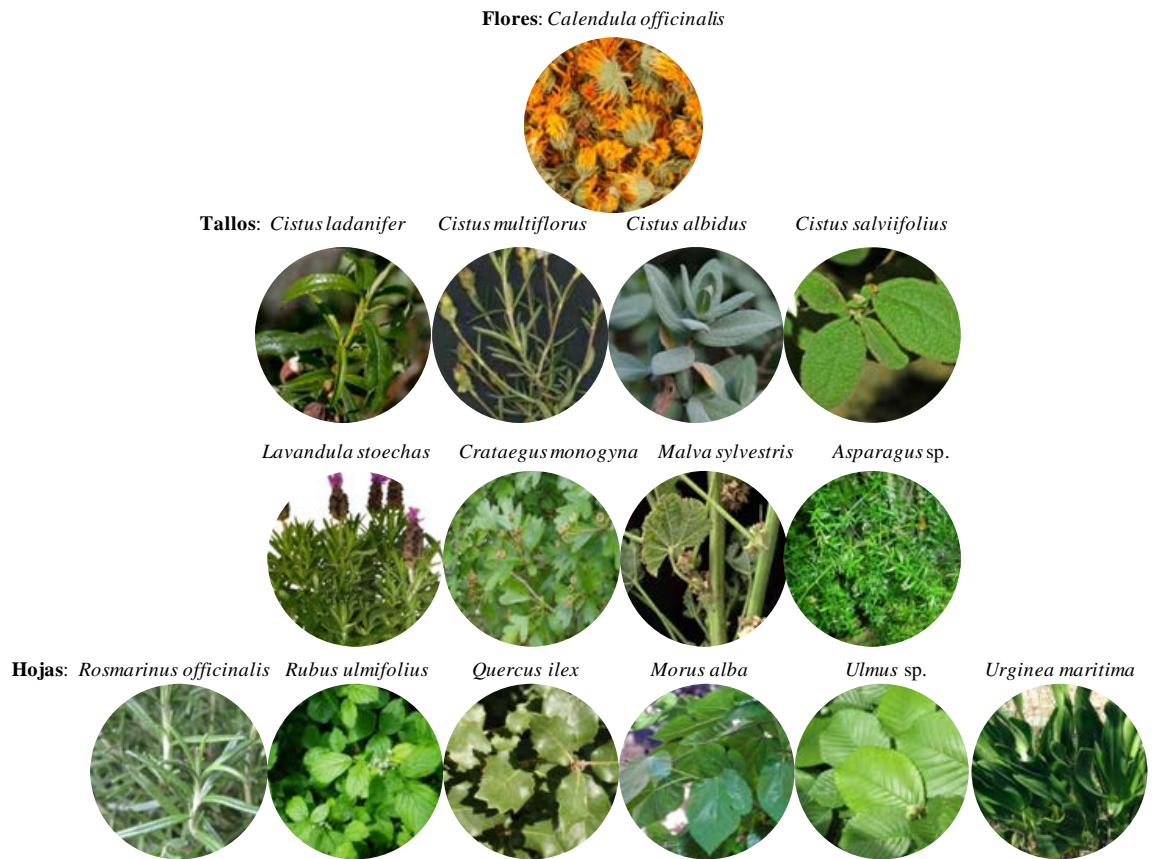


Figura 27. Quince especies de plantas aromáticas recolectadas en la Dehesa de Extremadura.

*Staphylococcus aureus* CECT 976

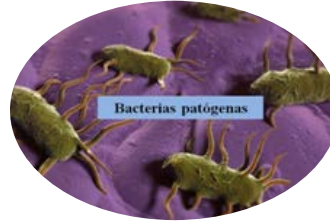
*Bacillus cereus* CECT 131

*Listeria monocytogenes* CECT911

*Listeria innocua* CECT 910

*Salmonella choleraesuis* CECT 4395

*Escherichia coli* CECT4267



*Candida boidinii* CECT 11,153

*Priceomyces carsonii* CECT 10,230

*Kregervanrija fluxuum* CECT 12.787

*Zygosacharomyces bailii* CECT 11.043



*Aspergillus flavus* Cq103

*Aspergillus flavu* Cq8

Productores de aflatoxina B1 y B2

(colección del grupo CAMIALI de la Universidad de Extremadura)

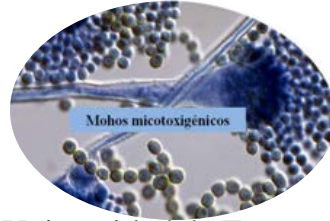


Figura 28. Especies de microorganismos utilizados durante el estudio.

## CAPÍTULO 1

Para el desarrollo del **Capítulo 1** (Figura 29), se llevó a cabo un estudio de selección de plantas aromáticas de la Dehesa cuyos extractos, obtenidos por diferentes métodos de extracción, tenían las mejores características funcionales. Por lo tanto, se evaluaron los extractos fenólicos obtenidos mediante agitación o ultrasonido, analizando la influencia del método en las actividades antioxidantes, antihipertensivas y antimicrobianas de los extractos obtenidos. Los extractos funcionales seleccionados podrían ser estudiados para su uso en alimentación con el objetivo de obtener productos sanos y seguros, favoreciendo la sostenibilidad del medio ambiente y seguros, favoreciendo la sostenibilidad del entorno de la Dehesa Extremeña (Publicación 1) (Figura 29).

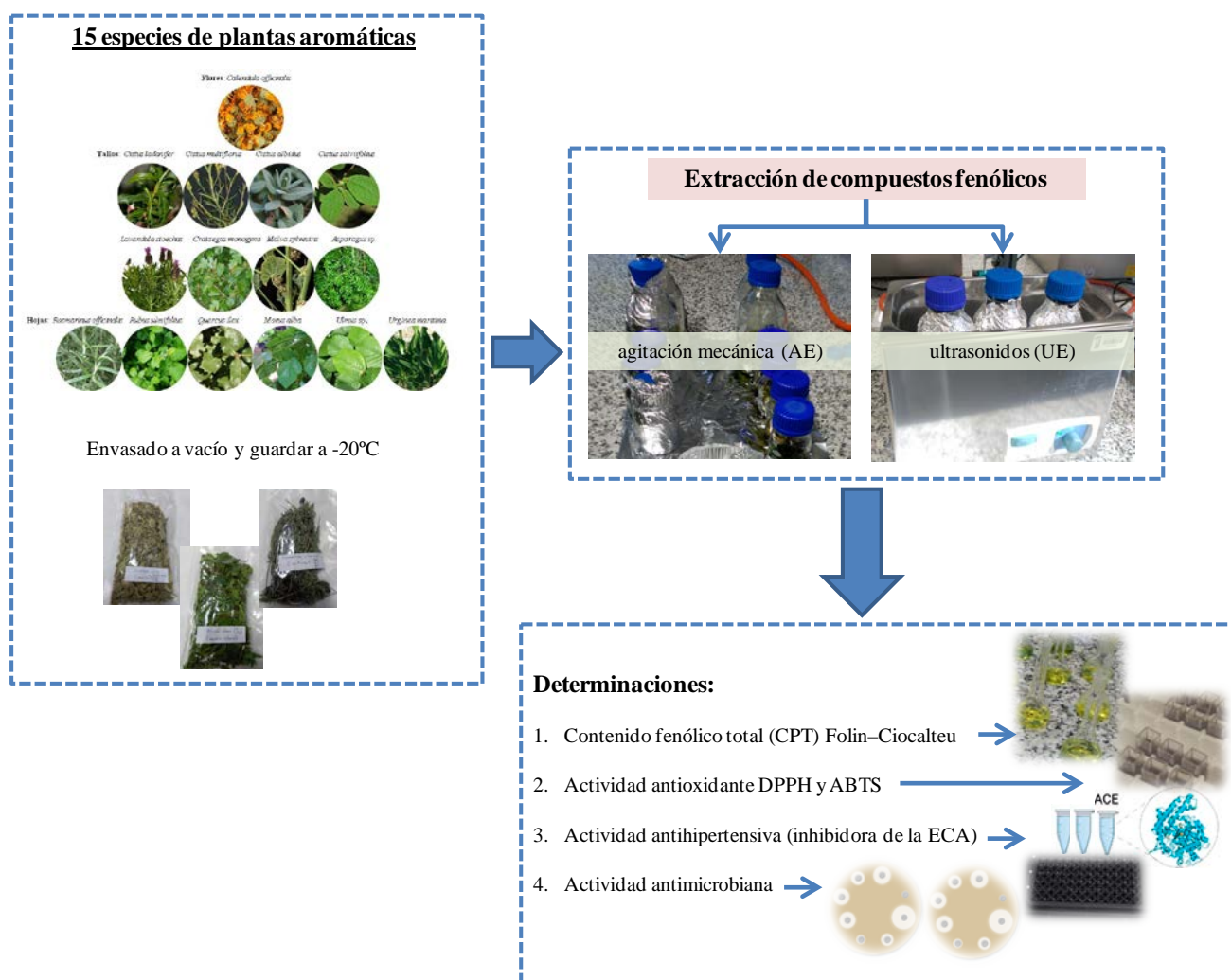


Figura 29. Diseño experimental del capítulo 1, publicación 1.

Análisis estadístico del Capítulo 1:

Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

El análisis estadístico de los datos, y las diferencias dentro de los grupos y entre ellos, se realizó con un análisis de varianza (ANOVA) y se utilizó el post test de Tukey para la separación según las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Además, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) de la matriz de correlaciones de las variables y se realizó mediante SPSS para Windows, 203 versión 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.).

## CAPÍTULO 2

Para el desarrollo del **Capítulo 2** (Figura 30), se evaluaron los compuestos presentes en las plantas autóctonas de la Dehesa, encina, olmo, zarzamora y jara blanca. Se utilizaron estas plantas al ser algunas de las que mejores resultados obtuvieron frente a eucariotas en el ensayo anterior. Se identificaron los compuestos presentes en cada extracto y posteriormente se ensayó su actividad antifúngica frente a dos cepas de micotoxigénicas de *Aspergillus flavus*, y se observó su influencia en la producción de aflatoxinas AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>2</sub>. También se realizó el estudio de la expresión de genes relacionados con estas micotoxinas (Publicación 2) (Figura 30).

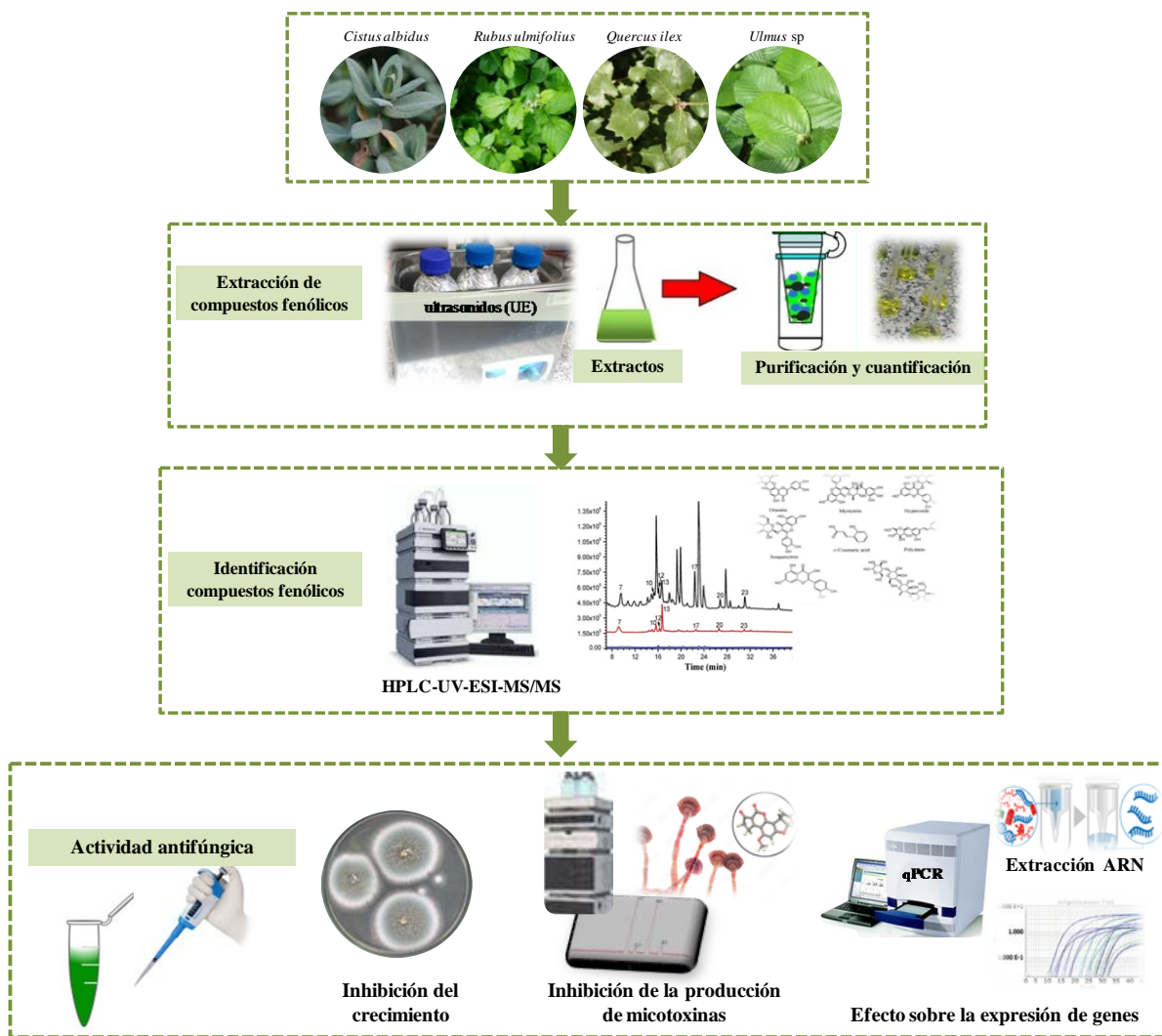


Figura 30. Diseño experimental del capítulo 2, publicación 2.

Análisis estadístico del Capítulo 2:

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS para Windows, versión 21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EE.UU.). Se determinaron las estadísticas descriptivas de los datos, y las diferencias dentro de los grupos y entre ellos se estudiaron mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) y se separaron mediante test Tukey por diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) de la matriz de correlaciones de las variables.

### CAPÍTULO 3

Para el desarrollo del **Capítulo 3** (Figura 31), se llevó a cabo un estudio con aceites esenciales obtenidos de plantas aromáticas autóctonas de la Dehesa Extremeña. Se evaluó el efecto de 6 aceites esenciales obtenidos de diferentes plantas aromáticas (*Calendula officinalis*, *Cistus ladanifer*, *Cistus multiflorus*, *Cistus salviifolius*, *Lavandula stoechas* y *Rosmarinus officinalis*) frente a las 6 bacterias patógenas, las 4 levaduras alterantes y los 2 mohos productores de aflatoxinas que se utilizaron en esta Tesis (Publicación 3) (Figura 31).

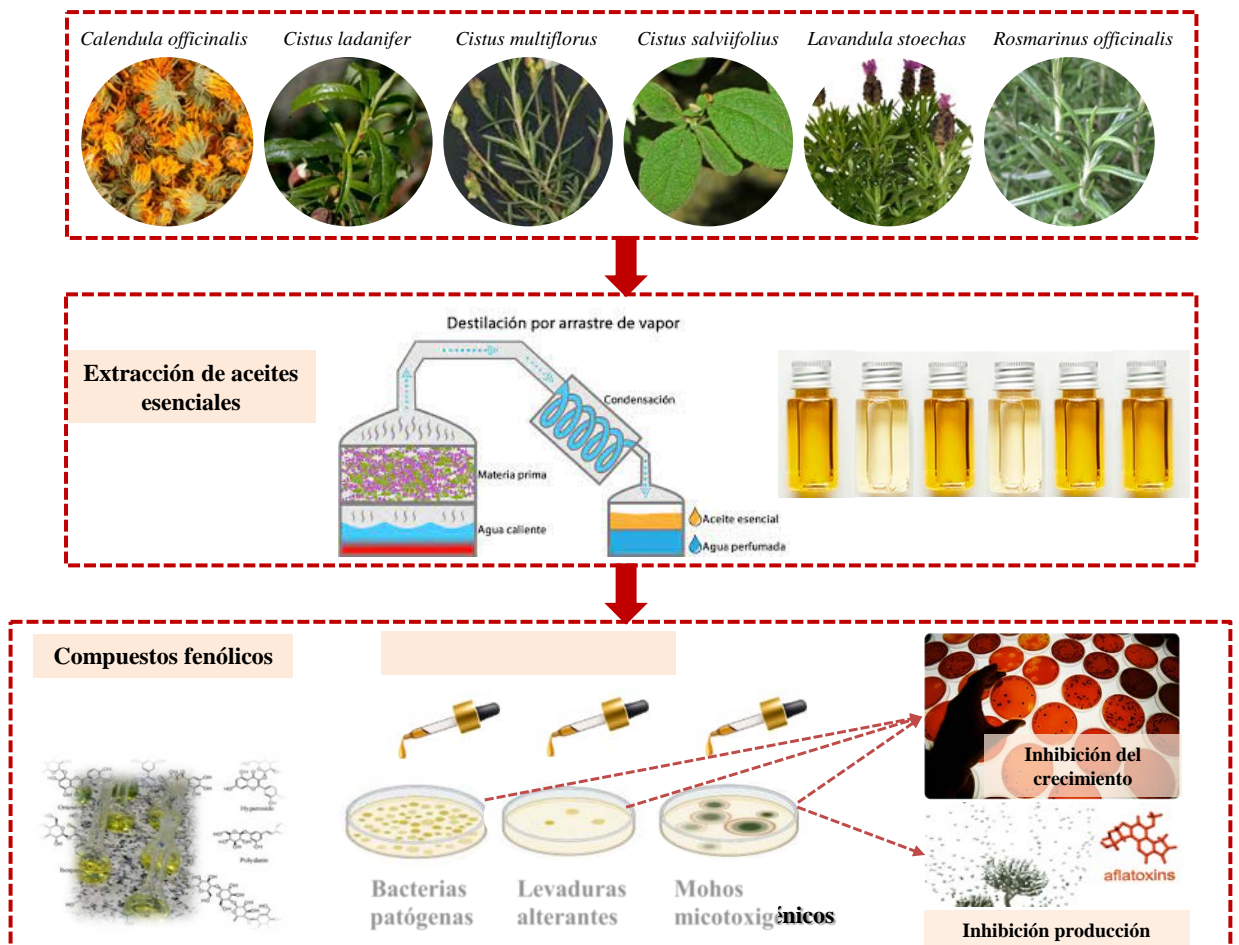


Figura 31. Diseño experimental del capítulo 3, publicación 3.

Análisis estadístico del Capítulo 3:

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS para Windows, versión 21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EE.UU.). Se determinaron las estadísticas descriptivas de los datos, y las diferencias dentro de los grupos y entre ellos se estudiaron mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) y se separaron mediante test Tukey por diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).



## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---



## **CAPÍTULO 1**

---





International Journal of  
*Environmental Research  
and Public Health*



an Open Access Journal by MDPI

# Antioxidant, Antihypertensive and Antimicrobial Properties of Phenolic Compounds Obtained from Native Plants by Different Extraction Methods

Francisco Ramiro Boy; Rocío Casquete; Ana Martínez; María de Guía Córdoba; Santiago Ruíz-Moyano; María José Benito

*Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, Volume 18, Issue 5, 2475





Article

# Antioxidant, Antihypertensive and Antimicrobial Properties of Phenolic Compounds Obtained from Native Plants by Different Extraction Methods

Francisco Ramiro Boy, Rocío Casquete \* , Ana Martínez, María de Guía Córdoba , Santiago Ruíz-Moyano and María José Benito

Nutrición y Bromatología, Instituto Universitario de Investigación en Recursos Agrarios (INURA), Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de Extremadura, 06007 Badajoz, Spain; ramboy1@hotmail.com (F.R.B.); amartinehi@alumnos.unex.es (A.M.); mdeguia@unex.es (M.d.G.C.); srms@unex.es (S.R.-M.); mjbenito@unex.es (M.J.B.)

\* Correspondence: rociocp@unex.es

**Abstract:** This study aims to evaluate the efficacy of two methods (agitation and ultra-sound) for extracting phenolic compounds from 15 native plants. Plant species collected in the Dehesa of Extremadura were used. The antioxidant, antihypertensive and antimicrobial activity of the phenolic extracts was investigated. Significantly different results were obtained when comparing the two extraction methods, with the highest concentrations of phenolic compounds found for ultrasound extraction. In addition, the extracts obtained for *Cistus albidus*, *Cistus salviifolius*, *Rubus ulmifolius* and *Quercus ilex* showed the highest concentrations of phenolic compounds. The antioxidant activity was higher in the extracts of *Cistus* and *Q. ilex* obtained by ultrasound, as was the antihypertensive activity. Antimicrobial activity was also higher in the extracts obtained by ultrasound from *C. salviifolius* and *Q. ilex* plants against bacteria and from *Cistus ladanifer* against yeasts. Therefore, it can be concluded that, with the ultrasound extraction of phenolic compounds from *C. ladanifer*, *C. albidus* and *Q. ilex* plants, it is possible to obtain extracts with important functional properties, so they could be studied for their use in food with the aim of obtaining healthy and safe products, favouring the sustainability of the environment of the Dehesa Extremeña.

**Keywords:** phenolic compounds; dehesa plants; functional properties; antimicrobial activity



**Citation:** Boy, F.R.; Casquete, R.; Martínez, A.; Córdoba, M.d.G.; Ruíz-Moyano, S.; Benito, M.J. Antioxidant, Antihypertensive and Antimicrobial Properties of Phenolic Compounds Obtained from Native Plants by Different Extraction Methods. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 2475. <https://doi.org/10.3390/ijerph18052475>

Academic Editor: Paul B. Tchounwou

Received: 5 February 2021

Accepted: 25 February 2021

Published: 3 March 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Nowadays, the importance of aromatic and medicinal plants is recognized worldwide, not only for their curative and preventive properties, but also for their uses in the pharmaceutical and food industries [1]. The Dehesa of Extremadura is characterized as an ecosystem with great biodiversity where many species of plants considered to be medicinal can be found, and are important in the pharmaceutical industry [2,3]. Among these medicinal plants are *Lavandula stoechas*, *Malva sylvestris*, *Rosmarinus officinalis* [4], *Cistus ladanifer*, *C. multiflorus*, *C. albidus* and *C. salviifolius* [5]. In addition to their medicinal properties, some of these plants, such as *L. stoechas* and *M. sylvestris*, are aromatic, which makes them excellent condiments for meals. However, their aroma is not the only benefit in food; their antioxidant and antimicrobial nature is also important. They can compete with chemical antioxidants that have been associated with possible health consequences (allergic reactions, disorders in pregnant women and children, possible carcinogenic action, etc.) [6,7].

The functional properties of these plants, such as their antioxidant or antimicrobial properties, are due to the phenolic compounds present in their fruits, seeds, leaves, stems and flowers [8]. Phenolic compounds constitute a wide group of compounds that result from the secondary metabolism of plants found in different natural sources. The molecular

structure of phenolic compounds has an aromatic ring containing one or more hydroxyl groups and can be a single or polymerized molecule. Depending on their structural characteristics, phenolic compounds are divided into several groups, although the main ones are phenolic acids, flavonoids, and non-flavonoids [9].

It is considered that the antioxidant properties of these compounds are due to their redox properties and chemical structure, responsible for neutralizing free radicals, chelating metals, and decomposing peroxides [10–12]. This beneficial property retards the development of diseases related to oxidative stress such as cancer, diabetes, and Alzheimer's disease [13,14], as well as anti-inflammatory activity [15]. In addition, a protective role against oxidation of unsaturated lipids in food has been observed, mainly in meat and meat products [16,17].

In addition, recent studies have documented the antibacterial effects of phenol-rich extracts commonly found in plants. These studies have highlighted the use of phenolic compounds to control pathogenic bacteria, including those with a commercial antibiotic resistance profile [18,19]. The antibacterial effects of phenolic compounds have also been primarily associated with the presence of hydroxyl groups in their molecules. In fact, the number and position of these hydroxyl groups, i.e., the pattern of hydroxylation, in the phenolic ring, seems to be associated with the importance of the inhibitory effects exerted by the phenolic compounds on the target bacteria [20,21]. A bactericidal effect has been proven against foodborne bacteria such as *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* [18,22,23].

Extracts obtained from plants have also been reported for their antihypertensive activity [24], although there are not many recent studies on this activity in aromatic plants. Hypertension is one of the most important factors contributing to cardiovascular diseases; therefore, it is very important to find natural compounds with this activity. Vargas-León et al. [25] attributed the antihypertensive activity of *Hibiscus sabdariffa* to the high number of phenolic compounds it possesses, with flavonoids and anthocyanins being the main components.

To study the biological activity of extracts, the extraction methods used are crucial since they determine the purity grade at which the phenolic compounds are extracted, and at the same time, affect all their beneficial properties previously mentioned. Thus, there are several extraction methods, including agitation and ultrasound, which are simple and cost-effective methods. In both methods, it is necessary to use a suitable solvent to extract these compounds, among which are ethanol (70–80%), water and methanol, the last-mentioned being used in different concentrations as well as ethanol [26].

This research is an exploratory work for plant selection with the best characteristics. Therefore, this study aims to evaluate which of the two methods (agitation or ultrasound) is more effective in the extraction of phenolic compounds of different scarcely studied native plants obtained from the Extremadura Dehesa, and their influence on the functional antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of the extracts obtained. The selected functional extracts could be studied for their use in food with the aim of obtaining healthy and safe products, favouring the sustainability of the Dehesa Extremeña environment.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Plant Material

For the development of the work, the leaves, stems, and flowers of 15 plant species (flowers from *Calendula officinalis*, stems from *Cistus ladanifer*, *Cistus multiflorus*, *Cistus albidus*, *Cistus salvifolius*, *Lavandula stoechas*, *Crataegus monogyna*, *Malva sylvestris* and *Asparagus* sp., and leaves from *Rosmarinus officinalis*, *Rubus ulmifolius*, *Quercus ilex*, *Morus alba*, *Ulmus* sp. and *Urginea maritima*) were used. The plants were harvested from the Extremadura region of Spain by a company located there. The samples were vacuum-packed in plastic bags and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until they were used to extract the bioactive compounds.



## 2.2. Bacterial Strains

Foodborne pathogenic bacteria and spoilage yeasts in food obtained from the Spanish type culture collection (CECT) were used to run the study. The pathogenic microorganisms were *Staphylococcus aureus* CECT 976, *Bacillus cereus* CECT 131, *Listeria monocytogenes* CECT 911, *Listeria innocua* CECT 910, *Salmonella choleraesuis* CECT 4395, *Escherichia coli* CECT 4267, *Candida boidinii* CECT 11,153, *Priceomyces carsonii* CECT 10,230, *Kregervanrija fluxuum* CECT 12,787 and *Zygosacharomyces bailii* CECT 11,043.

## 2.3. Phenolic Compound Extraction

The phenolic compounds were extracted from the plants by mechanical agitation (AE) and ultrasound-assisted extraction (UE).

### 2.3.1. Mechanical Agitation Extraction

Each sample (10 g) was extracted with 60 mL of 90% (*v/v*) ethanol–water extraction solution using an orbital shaker (Thermoshake THO 500, Gerhardt Analytical Systems, Königswinter, Germany) set at 120 rpm and 25 °C for 2 h in darkness. After the 2 h of extraction, the samples were filtered. This process was repeated twice. The extracts were then kept in the dark for 24 h at 4 °C. After that, excess ethanol was removed by heating at 37 °C in a rotary evaporator under vacuum (Heildolph mod. Hei-VAP Precisión, Heidolph, Germany). The resultant aqueous extracts were combined to a final known volume and stored at −20 °C until analysis.

### 2.3.2. Ultrasound-Assisted Extraction

Each sample (10 g) was mixed with 60 mL of ethanol (90% *v/v*) and placed inside an ultrasonic bath (360 W, J.P. Selecta, s. a. Barcelona, Spain). The samples were sonicated by ultrasound at a frequency of 50/60 Hz and power of 220 V for 2 h in the absence of light at room temperature. After the 2 h of extraction, the samples were filtered. This process was repeated twice. The extracts were then kept in the dark for 24 h at 4 °C. After that, excess ethanol was removed by heating at 37 °C in a rotary evaporator under vacuum (Heildolph mod. Hei-VAP Precisión). The resultant aqueous extracts were combined to a final known volume and stored at −20 °C until analysis.

## 2.4. Total Phenolic Content (TPC)

The TPC of the above stored extracts was determined using Folin–Ciocalteu reagent and the method described by Wettasinghe and Shahidi [27] in a UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, USA). Gallic acid was used as standard. Results are expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE)/100 g of fresh plants. All experiments were conducted in triplicate.

## 2.5. Antioxidant Activity by Free Radical Scavenging Ability Using a Stable DPPH Radical and ABTS Radical Cation

The antioxidant activity of the above stored extracts was determined by bleaching of the purple-coloured solution of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) according to the method of Teixeira et al. [28]. The total antioxidant activity was expressed as mg of Trolox/100 g of fresh plants. All experiments were conducted in triplicate.

The free radical scavenging capacity of extracts was also determined using the ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) radical cation decolorization assay, according to the procedure proposed by Cano et al. [29], slightly modified ( $n = 3$ ). The initial absorbance value at  $\lambda$  730 nm was then compared to the absorbance obtained after 20 min of reaction. The results were expressed as mg of Trolox/100 g of fresh plants.

## 2.6. Assessment of ACE Inhibitory Activity

The extracts were diluted in 40% methanol (*v/v* water) at a concentration of 400–100  $\mu$ g/mL, then 1:2, 1:4 and 1:8 dilutions with Milli-Q water were done. Angiotensin-

converting enzyme (ACE) inhibition activity was determined according to the method developed by Sentandreu and Toldrá [30,31] with some modifications. ACE, previously dissolved in 50% glycerol, was diluted in 0.15 M Tris buffer (pH 8.3) containing 0.1 mM  $ZnCl_2$  with 0.04 U/mL of enzyme in the final reaction solution. Into 96-well microplates (black polystyrene, Corning, Leatherhead, UK), 40  $\mu$ L of distilled water or the ACE working solution was added. Then, the reaction mixture was adjusted to 80  $\mu$ L by adding distilled water to the blank (B), control (C) or sample (S). A sample blank (SB) was prepared by substituting distilled water for the sample to take into consideration the interference of the compounds. The reaction was begun by adding 160  $\mu$ L of 0.45 mM *o*-Abz-Gly-p-Phe ( $NO_2$ )-Pro-OH (Bachem Feinchemikalien, Bubendorf, Switzerland) dissolved in 150 mM Tris-base buffer (pH 8.3), with 1.125 M NaCl, and was incubated at 37 °C. The fluorescence was registered at 30 min using a multiscan microplate fluorimeter (FLUOstar optima, BMG Labtech, Offenburg, Germany). The emission and excitation wavelengths were 420 and 350 nm, respectively, and data were processed using FLUOstar control (version 1.32 R2, BMG Labtech). The activity of each sample was tested in triplicate. Inhibitory activity is defined as the compound concentration required to inhibit the original ACE activity. The formula applied to determine the percentage of ACE inhibitory activity was:  $100 \times [(C - B) - (S - SB)] / (C - B)$ .

Then, the concentration of 50% inhibition ( $IC_{50}$ ) was obtained by linear interpolation from the graphical representation of the fractional activity vs. the phenolic extract concentration.  $IC_{50}$  is the phenolic concentration ( $\mu$ g/mL) required to decrease ACE activity by 50% under the assayed conditions, graphically obtained where  $V_i$  inhibitor/ $V_i$  control = 0.5.

### 2.7. Antimicrobial Activity

Target cell suspensions (Section 2.2) were prepared from cultures incubated overnight at 37 and 25 °C on brain–heart infusion agar (BHI; Oxoid, Madrid, Spain) and yeast peptone and dextrose extract agar (YPD; Oxoid, Madrid, Spain) for the bacteria and yeast, respectively. After the incubation time, colonies were transferred to a sterile Peptone Water solution (Scharlab, Barcelona, Spain) to obtain a turbidity equivalent to 0.5 McFarland standards. Next, 1 mL of each suspension was pipetted into separate sterile petri dishes to which 20 mL of molten BHI and YPD with 1% agar (45 °C) for the bacteria and yeast, respectively, were added. Once set, 10  $\mu$ L of aqueous extracts at different concentrations (2, 1 and 0.5 mg/mL) was added. Sterile distilled water, instead of active compounds, was used as the negative control. The plates were incubated overnight at 37 and 25 °C for the bacteria and yeast, respectively, and the diameter (mm) of the resulting inhibition zone was measured. All experiments were conducted in triplicate.

### 2.8. Statistical Analysis

Statistical analysis of the data was carried out using SPSS for Windows, version 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Descriptive statistics of the data were determined, and the differences within and between groups were studied by one-way and three-way analysis of variance (ANOVA) and separated by Tukey's honest significant differences test ( $p < 0.05$ ). In addition, principal component analysis (PCA) on the correlation matrix of the variables was performed using SPSS for Windows, 203 version 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## 3. Results and Discussion

The total phenolic compounds obtained by the two extraction methods used, agitation and ultrasound, from the different plants used in the study are presented in Table 1.

**Table 1.** Total phenolic compounds of plants expressed in mg of gallic acid equivalents (GAE)/100 g fresh plant.

Plant	Agitation	Ultrasound	<i>p</i> <sup>2</sup>
	Mean SD <sup>1</sup>	Mean SD	
<i>Calendula officinalis</i>	276.73 ± 13.41 <sup>cde</sup>	95.46 ± 2.24 <sup>hi</sup>	<0.001
<i>Rosmarinus officinalis</i>	160.72 ± 14.93 <sup>de</sup>	314.01 ± 14.65 <sup>fghi</sup>	0.001
<i>Cistus ladanifer</i>	802.89 ± 45.52 <sup>ab</sup>	655.05 ± 62.55 <sup>cdef</sup>	0.03
<i>Cistus multiflorus</i>	408.66 ± 52.27 <sup>cde</sup>	514.26 ± 39.86 <sup>fgh</sup>	0.08
<i>Cistus albidus</i>	580.25 ± 93.34 <sup>bc</sup>	1260.47 ± 472.40 <sup>a</sup>	0.152
<i>Cistus salviifolius</i>	554.8 ± 59.73 <sup>bc</sup>	1029.99 ± 140.38 <sup>ab</sup>	0.048
<i>Lavandula stoechas</i>	1029.25 ± 23.15 <sup>a</sup>	554.07 ± 13.66 <sup>efg</sup>	<0.001
<i>Crataegus monogyna</i>	387.96 ± 29.43 <sup>cd</sup>	855.23 ± 18.67 <sup>bcde</sup>	<0.001
<i>Malva sylvestris</i>	67.00 ± 9.33 <sup>de</sup>	156.32 ± 6.69 <sup>hi</sup>	0.001
<i>Rubus ulmifolius</i>	305.24 ± 8.79 <sup>cde</sup>	953.61 ± 76.27 <sup>abc</sup>	<0.001
<i>Quercus ilex</i>	387.54 ± 36.58 <sup>cd</sup>	927.84 ± 112.79 <sup>abcd</sup>	0.001
<i>Morus alba</i>	26.95 ± 3.92 <sup>de</sup>	286.38 ± 10.07 <sup>ghi</sup>	<0.001
<i>Ulmus</i> sp.	131.71 ± 22.41 <sup>de</sup>	263.36 ± 3.17 <sup>ghi</sup>	0.001
<i>Asparagus</i> sp.	92.08 ± 4.19 <sup>de</sup>	302.57 ± 18.61 <sup>fghi</sup>	<0.001
<i>Urginea maritima</i>	7.95 ± 5.21 <sup>e</sup>	57.94 ± 3.71 <sup>i</sup>	<0.001

<sup>1</sup> SD: standard deviation. <sup>2</sup> *p* values of the variable extraction methods. <sup>a-i</sup> Values with different superscript letters are significantly different (*p* < 0.05) between plants.

In general, when the two extraction methods were compared, it was found that there were significant differences, the highest values being found for the ultrasound extraction. The concentrations of phenolic compounds obtained by ultrasound ranged from 57.94 to 1260.47 mg GAE/100 g, and those obtained by agitation ranged from 26.95 to 1029.25 mg GAE/100 g. This agrees with the results reported by Bimakr et al. [32] in which ultrasound extraction allowed for the acquisition of 152.25 mg GAE/g from *Malva sylvestris*, while only 128.88 mg GAE/g was obtained by agitation. In a different research, the ultrasound extraction efficiency was also higher, showing a maximum value of 16.41 mg GAE/g of blueberry pomace, while the conventional agitation method showed a maximum value of 5.08 mg GAE/g [33]. Due to the above, it can be said that extraction by ultrasound proved to be more effective.

Furthermore, comparing the plants it can be observed that *Cistus albidus*, *C. salviifolius*, *Rubus ulmifolius* and *Q. ilex* were the ones with the highest phenolic compound concentrations obtained, the levels being between 927.84 mg and 1260.47 mg GAE/100 g (*p* < 0.05). *Cistus* is an aromatic plant highly valued for its functional properties, among which the phenolic compound content is remarkable. In the study performed by Abu-Orabi et al. [34], the concentrations of phenolic compounds in the flowers of *C. salviifolius* ranged from 111 to 183.8 mg GAE/g, and in the leaves from 126 to 393 mg GAE/g. In our study, one of the plants that presented more phenolic compounds was *Q. ilex*, corroborating with many studies that have demonstrated a high content of these bioactive compounds, as presented by Amessis-Ouchemoukh et al. [35]. Hadidi et al. [36] also obtained between 2103.346 and 4580.316 mg GAE/100 g from the leaves of this tree.

The antioxidant activity analysed by the two methods, DPPH and ABTS, and the antihypertensive activity determined by the ACE inhibitory activity of the extracts obtained from the plants are presented in Table 2.

**Table 2.** Antioxidant activity (DPPH and ABTS) expressed in mg Trolox/100 g fresh plant and IC50 values ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of ACE inhibitory activity of extracts for the different extraction methods (mechanical agitation (AE) and ultrasound-assisted extraction (UE) performed).

Plant	DPPH		$p^1$	ABTS		$p$	IC50		$p$
	AE	UE		AE	UE		AE	UE	
<i>Calendula officinalis</i>	60.51 <sup>c</sup>	183.69 <sup>c</sup>	<0.001	67.05 <sup>f</sup>	335.94 <sup>e</sup>	<0.001	180.19 <sup>bcd</sup>	153.85 <sup>ab</sup>	0.418
<i>Rosmarinus officinalis</i>	100.98 <sup>c</sup>	95.75 <sup>c</sup>	0.57	256.66 <sup>e</sup>	273.40 <sup>ef</sup>	<0.001	139.91 <sup>de</sup>	115.86 <sup>ab</sup>	0.234
<i>Cistus ladanifer</i>	2397.47 <sup>a</sup>	2363.34 <sup>a</sup>	0.015	467.93 <sup>d</sup>	753.75 <sup>bc</sup>	<0.001	11.27 <sup>f</sup>	5.85 <sup>d</sup>	0.056
<i>Cistus multiflorus</i>	793.67 <sup>bc</sup>	953.12 <sup>bc</sup>	0.007	374.72 <sup>de</sup>	504.78 <sup>d</sup>	<0.001	187.13 <sup>bcd</sup>	65.46 <sup>cd</sup>	0.008
<i>Cistus albidus</i>	276.51 <sup>c</sup>	262.64 <sup>c</sup>	0.061	434.68 <sup>d</sup>	825.51 <sup>b</sup>	<0.001	30.37 <sup>f</sup>	21.69 <sup>d</sup>	0.322
<i>Cistus salviifolius</i>	40.27 <sup>c</sup>	100.80 <sup>c</sup>	<0.001	804.74 <sup>b</sup>	832.72 <sup>b</sup>	0.305	62.13 <sup>ef</sup>	16.53 <sup>cd</sup>	0.107
<i>Lavandula stoechas</i>	18.93 <sup>c</sup>	91.23 <sup>c</sup>	<0.001	45.74 <sup>f</sup>	256.32 <sup>f</sup>	<0.001	172.47 <sup>bcd</sup>	189.79 <sup>a</sup>	0.362
<i>Crataegus monogyna</i>	106.25 <sup>c</sup>	216.46 <sup>c</sup>	0.001	532.99 <sup>cd</sup>	718.05 <sup>bc</sup>	0.012	174.61 <sup>bcd</sup>	151.77 <sup>ab</sup>	0.267
<i>Malva sylvestris</i>	37.65 <sup>c</sup>	147.53 <sup>c</sup>	0.001	77.40 <sup>f</sup>	262.93 <sup>f</sup>	<0.001	202.73 <sup>bc</sup>	112.92 <sup>ab</sup>	0.039
<i>Rubus ulmifolius</i>	93.28 <sup>c</sup>	131.50 <sup>c</sup>	<0.001	644.23 <sup>c</sup>	842.33 <sup>b</sup>	0.001	315.58 <sup>a</sup>	65.40 <sup>cd</sup>	0.036
<i>Quercus ilex</i>	1531.95 <sup>b</sup>	1611.59 <sup>b</sup>	0.599	2531.41 <sup>a</sup>	2306.17 <sup>a</sup>	0.117	198.58 <sup>bc</sup>	80.38 <sup>bc</sup>	0.001
<i>Morus alba</i>	29.45 <sup>c</sup>	255.42 <sup>c</sup>	<0.001	60.92 <sup>f</sup>	303.40 <sup>ef</sup>	<0.001	232.66 <sup>b</sup>	137.89 <sup>ab</sup>	0.042
<i>Ulmus sp.</i>	70.76 <sup>c</sup>	366.43 <sup>c</sup>	<0.001	261.76 <sup>e</sup>	397.37 <sup>e</sup>	<0.001	142.77 <sup>de</sup>	72.63 <sup>bc</sup>	0.055
<i>Asparagus sp.</i>	40.32 <sup>c</sup>	244.87 <sup>c</sup>	0.013	99.46 <sup>f</sup>	260.48 <sup>f</sup>	0.002	110.86 <sup>de</sup>	99.37 <sup>bc</sup>	0.412
<i>Urginea maritima</i>	17.05 <sup>c</sup>	132.08 <sup>c</sup>	0.05	41.96 <sup>f</sup>	154.62 <sup>f</sup>	0.002	198.37 <sup>bc</sup>	152.02 <sup>ab</sup>	0.032

Values are given as mean ( $n = 3$ ). <sup>1</sup>  $p$  values of the variable extraction methods. <sup>a-f</sup> Values with different superscript letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) between plants.

In general, it can be observed that the ABTS values were higher than those provided by the DPPH method (Table 2), which may be related to the way in which the ABTS and DPPH radicals work. However, comparing the compound extraction methods, it was found that the values obtained by ultrasound were higher than those found for agitation ( $p < 0.05$ ): between 91.23 and 2363.34 mg Trolox/100 g for DPPH and 154.62 and 2306.17 mg Trolox/100 g for ABTS. In addition, when analysing the activity according to the plants, *Cistus* and *Q. ilex* were the ones with the highest values, meaning that those plants showed the highest antioxidant activity. Furthermore, it can be observed that the extracts with the highest antioxidant activity were not those with the highest total phenolic compound concentrations, which may be due to the different compound compositions [37,38]. The genus *Cistus* is one of the plants with greater beneficial properties, among which its antioxidant activity, related to its phenolic compound content extracted mainly with ethanol is highlighted [39]. Among the species highlighted for their antioxidant character is *Q. ilex*, which is reported in this study and supported by other studies such as that by Arina and Harisun [40], who obtained 90% radical inhibition.

Hypotensive activity, expressed as IC50, measures the amount of any substance needed to inhibit 50% of ACE. Table 2 shows that the phenolic compounds extracted from *Cistus multiflorus*, *Malva sylvestris*, *R. ulmifolius*, *Q. ilex*, *Morus alba* and *Urginea marina* using ultrasound had a lower IC50 ( $p < 0.05$ ) than those extracted by agitation. This means that, with a smaller amount of these compounds, the ACE activity is reduced to half and ultrasound is more effective as an extraction method. However, within the plants, it can be observed that species of the genus *Cistus*, among them *C. albidus*, *C. ladanifer* and *C. salviifolius*, were the ones with a lower IC50, with values between 5.85  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (*C. ladanifer*) and 21.69  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (*C. albidus*). Additionally, *R. ulmifolius*, with an IC50 of 65.40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , was also found within these plants with lower IC values. This activity is directly related to the phenolic compound content, so that the higher the amount of these bioactive compounds, the higher the ACE inhibitory activity. This fact has been confirmed in this study and in others such as the one presented by Chaudhary et al. [41] on several medicinal plants.

Table 3 shows statistical analysis of the variables studied (plants, extraction method and concentration) and the antimicrobial effect on the six pathogenic bacteria analysed, as well as their interactions ( $p < 0.05$ ).

**Table 3.** Diameter of inhibition zones in mm of different concentrations of plant extracts tested that showed activity against bacteria.

	<i>L. Monocytogenes</i>	<i>L. Innocua</i>	<i>S. Aureus</i>	<i>B. Cereus</i>	<i>E. Coli</i>	<i>S. Choleraesuis</i>
Plant	Mean SD	Mean SD	Mean SD	Mean SD	Mean SD	Mean SD
<i>Cistus multiflorus</i>	-	-	-	-	-	5.26 ± 4.68 <sup>c</sup>
<i>Cistus albidus</i>	1.62 ± 2.40 <sup>d</sup>	2.89 ± 4.28 <sup>d</sup>	3.19 ± 4.72 <sup>d</sup>	2.62 ± 3.87 <sup>c</sup>	2.35 ± 3.47 <sup>g</sup>	5.28 ± 2.80 <sup>c</sup>
<i>Cistus ladanifer</i>	1.85 ± 2.76 <sup>c</sup>	3.23 ± 4.78 <sup>c</sup>	3.22 ± 3.57 <sup>d</sup>	3.00 ± 4.46 <sup>b</sup>	2.86 ± 4.24 <sup>e</sup>	7.82 ± 2.97 <sup>a</sup>
<i>Cistus salviifolius</i>	0.83 ± 1.93 <sup>g</sup>	5.29 ± 4.10 <sup>a</sup>	3.28 ± 3.56 <sup>d</sup>	-	4.25 ± 3.28 <sup>b</sup>	4.22 ± 3.79 <sup>d</sup>
<i>Lavandula stoechas</i>	1.38 ± 3.21 <sup>e</sup>	-	1.49 ± 3.48 <sup>f</sup>	-	-	0.87 ± 2.03 <sup>i</sup>
<i>Quercus ilex</i>	3.88 ± 4.69 <sup>a</sup>	3.56 ± 4.04 <sup>b</sup>	5.45 ± 2.97 <sup>a</sup>	3.79 ± 3.34 <sup>a</sup>	5.07 ± 3.86 <sup>a</sup>	6.27 ± 3.55 <sup>b</sup>
<i>Rosmarinus officinalis</i>	1.15 ± 2.69 <sup>f</sup>	-	1.88 ± 2.91 <sup>e</sup>	0.99 ± 2.32 <sup>ef</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>k</sup>	-
<i>Rubus ulmifolius</i>	2.18 ± 3.23 <sup>b</sup>	2.76 ± 3.56 <sup>d</sup>	3.98 ± 3.08 <sup>c</sup>	1.89 ± 2.81 <sup>d</sup>	3.93 ± 2.93 <sup>c</sup>	3.57 ± 2.06 <sup>f</sup>
<i>Crataegus monogyna</i>	-	-	1.85 ± 2.76 <sup>e</sup>	-	3.75 ± 3.98 <sup>d</sup>	-
<i>Asparagus</i> sp.	-	-	-	-	2.00 ± 2.95 <sup>h</sup>	-
<i>Malva sylvestris</i>	-	-	4.3 ± 6.60 <sup>b</sup>	3.88 ± 5.73 <sup>a</sup>	2.56 ± 3.79 <sup>f</sup>	3.37 ± 4.98 <sup>f</sup>
<i>Morus alba</i>	-	-	-	-	-	3.85 ± 5.69 <sup>e</sup>
<i>Urginea maritima</i>	-	-	1.18 ± 2.76 <sup>g</sup>	1.04 ± 2.44 <sup>e</sup>	1.37 ± 3.19 <sup>i</sup>	1.52 ± 3.54 <sup>g</sup>
<i>Ulmus</i> sp.	-	-	1.16 ± 2.71 <sup>g</sup>	0.86 ± 2.00 <sup>f</sup>	1.18 ± 2.76 <sup>j</sup>	1.19 ± 2.78 <sup>g</sup>
<b>Extraction method</b>						
Agitation	0.63 ± 1.99	0.85 ± 2.53	2.30 ± 3.41	1.38 ± 3.00	2.19 ± 3.33	2.66 ± 3.78
Ultrasound	1.21 ± 2.71	1.68 ± 3.35	2.13 ± 3.77	1.20 ± 2.93	1.99 ± 3.27	3.51 ± 4.18
<b>Concentration (mg/mL)</b>						
2	2.10 ± 3.33 <sup>a</sup>	2.44 ± 4.12 <sup>a</sup>	4.95 ± 4.44 <sup>a</sup>	3.39 ± 4.18 <sup>a</sup>	4.34 ± 3.86 <sup>a</sup>	5.76 ± 4.80 <sup>a</sup>
1	0.51 ± 1.85 <sup>b</sup>	0.95 ± 2.38 <sup>b</sup>	1.36 ± 2.41 <sup>b</sup>	0.40 ± 1.48 <sup>b</sup>	1.75 ± 2.82 <sup>b</sup>	2.36 ± 3.07 <sup>b</sup>
0.5	0.15 ± 0.80 <sup>c</sup>	0.41 ± 1.49 <sup>c</sup>	0.34 ± 1.24 <sup>c</sup>	0.08 ± 0.42 <sup>c</sup>	0.19 ± 0.99 <sup>c</sup>	1.14 ± 2.09 <sup>c</sup>
<i>Pplants</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
<i>Pextraction</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
<i>Pconcentration</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
<i>Pplant × extraction</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

-: no inhibition; a-k: values with different superscript letters indicate statistical differences ( $p < 0.05$ ).

Concerning the study of the plants' effect, it can be observed that *C. salviifolius* and *Q. ilex* presented a greater inhibition capacity on the six pathogenic bacteria studied ( $p < 0.05$ ). The rest of the plants belonging to the genus *Cistus* (*C. multiflorus*, *C. albidus* and *C. ladanifer*) presented a greater inhibition capacity against *Salmonella choleraesuis*. *R. ulmifolius* presented a greater inhibition capacity against *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* and *E. coli*.

Regarding the extraction method, greater inhibition capacity was obtained through ultrasound against three of the six bacteria studied: *L. monocytogenes*, *L. innocua* and *S. choleraesuis*.

The concentration of extract also affected this activity, since the higher its concentration, the higher its inhibition capacity, with 2 mg/mL being the concentration with the greatest antimicrobial capacity against the six bacteria studied. Therefore, the genus *Cistus* is highlighted for its antimicrobial capacity. This agrees with the results obtained by Mahmoudi et al. [42] who, after studying the antimicrobial activity of two species of the genus *Cistus*, observed higher activity against *E. coli*. It is commonly known that Gram-positive bacteria are more susceptible to natural extracts and Gram-negative ones are less sensitive to natural extracts. Nevertheless, there are exceptions in which Gram-negative bacteria are more susceptible than Gram-positive ones towards some natural extracts [43], highlighting the susceptibility of *E. coli*.

In addition, *Quercus* extract contains metabolites belonging to various chemical groups; the phenolic compounds (benzoics, cinnamics, coumarins, stilbenes, flavonoids, lignans and tannins) are the most representative. Other groups include carbohydrates, amino acids, fatty acids, carboxylic acids, and other secondary metabolites, terpenoids and alkaloids [44]. Some of these compounds have been previously reported as antimicrobial compounds in *Q. ilex* and another *Quercus* spp. [45]. The antimicrobial activity of this genus has been proven against various microorganisms, including *E. coli* and *S. aureus*. This activity depends on the species and the extract obtained, as well as the method of acquisition [46].

Based on the results, it is possible to state that the antibacterial activity is influenced by the method of extracting phenolic compounds, the concentration and the plant extract used.

Table 4 shows the statistical analysis of the variables studied (plants, extraction method and concentration) and the antimicrobial effect on the four spoilage yeasts analysed, as well as their interactions ( $p < 0.05$ ).

**Table 4.** Diameter of inhibition zones in mm of different concentrations of plant extracts tested that showed activity against yeasts.

Plant	<i>C. Boidinii</i>	<i>K. Fluxuum</i>	<i>P. Carsonii</i>	<i>Z. Bailii</i>
	Mean SD	Mean SD	Mean SD	Mean SD
<i>Cistus albidus</i>	2.83 ± 4.2 <sup>d</sup>	5.17 ± 4.11 <sup>b</sup>	4.87 ± 3.76 <sup>c</sup>	5.31 ± 3.04 <sup>c</sup>
<i>Cistus ladanifer</i>	7.55 ± 2.7 <sup>a</sup>	7.83 ± 3.21 <sup>a</sup>	8.11 ± 3.08 <sup>a</sup>	7.69 ± 2.93 <sup>a</sup>
<i>Cistus salviifolius</i>	1.62 ± 3.79 <sup>e</sup>	4.53 ± 4.04 <sup>bc</sup>	-	1.31 ± 3.06 <sup>d</sup>
<i>Lavandula stoechas</i>	-	1.54 ± 2.98 <sup>d</sup>	2.33 ± 3.50 <sup>d</sup>	1.33 ± 3.09 <sup>d</sup>
<i>Quercus ilex</i>	5.46 ± 6.09 <sup>b</sup>	7.53 ± 4.89 <sup>a</sup>	3.37 ± 4.65 <sup>b</sup>	6.52 ± 5.03 <sup>b</sup>
<i>Rosmarinus officinalis</i>	-	1.025 ± 2.39 <sup>d</sup>	1.2 ± 2.80 <sup>e</sup>	-
<i>Rubus ulmifolius</i>	3.15 ± 4.89 <sup>c</sup>	3.51 ± 3.71 <sup>c</sup>	1.01 ± 2.37 <sup>f</sup>	1.16 ± 2.71 <sup>e</sup>
<b>Extraction method</b>				
Agitation	1.87 ± 3.57	3.62 ± 3.41	2.76 ± 3.73	3.24 ± 4.14
Ultrasound	4.02 ± 5.04	5.27 ± 5.01	3.78 ± 4.43	3.42 ± 4.26
<b>Concentration (mg/mL)</b>				
2	5.97 ± 5.53 <sup>a</sup>	7.05 ± 5.26 <sup>a</sup>	5.88 ± 4.87 <sup>a</sup>	6.12 ± 4.89 <sup>a</sup>
1	2.14 ± 3.53 <sup>b</sup>	4.79 ± 2.83 <sup>b</sup>	3.20 ± 3.31 <sup>b</sup>	2.87 ± 3.46 <sup>b</sup>
0.5	0.73 ± 1.83 <sup>c</sup>	1.51 ± 2.49 <sup>c</sup>	0.73 ± 1.82 <sup>c</sup>	0.99 ± 1.96 <sup>c</sup>
<i>Pplants</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
<i>Pextraction</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
<i>Pconcentration</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
<i>Pplant × extraction</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

-: no inhibition; a-f: values with different superscript letters indicate statistical differences ( $p < 0.05$ ).

*Cistus ladanifer* showed a greater inhibition capacity against the four studied spoilage yeasts and *C. albidus* showed greater capacity against *K. fluxuum*, *P. carsonii* and *Z. bailii* ( $p < 0.05$ ; Table 3). A greater inhibition capacity of *Q. ilex* can also be observed against *C. boidinii*, *K. fluxuum* and *Z. bailii*.

In addition, greater inhibition capacity against the studied yeasts was obtained with ultrasound extraction, and the highest concentration of extracts, 2 mg/mL, showed a greater antimicrobial capacity.

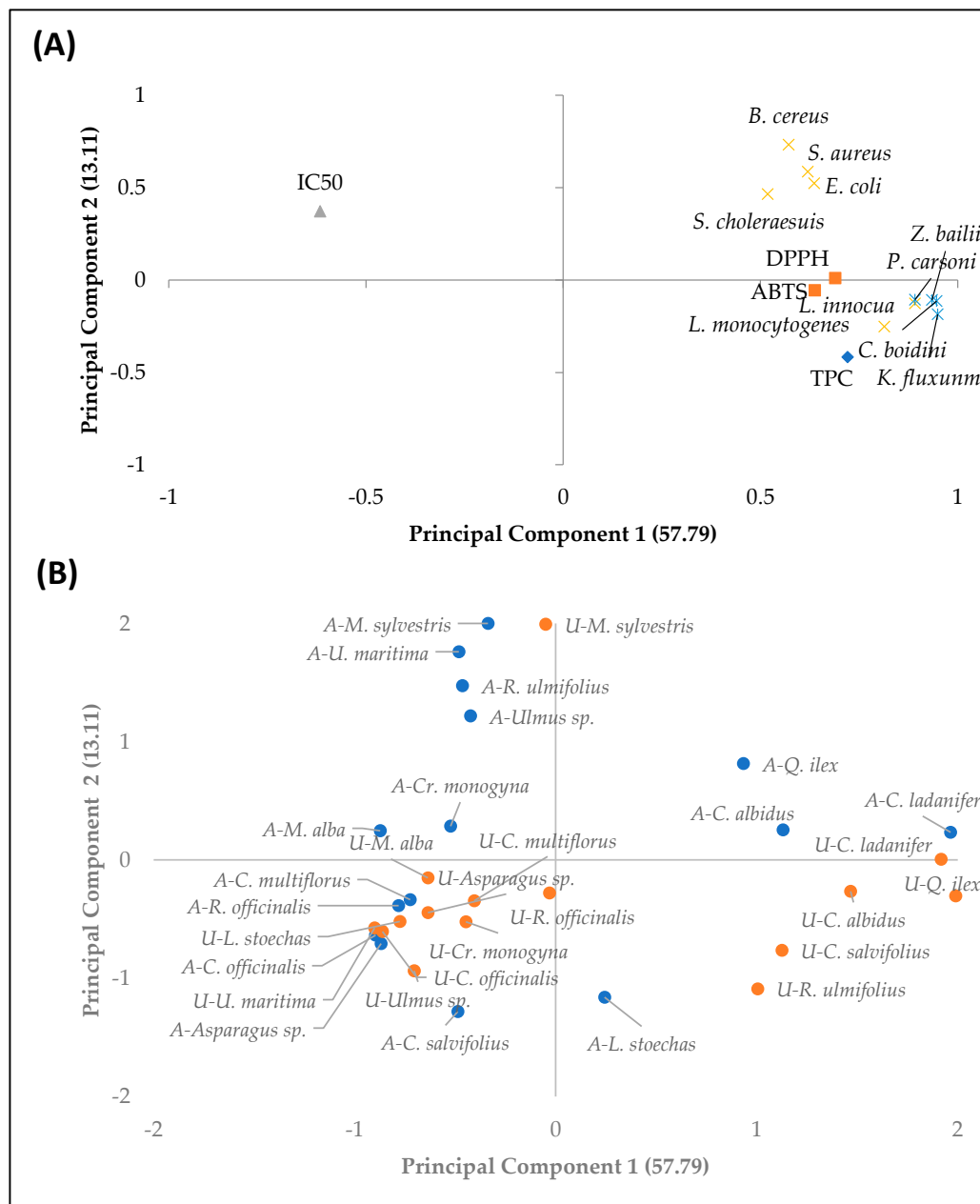
Ceylan et al. [47] performed studies with several aromatic plants and observed their activity against yeasts of the genus *Candida*.

When comparing the results presented in Tables 3 and 4, it can be observed that plants with activity against bacteria do not show activity against yeasts or do so to a lesser extent. That was the case for *C. salviifolius*, *R. ulmifolius* and *Malva sylvestris*. The first two presented lower activity against yeasts compared to bacteria (Table 3); *M. sylvestris* did not present any activity against the studied yeasts, so it was not included in Table 4.

*Q. ilex* is also described as having antimicrobial and antifungal properties. Merghache et al. [48] demonstrated the inhibition capacity of the wood ashes of *Q. ilex* against yeasts even at low concentrations (5%).

Therefore, as previously stated for antibacterial activity, based on the results, antifungal activity is influenced by the method of extracting phenolic compounds, the concentration and the plant extract used.

Finally, the PCA developed with the different parameters studied, to determine the relevance of each parameter in the plant extracts obtained with the two extraction methods used, is shown in Figure 1.



**Figure 1.** Principal component analysis of the parameters analysed in the extracts from different plants extracted by agitation (A) and ultrasound (U). Loading plot (A). TPC: total phenolic compounds; DPPH and ABTS: antioxidant activity of extracts; IC50: extract concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) required to reduce 50% of ACE; *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. choleraesuis*, *L. innocua* and *L. monocytogenes*: antimicrobial activity against each of the bacteria; *Z. bailii*, *P. carsonii*, *C. boidinii* and *K. fluxuum*: antimicrobial activity against each of the yeasts. Score plot (B). Plant extracts extracted by agitation (blue); plant extracts extracted by ultrasound (orange).

Figure 1 shows that the *Q. ilex* extracts extracted by ultrasound (U) and those of *C. ladanifer* extracted by both methods (A and U) are located on the negative and positive axes, respectively, of the main component 1 defined by antimicrobial activity against yeast, explaining 57.79% of the total variance. The *M. sylvestris* extracts were associated with the main component 2 (13.11% of the total variance), with the positive part defined by antimicrobial activity against *B. cereus* bacteria.

Among the observed results, it can be highlighted that the extracts obtained by ultrasound from the plants belonging to the genera *Cistus*, especially *C. ladanifer* and *C. albidus*, and *Quercus* (*Q. ilex*), were the ones that presented the highest number of

phenolic compounds, and highest antioxidant and antimicrobial activity. It was also possible to observe that the extracts of the genus *Cistus*, highlighting *C. ladanifer* extracted by ultrasound, were the ones that presented the best results for antihypertensive activity, since the concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of extract necessary to inhibit 50% of ACE is lower, which explains why the  $\text{IC}_{50}$  is in the opposite plane for these plant extracts.

#### 4. Conclusions

In general, when the two extraction methods used to obtain phenolic compounds were compared, it was found that there were significant differences, with the highest values found for ultrasound extraction. In addition, the extracts obtained from *Cistus albidus*, *C. salviifolius*, *R. ulmifolius* and *Q. ilex* were the ones with the highest concentrations of phenolic compounds. The antioxidant activity was higher in the *Cistus* and *Q. ilex* extracts obtained by ultrasound, as was the antihypertensive activity. The antimicrobial activity was also higher in the extracts obtained by ultrasound from *C. salviifolius* and *Q. ilex* plants against bacteria and *C. ladanifer* against yeast.

Therefore, it can be concluded that, by ultrasound extraction of the phenolic compounds from the plants *C. ladanifer*, *C. albidus* and *Q. ilex*, it is possible to obtain extracts with significant functional properties, so that they could be studied for their use in food with the aim of obtaining healthy and safe products, favouring the sustainability of the Dehesa Extremeña environment.

**Author Contributions:** Conceptualization, R.C., M.J.B. and M.d.G.C.; methodology, R.C., S.R.-M. and A.M.; formal analysis, F.R.B. and A.M.; investigation, F.R.B.; resources, F.R.B. and R.C.; data management, R.C. and A.M.; writing—original draft preparation, R.C. and M.J.B.; writing—review and editing, R.C.; visualization, A.M.; supervision, M.J.B. and M.d.G.C.; funding acquisition, M.d.G.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Junta de Extremadura with the projects IB16158 and GR18165.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors are grateful to M. Cabrero and J. Hernández Barreto for technical assistance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. Quilez, M.; Ferreres, F.; López-Miranda, S.; Salazar, E.; Jordán, M.J. Seed oil from Mediterranean aromatic and medicinal plants of the Lamiaceae family as a source of bioactive components with nutritional. *Antioxidants* **2020**, *9*, 510. [[CrossRef](#)]
2. Blanco Salas, J.; Vázquez, F.M.; Alonso, D.; Gutierrez Esteban, M.; Márquez-García, F.; Chaparro, J.; Barrera, M.; Ramos, S.; Hércules, S. Recursos fitogenéticos de las dehesas extremeñas: Plantas medicinales. In Proceedings of the V Congreso Forestal Español, Ávila, Spain, 21–25 September 2009.
3. Costa, D.C.; Costa, H.S.; Albuquerque, T.G.; Ramos, F.; Castilho, M.C.; Sanches-Silva, A. Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. *Trends Food Sci. Technol.* **2015**, *45*, 336–354. [[CrossRef](#)]
4. Pacheco, D.P.; Villalobos, J.R. Contribución al conocimiento de nombres vernáculos de plantas medicinales en la comarca de Zafra-Río Bodión. *Rev. Estud. Extremeños* **2007**, *63*, 343–352.
5. Ruíz, T.T.; Escobar, G.P.; Pérez, C.J.L. *La Serena y Sierras Limítrofes: Flora y Vegetación*; Consejería de Agricultura y Medio Ambiente, Junta de Extremadura: Mérida, Spain, 2007.
6. Kamala Kumari, P.V.; Akhila, S.; Srinivasa Rao, Y.; Rama Devi, B. Alternative to artificial preservatives. *Sys. Rev. Pharm.* **2019**, *10*, S13–S16.
7. Suhaj, M. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: A review. *J. Food Compos. Ana* **2006**, *19*, 531–537. [[CrossRef](#)]
8. Brewer, M.S. Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comp. Rev. Food Scif.* **2011**, *10*, 221–247. [[CrossRef](#)]
9. Li, A.N.; Li, S.; Zhang, Y.J.; Xu, X.R.; Chen, Y.M.; Li, H.B. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients* **2014**, *6*, 6020–6047. [[CrossRef](#)]



10. Chun, S.S.; Vатtem, D.A.; Lin, Y.T.; Shetty, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter Pylori*. *Process. Biochem.* **2005**, *40*, 809–816. [[CrossRef](#)]
11. Moon, J.K.; Shibamoto, T. Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1655–1666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Zulueta, A.; Esteve, M.J.; Frígola, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem.* **2009**, *114*, 310–316. [[CrossRef](#)]
13. Kumar, H.; Bhardwaj, K.; Nepovimova, E.; Kuča, K.; Dhanjal, D.S.; Bhardwaj, S.; Bhatia, S.K.; Verma, R.; Kumar, D. Antioxidant functionalized nanoparticles: A combat against oxidative stress. *J. Nanomater.* **2020**, *10*, 1334. [[CrossRef](#)]
14. Pate, K.M.; Rogers, M.; Reed, J.W.; van der Munnik, N.; Vance, S.Z.; Moss, M.A. Anthoxanthin polyphenols attenuate A $\beta$  oligomer-induced neuronal responses associated with Alzheimer's disease. *CNS Neurosci. Ther.* **2017**, *23*, 135–144. [[CrossRef](#)]
15. Crozier, A.; Jaganath, I.B.; Clifford, M.N. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1001–1043. [[CrossRef](#)]
16. Burri, S.C.; Ekholm, A.; Bleive, U.; Jensen, M.; Hellstr, J.; Mrikinen, S.; Korpineng, R.; Mattilah, P.H.; Radenkovsi, V.; Seglinai, D.; et al. Lipid oxidation inhibition capacity of plant extracts and powders in a processed meat model system. *Meat. Sci.* **2020**, *162*, 108033. [[CrossRef](#)]
17. Lourenço, S.C.; Moldão-Martins, M.; Alves, V.D. Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. *Molecules* **2019**, *24*, 4132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Cáceres, M.; Hidalgo, W.; Stashenko, E.; Torres, R.; Ortiz, C. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities against pathogenic bacteria. *Antibiotics* **2020**, *9*, 147. [[CrossRef](#)]
19. Gomes, F.; Dias, M.I.; Lima, Â.; Barros, L.; Rodrigues, M.E.; Ferreira, I.C.; Henriques, M. *Satureja montana* L. and *Origanum majorana* L. decoctions: Antimicrobial activity, mode of action and phenolic characterization. *Antibiotics* **2020**, *9*, 294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Oh, E.; Jeon, B. Synergistic anti-*Campylobacter jejuni* activity of fluoroquinolone and macrolide antibiotics with phenolic compounds. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Sanhueza, L.; Melo, R.; Montero, R.; Maisey, K.; Mendoza, L.; Wilkens, M. Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0172273. [[CrossRef](#)]
22. Vieitez, I.; Maceiras, L.; Jachmanián, I.; Alborés, S. Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology. *J. Supercrit. Fluid* **2018**, *133*, 58–64. [[CrossRef](#)]
23. Weerakkody, N.S.; Caffin, N.; Turner, M.S.; Dykes, G.A. In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. *Food Control* **2010**, *21*, 1408–1414. [[CrossRef](#)]
24. Mihailovic-Stanojevic, N.; Belščak-Cvitanović, A.; Grujić-Milanović, J.; Ivanov, M.; Jovović, D.; Bugarski, D.; Miloradović, Z. Antioxidant and antihypertensive activity of extract from *Thymus serpyllum* L. in experimental hypertension. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2013**, *68*, 235–240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Vargas-León, E.A.; Díaz-Batalla, L.; González-Cruz, L.; Bernardino-Nicanor, A.; Castro-Rosas, J.; Reynoso-Camacho, R.; Gómez-Aldapa, C.A. Effects of acid hydrolysis on the free radical scavenging capacity and inhibitory activity of the angiotensin converting enzyme of phenolic compounds of two varieties of jamaica (*Hibiscus sabdariffa*). *IND Crops Prod.* **2018**, *116*, 201–208. [[CrossRef](#)]
26. Caldas, T.W.; Mazza, K.E.; Teles, A.S.; Mattos, G.N.; Brígida, A.I.S.; Conte-Junior, C.A.; Borguini, G.R.; Godoy, L.R.; Cabral, L.M.C.; Tonon, R.V. Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. *IND Crops Prod.* **2018**, *111*, 86–91. [[CrossRef](#)]
27. Wettasinghe, M.; Shahidi, F. Evening primrose meal: A source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1801–1812. [[CrossRef](#)]
28. Teixeira, D.M.; Canelas, V.C.; Martins do Canto, A.; Teixeira, J.M.G.; Dias, C.B. HPLC-DAD quantification of phenolic compounds contributing to the antioxidant activity of *Maclura pomifera*, *Ficus carica* and *Ficus elastica* extracts. *Anal. Lett.* **2009**, *42*, 2986–3003. [[CrossRef](#)]
29. Cano, A.; Acosta, M.; Armao, M.B. A method to measure antioxidant activity in organic media: Application to lipophilic vitamins. *Redox Rep.* **2000**, *5*, 365–370. [[CrossRef](#)]
30. Sentandreu, M.A.; Toldrá, F. A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme. *Food Chem.* **2006**, *97*, 546–554. [[CrossRef](#)]
31. Sentandreu, M.A.; Toldrá, F. A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2423–2427. [[CrossRef](#)]
32. Bimakr, M.; Ganjloo, A.; Zarringhalami, S.; Ansarian, E. Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from *Malva sylvestris* leaves and its comparison with agitated bed extraction technique. *Food Sci. Biotechnol.* **2017**, *26*, 1481–1490. [[CrossRef](#)]
33. He, B.; Zhang, L.L.; Yue, X.Y.; Liang, J.; Jiang, J.; Gao, X.L.; Yue, P.X. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chem.* **2016**, *204*, 70–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Abu-Orabi, S.T.; Al-Qudah, M.A.; Saleh, N.R.; Bataineh, T.T.; Obeidat, S.M.; Al-Sheraideh, M.S.; Al-Jaber, H.I.; Tashtoush, H.I.; Lahham, J.N. Antioxidant activity of crude extracts and essential oils from flower buds and leaves of *Cistus creticus* and *Cistus salviifolius*. *Arab. J. Chem.* **2020**, *13*, 6256–6266. [[CrossRef](#)]

35. Amessis-Ouchemoukh, N.; Ouchemoukh, S.; Meziat, N.; Idiri, Y.; Hernanz, D.; Stinco, C.M.; Rodríguez-Pulido, F.J.; Heredia, F.J.; Madani, K.; Luis, J. Bioactive metabolites involved in the antioxidant, anticancer and anticalpain activities of *Ficus carica* L., *Ceratonia siliqua* L. and *Quercus ilex* L. extracts. *IND Crops Prod.* **2017**, *95*, 6–17. [[CrossRef](#)]
36. Hadidi, L.; Babou, L.; Zaidi, F.; Valentão, P.; Andrade, P.B.; Grosso, C. *Quercus ilex* L.: How season, plant organ and extraction procedure can influence chemistry and bioactivities. *Chem. Biodivers.* **2017**, *14*, e1600187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Márquez, C.J.; Otero, C.M.; Rojano, B.A.; Osorio, J.A. Actividad Antioxidante y Concentración de Compuestos Fenólicos del Tomate de Árbol (*Cyphomandra betacea* S.) en Poscosecha. *Temas Agrarios* **2014**, *19*, 173–184. [[CrossRef](#)]
38. Puertas-Mejía, M.A.; Rivera-Echeverry, F.; Villegas-Guzmán, P.; Rojano, C.B.A.; Palaez-Jaramillo, C. Comparación entre el Estado de Maduración del Fruto de Café (*Coffea arabica* L.), el Contenido de Antocianinas y su Capacidad Antioxidante. *Rev. Cuba. Plantas Med.* **2012**, *17*, 360–367.
39. Stepień, A.; Aebisher, D.; Bartusik-Aebisher, D. Biological properties of *Cistus* species. *Eur. J. Clin. Exp. Med.* **2018**, *16*, 127–132. [[CrossRef](#)]
40. Arina, M.I.; Harisun, Y. Effect of extraction temperatures on tannin content and antioxidant activity of *Quercus infectoria* (Manjakani). *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2019**, *19*, 101104. [[CrossRef](#)]
41. Chaudhary, N.; Sabikhi, L.; Hussain, S.A.; Sathish Kumar, M.H. A comparative study of the antioxidant and ACE inhibitory activities of selected herbal extracts. *J. Herb. Med.* **2020**, *22*, 100343. [[CrossRef](#)]
42. Mahmoudi, H.; Aouadhi, C.; Kaddour, R.; Gruber, M.; Zargouni, H.; Zaouali, W.; Ben Hamida, N.; Ben Nasri, M.; Ouerghi, Z.; Hosni, K. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of two cultivated *Cistus* species from Tunisia. *J. Biosci.* **2016**, *32*, 226–237. [[CrossRef](#)]
43. Kalemba, D.; Kunicka, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 813–829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. López-Hidalgo, C.; Trigueros, M.; Menéndez, M.; Jorin-Novo, J.V. Phytochemical composition and variability in *Quercus ilex* acorn morphotypes as determined by NIRS and MS-based approaches. *Food Chem.* **2021**, *338*, 127803. [[CrossRef](#)]
45. Karioti, A.; Sokovic, M.; Ciric, A.; Koukoulitsa, C.; Bilia, A.R.; Skaltsa, H. Antimicrobial properties of *Quercus ilex* L. proanthocyanidin dimers and simple phenolics: Evaluation of their synergistic activity with conventional antimicrobials and prediction of their pharmacokinetic profile. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 6412–6422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Burlacu, E.; Nisca, A.; Tanase, C. A comprehensive review of phytochemistry and biological activities of *Quercus* species. *Forests* **2020**, *11*, 904. [[CrossRef](#)]
47. Ceylan, S.; Cetin, S.; Camadan, Y.; Saral, O.; Ozsen, O.; Tutus, A. Antibacterial and antioxidant activities of traditional medicinal plants from the Erzurum region of Turkey. *Ir. J. Med. Sci.* **2019**, *188*, 1303–1309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Merghache, D.; Boucherit-Otmani, Z.; El Hacı, I.A.; Chikhi, I.; Boucherit, K. Inhibitory effect of *Quercus ilex* wood ash on the growth of pathogenic microorganisms. *Phytothérapie* **2018**, *16*, S269–S272. [[CrossRef](#)]

## **CAPÍTULO 2**

---





*foods*

an Open Access Journal by MDPI



# Antifungal Effect of Autochthonous Aromatic Plant Extracts on Two Mycotoxigenic Strains of *Aspergillus flavus*




Francisco Ramiro Boy; Rocío Casquete; Iris Gudiño; Almudena V. Merchán; Belén Peromingo; María José Benito

*Foods* 2023, Volume 12, Issue 9, 1821



## Article

# Antifungal Effect of Autochthonous Aromatic Plant Extracts on Two Mycotoxigenic Strains of *Aspergillus flavus*

Francisco Ramiro Boy<sup>1,2</sup>, Rocío Casquete<sup>1,2,\*</sup> , Iris Gudiño<sup>1,2</sup>, Almudena V. Merchán<sup>1,2</sup> , Belén Peromingo<sup>1,2</sup> and María José Benito<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup> Nutrición y Bromatología, Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de Extremadura, Avd. Adolfo Suárez s/n, 06007 Badajoz, Spain; ramboy1@hotmail.com (F.R.B.); igudino@unex.es (I.G.); avmerchan@unex.es (A.V.M.); belenperomingo@unex.es (B.P.); mjbenito@unex.es (M.J.B.)

<sup>2</sup> Instituto Universitario de Investigación en Recursos Agrarios (INURA), Universidad de Extremadura, Avd. de la Investigación, 06006 Badajoz, Spain

\* Correspondence: rociocp@unex.es; Tel.: +34-924289300 (ext. 86228)

**Abstract:** This study identified the compounds obtained from four native Dehesa plants, which were holm oak, elm, blackberry and white rockrose, and evaluated their ability to inhibit the growth and production of aflatoxins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> of two strains of mycotoxigenic *Aspergillus flavus*. For this purpose, phenolic compounds present in the leaves and flowers of the plants were extracted and identified, and subsequently, the effect on the growth of *A. flavus*, aflatoxin production and the expression of a gene related to its synthesis were studied. *Cistus albidus* was the plant with the highest concentration of phenolic compounds, followed by *Quercus ilex*. Phenolic acids and flavonoids were mainly identified, and there was great variability among plant extracts in terms of the type and quantity of compounds. Concentrated and diluted extracts were used for each individual plant. The influence on mold growth was not very significant for any of the extracts. However, those obtained from plants of the genus *Quercus ilex*, followed by *Ulmus* sp., were very useful for inhibiting the production of aflatoxin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> produced by the two strains of *A. flavus*. Expression studies of the gene involved in the aflatoxin synthesis pathway did not prove to be effective. The results indicated that using these new natural antifungal compounds from the Dehesa for aflatoxin production inhibition would be desirable, promoting respect for the environment by avoiding the use of chemical fungicides. However, further studies are needed to determine whether the specific phenolic compounds responsible for the antifungal activity of *Quercus ilex* and *Ulmus* sp. produce the antifungal activity in pure form, as well as to verify the action mechanism of these compounds.

**Keywords:** aromatic Dehesa plants; phenolic compounds; antifungal activity; *Aspergillus flavus*; aflatoxins



**Citation:** Boy, F.R.; Casquete, R.; Gudiño, I.; Merchán, A.V.; Peromingo, B.; Benito, M.J. Antifungal Effect of Autochthonous Aromatic Plant Extracts on Two Mycotoxigenic Strains of *Aspergillus flavus*. *Foods* **2023**, *12*, 1821. <https://doi.org/10.3390/foods12091821>

Academic Editor: Theodoros Varzakas

Received: 31 March 2023

Revised: 25 April 2023

Accepted: 25 April 2023

Published: 27 April 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Aromatic plants are a group of plants whose active compounds are constituted, totally or partially, by essences, representing about 0.7% of the total number of medicinal plants [1]. Their extracts have been used for various purposes, as well as in medicine, food, cosmetics, pharmacy and perfumery due to their strong antioxidant activity since they contain polyphenols, vitamin E, selenium, vitamin C,  $\beta$ -carotene, lutein, lycopene, and other carotenoids that play a fundamental role in adsorbing and neutralizing free radicals to improve human health [2], slowing the development of diseases related to oxidative stress such as cancer, diabetes or Alzheimer's disease. These plants are considered a future option, especially for areas with special qualities (mountainous, scrubland, moderate arid areas, etc.) where conventional crops are not feasible or profitable [3].

The Extremadura Dehesa is a region in Spain that has been declared a UNESCO Biosphere Reserve and is characterized as a very diverse ecosystem. A great heterogeneity of aromatic and medicinal plants can be found [4]. This included *Quercus ilex*, whose

extracts have been highlighted for their anti-inflammatory, antibacterial, hepatoprotective, antidiabetic, anticancer, gastroprotective, antioxidant and cytotoxic properties [5]. Other Dehesa plants such as *Ulmus* sp., *Rubus ulmifolius* and *Cistus albidus* have been studied, and from their extracts, vitamins (ascorbic acid), reducing sugars (glucose and fructose), polyunsaturated fatty acids and eicosadienoic acids have been obtained [6]. The functional properties offered by these plants correspond mainly to the phenolic compounds found in their fruits, seeds, leaves, stems and flowers. These constitute a relatively wide group of compounds that belong to the secondary metabolism of plants and whose molecular structure presents a hydroxyl group linked to an aromatic ring, which confers antimicrobial capacity. They are organized into several groups; phenolic acids, flavonoids, and non-flavonoids are the main groups [7]. Several studies have demonstrated the antimicrobial effects of these phenolic compounds, highlighting their use against pathogenic bacteria and spoilage yeasts in food [4]. Consequently, these plants could be studied as well as an alternative to avoid and reduce the presence of molds in food and, consequently, the occurrence of mycotoxins.

Mold growth in food may cause different food spoilage and serious health risks for consumers due to the production of toxic metabolites. The genera *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Mucor* and *Rhizopus* are included in this group [8]. The mycotoxins that are produced have toxic effects even when consumed in small amounts since they have accumulative effects on the organism [9]. Several EU regulations currently exist on maximum limits allowed for the most widely recognized mycotoxins, aflatoxin, ochratoxin, zearalenone fumonisin and patulin. These regulations are particularly severe in terms of the limits required for foods and food products destined for infants and children, as they are more susceptible to the effects of mycotoxin contamination [10]. Among the mycotoxins, aflatoxins, produced mainly by *Aspergillus flavus*, are undoubtedly the most documented of all mycotoxins and are widely present in foods [11]. There are six types of aflatoxins (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub>) [12], where aflatoxin B<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>, stands out for being considered as Class I carcinogens by the World Health Organization (WHO). More specifically, the bioaccessibility of AFB<sub>1</sub> in infant formulas has been reported to be higher than for other mycotoxins, being, therefore, more toxic [10]. They can be both acutely and chronically toxic and be carcinogenic, mutagenic, teratogenic and immunosuppressive to most mammalian species [13,14]. Aflatoxins have been detected in many foods, but their presence is especially important in maize, cottonseeds, peanuts and other nuts [15,16]. Conventional chemical and physical methods are insufficient to remove toxins from foods, and the use of synthetic compounds to inhibit mold growth can lead to resistance and health problems [17]. For these reasons, an urgent need exists to identify a healthy alternative strategy to reduce aflatoxin contamination by molds using natural compounds that can affect inhibiting mold growth or block biosynthesis. In the case of pathways directly related to aflatoxin biosynthesis, the *aflR* gene is the regulatory gene for aflatoxin synthesis, and it has been described that there is an intimate correlation between the expression of this gene and the production of the aflatoxins AFB<sub>1</sub> and AFG<sub>1</sub> [18–20].

This study aims to evaluate the compounds present in the native plants of the Dehesa, holm oak, elm, blackberry and white rockrose, identifying the compounds present in each extract and subsequently assaying their antifungal activities against two strains of mycotoxigenic *A. flavus*, as well as their influence on aflatoxin AFB<sub>1</sub> and AFB<sub>2</sub> production and expression of genes related to these mycotoxins.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Plant Material

Four aromatic plants have been used in this work, the leaves of *Quercus ilex* (Holm oak), *Ulmus* sp. (Elm), *Rubus ulmifolius* (Blackberry) and the flowers of *Cistus albidus* (White rockrose) provided by a company located in a Dehesa area of Peraleda de la Mata municipality, Cáceres, Extremadura. They were collected in February 2021. All samples were packed in vacuum bags and stored at 4 °C until use.



## 2.2. Fungal Strains

For this study, two strains of the aflatoxigenic mold *A. flavus*, Cq103 and Cq8, that produce aflatoxin B1 and B2 from the collection of the CAMIALI group from the University of Extremadura, Spain, were used. Both were seeded in a Petri dish in Potato Dextrose Agar (PDA; Oxoid, Madrid, Spain) and allowed to grow at 25 °C for five days [19].

## 2.3. Extraction of Phenolic Compounds from Plants

For the extraction of phenolic compounds from plants, the ultrasonic extraction method was used [4]. The resulting aqueous extracts were mixed to a known final volume.

The extracts were purified using HYPERSEP C18 500MG/3ML/50PLG purification columns, through which 10 mL of methanol and 10 mL of Milli-Q water were passed, followed by a vacuum to activate them, and then air was allowed to pass. Finally, 2 mL of the sample extracts were passed through and washed with 10 mL of Milli-Q water, and the sample was collected in a test tube with methanol. The solution was then evaporated in a rotary evaporator under a vacuum at 35 °C and resuspended in water.

## 2.4. Determination of Total Phenolic Content and Phenolic Compound Identification

The Folin–Ciocalteu method described by Wettasinghe and Shahidi [21] was used to determine the total phenolic content. For this purpose, 0.5 mL of sample, 10 mL of Milli-Q water and 1 mL of Folin–Ciocalteu's reagent was added to a 25 mL volumetric flask, shaken and waited for about 3 min, then 2 mL of saturated sodium carbonate was added, shaken rapidly, the flask was made up to volume with Milli-Q water and left for 1 h in the dark. Finally, the absorbance of the samples was measured at 760 nm. Gallic acid was used as standard. Results are expressed as mg gallic acid equivalents (GAE)/100 g of fresh plants. All experiments were performed in triplicate. The bioactive compounds identification was performed by HPLC-UV-ESI-MS/MS with the extracts diluted to 100 mg/L in methanol. Samples were filtered through a 0.22 µm syringe filter and injected into an HPLC (Agilent HPLC-QTOF Model G6530, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with a C18 column (4.6 × 1.50 mm, × 4.8 µm) Agilent Technologies. Phenolic compounds identification was performed with a quadrupole time-of-flight (Q-TOF) tandem mass analyzer with an electrospray ionization (ESI) source. The gas flow rate was 11 mL/min at 280 °C (35 psi nebulizer). Gradient elution was done with a mixture of hydrocyanic acid/water (5:95, v/v) as solvent A and hydrocyanic acid/water/formic acid (95:4.9:0.1 v/v/v) as solvent B, with a flow rate of 0.350 mL/min. The solvent gradient started with solvent B/solvent A (5:95, v/v), reaching 90:10 (v/v) at 15 and 20 min and returning to initial conditions during the last 10 min. The tentative identification of bioactive compounds was elucidated from the MassBank database. All samples were injected in triplicate.

## 2.5. Antifungal Experimental Conditions and Sampling

Once the molds were grown on PDA agar plates, the spores were collected with 2 mL of sterile Milli-Q water using 1 mL micropipettes and transferred to a sterile Eppendorf tube. Neubauer chamber was used to quantify spore suspension and adjusted to 10<sup>6</sup> spores/mL. This procedure was performed in a safety room and Bunsen burner. PDA plates were inoculated with 100 µL of different concentrations of each extract (250 and 150 mg/L) spread with the aid of a glass loop and 10 µL of the spore suspension of each mold. The strains were inoculated separately. Inoculation of the suspension of each mold, Cq8 and CQ103, were used, and the negative control was done with water. The experiment was carried out for 11 days, during which the Petri dishes were incubated at 25 °C in order to evaluate the reaction of the aflatoxigenic molds at their optimum growth temperature. The experiment was carried out in triplicate.

## 2.6. Mold Growth Monitoring

To evaluate the effect of the purified extracts on the growth of both strains of *A. flavus*, the colony diameter (mm) was measured in two directions at right angles to each other every

day at the same time to prevent alterations in the measurements following the methodology specified by Casquete et al. [22]. Next, regression curves, growth (mm) versus days of incubation, were obtained for the linear phase of mold growth under study. Generally, mold growth was considered to have a linear phase when the correlation coefficient of the line ( $R^2$ ) was very close to 1. Data that did not fit a linear regression of the line were rejected in the construction of the line. Next, the growth rate of *A. flavus* in the presence and absence of the purified plant extracts was determined. The experiment was carried out in triplicate.

### 2.7. Extraction and Quantification of Aflatoxins

For extraction and quantification of aflatoxins was done at the end of the assay. Half of the contents of the Petri dishes were poured into a Stomacher bag individually, 100 mL of chloroform was added in a fume hood, mixed well, and allowed to settle for 1 h in the dark. The solution was filtered in a rotary evaporator flask with a filter to which two tablespoons of anhydrous sulfate were added. Next, a wash was made by adding 10 mL of chloroform to the bag. The filtrate was brought to evaporate at a rotary evaporator at a temperature of 30 °C; once evaporated, 2 mL of chloroform was added and transferred to Kimax tubes to evaporate the solvent in the Mivac with nitrogen gas. Then, 1 mL of chloroform was added to these tubes and evaporated again. Next, 500 µL of methanol and 500 µL of Milli-Q water were added and shaken in a vortex, passing the solution into a vial through a 0.2 µM filter with a 1 mL syringe. For aflatoxin quantification, vial samples were analyzed on HPLC with a diode array detector [18]. The mobile phase used for the separation contained HPLC-grade water (solvent A) and HPLC-grade acetonitrile (solvent B), run in a gradient mode set from 15% B at the start to 100% B at 30 min. Three minutes were necessary to equilibrate the column. All solvents used were purchased from Thermo Fisher Scientific (Runcorn, UK). The injection volume was 25 µL, and the flow rate was 1 mL/min. Calibrations were carried out for each aflatoxin, B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>, using standards obtained from Sigma–Aldrich.

### 2.8. Gene Expression Studies

For the study of the relative expression of the *aflR* gene [19] involved in aflatoxin synthesis, the other half of the plate was scraped with a scalpel and frozen at −80 °C until RNA extraction. RNA was isolated using the Plant Total RNA Kit (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). Samples of 250 to 500 mg of mycelium biomass were ground to powder in a pre-frozen mortar with liquid nitrogen, and total RNA was purified. Gene expression studies were performed by using reverse-transcription real-time quantitative PCR. First, cDNA was synthesized using about 500 ng of total RNA according to the kit protocol (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan) and then used for quantitative PCR analysis. Primer pairs AfIRTa1 (TCGTCCTTATCGTTCTCAAGG; AfIRTa2 ACTGTTGCTACAGCTGCCACT) were used to amplify the regulatory gene (*aflR*) and the primer pair F/R-TUBjd (F-TUBjd TCTTCATGGTGGCTTCGCT; R-TUBjd CTGGGGTCGAACATCTGCT) amplified the β-tubulin (β-TUB.JD) gene, used as the endogenous control [19]. The qPCR reactions were carried out using an Applied Biosystems 7300 Fast Real-Time PCR system with SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio Inc.) in the PCR reaction. The expression of the *aflR* gene with the housekeeping gene β-tubulin as an endogenous expressed control was quantified [20].

### 2.9. Statistical Analysis

Statistical analysis of the data was carried out using SPSS for Windows, version 21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Descriptive statistics of the data were determined, and the differences within and between groups were studied by one-way analysis of variance (ANOVA) and separated by Tukey's honestly significant differences test ( $p \leq 0.05$ ). Principal component analysis (PCA) was performed on the correlation matrix of the variables.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Quantification and Identification of Phenolic Compounds Extracted from Plants

The results of the extracts' concentration obtained by ultrasound from each type of plant are presented in Table 1. The table shows that *Quercus ilex* had twice the concentration of phenolic compounds compared to *Rubus ulmifolius* and *Ulmus* sp., but the plant with the highest concentration of compounds was *Cistus albidus*, with 703 mg AGE/100 g of sample.

**Table 1.** Total phenolic compounds of plant extracts expressed as mg gallic acid equivalents (GAE)/100 g fresh plant.

Extract	Total Phenolic Compounds		
	Mean		SD <sup>1</sup>
<i>Quercus ilex</i>	527	±	72.12 <sup>b</sup>
<i>Rubus ulmifolius</i>	257	±	45.25 <sup>c</sup>
<i>Ulmus</i> sp.	253	±	11.31 <sup>c</sup>
<i>Cistus albidus</i>	703	±	7.07 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> SD, standard deviation. <sup>a,b,c</sup> values with different superscripts are significantly different ( $p \leq 0.05$ ) between samples.

Considering that for the first three plants, the leaves were used and are trees, while for *Cistus albidus*, which is a shrub, the flowers were used, it is reasonable to assume that in the flowers, there is a greater amount of these compounds. *Cistus* is an aromatic plant highly valued for its functional properties, among which the content of phenolic compounds is remarkable [23]. *Quercus ilex* was found to have the most phenolic compounds among those extracted from the leaves of native trees. There are few studies on this plant, but some authors have also shown that it possesses a large amount of phenolic compounds. Boy et al. [4] demonstrated that *Quercus ilex* leaf constitutes a rich source of bioactive compounds, especially phenolic compounds, with functional properties. Sánchez Gutiérrez et al. [24] evaluated for the first time the influence of in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility and bioactivity of phenolic compounds in the ground leaf and leaf powder extract of this plant, demonstrating important health effects.

Table 2 shows the profile of the compounds extracted from the different plants. It can be observed that there were significant differences regarding the phenolic compound composition of the different plants. Compounds identified in *Cistus albidus* were not found in the other three samples. These compounds were the caffeic acid, eriodictyol, dihydroquercetin, eriodictyol, naringenin, esculetin-O-glucoside, chlorogenic acid and kaempferol diglycoside. Among these compounds, caffeic acid and chlorogenic acid are phenolic compounds of great importance for their antioxidant activity and are frequently identified in plant extracts and kaempferol as a flavonoid [25,26].

A larger variety of compounds were detected in *Quercus ilex*, with 12 compounds, and *Rubus ulmifolius*, with 11 compounds, many of them common as dihydroquercetin, myricetin, cinnamic acid, ligstroside glucuronide, 5-O-Caffeoylquinic acid and 5,7-dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavanone. However, coumaric acid and protocatechuic acid were only detected in *Quercus ilex* extracts and kaempferol in *Rubus*, *Ulmus* and *Cistus* extracts. Coumaric acid is an important phenolic compound for its antioxidant activity and is common in plants, but kaempferol is less common [25]. Phenolics having antioxidant activity are mainly phenolic acids and flavonoids. Considerable variation in phenolic compounds has been found in different plant species. Furthermore, due to the great diversity and complexity of natural mixtures of phenolic compounds in plant extracts, only the major groups are usually identified.

Many studies have shown a strong correlation between the content and composition of phenolic compounds and antioxidant and antimicrobial activity [27].

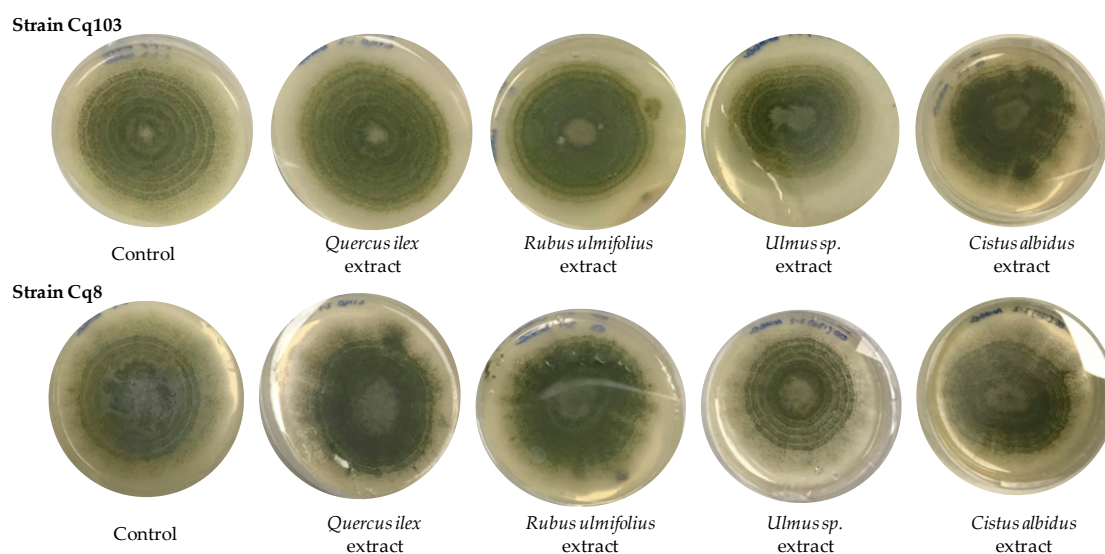
**Table 2.** Identification and quantification in arbitrary area units of bioactive compounds from plant extracts analyzed by HPLC-UV-ESI-MS/MS.

Peak	Rt (min)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS/MS (m/z)	Compound Identified *	<i>Quercus ilex</i>	<i>Rubus ulmifolius</i>	<i>Ulmus sp.</i>	<i>Cistus albidus</i>
1	3.020	116	277; 365	L-Valine	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	47.24 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>
2	4.167	123	144	Orcinol	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	36.63 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>
3	10.529	179	133; 135; 180	Caffeic acid	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	44,979.47 <sup>a</sup>
4	11.026	179	105; 133; 180; 395	Caffeic acid	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	5876.58 <sup>a</sup>
5	11.441	287	449; 611	Eriodictyol	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	910.52 <sup>a</sup>
6	11.69	303		Dihydroquercetin	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	384.87 <sup>a</sup>
7	11.839	287		Eriodictyol	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	6107.77 <sup>a</sup>
8	12.204	271	287	Naringenin	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	1926.97 <sup>a</sup>
9	12.403	339	165; 323; 501	Esculetin-O-glucoside	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	419.97 <sup>a</sup>
10	12.850	353	127; 659	Chlorogenic acid	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	5448.26 <sup>a</sup>
11	13.603	303	123; 139	Dihydroquercetin	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	7517.37 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>
12	13.664	163	164	Coumaric acid	473.95 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>
13	13.835	287		Eriodictyol	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	5914.22 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>
14	13.846	153	171	Protocatechuic acid	255.62 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>
15	13.969	303		Dihydroquercetin	0.00 <sup>b</sup>	761.21 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>
16	14.062	303		Dihydroquercetin	7605.68 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>
17	14.317	317	318	Myricetin	309.19 <sup>b</sup>	867.96 <sup>a</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>c</sup>
18	14.443	163	163	Coumaric acid	1890.40 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>
19	15.173	147	148	Cynnamic acid	7496.65 <sup>a</sup>	3785.26 <sup>b</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>c</sup>
20	16.208	147	148	Cynnamic acid	1726.29 <sup>b</sup>	4078.55 <sup>a</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>c</sup>
21	17.550	147	148	Cynnamic acid	784.53 <sup>b</sup>	3021.26 <sup>a</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>c</sup>
22	17.750	147	148; 283; 847	Cynnamic acid	806.54 <sup>a</sup>	870.59 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>
23	19.862	537	261; 511	Ligstroside glucuronide	660.18 <sup>a</sup>	487.32 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>
24	19.945	353	354	5-O-Caffeoylquinic acid	653.41 <sup>a</sup>	597.34 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>
25	20.138	315	316	5,7-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavanone	362.77 <sup>b</sup>	1663.85 <sup>a</sup>	181.54 <sup>b</sup>	0.00 <sup>c</sup>
26	21.149	593	533; 534; 594	Kaempferol 3-O-rutinoside	0.00 <sup>c</sup>	8806.99 <sup>b</sup>	16,605.12 <sup>a</sup>	0.00 <sup>c</sup>
27	23.173	533	534; 593; 594	Kaempferol 3-O-malonyl-glucoside	0.00 <sup>c</sup>	1163.51 <sup>b</sup>	1323.69 <sup>a</sup>	0.00 <sup>c</sup>
28	23.497	593	533	Kaempferol diglycoside	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	846.83 <sup>a</sup>
29	24.536	635	575; 576; 636	Trigalloyl-hexoside	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	200.31 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>

\* MassBank <sup>a,b,c</sup> values with different superscripts are significantly different between plant extracts (Tukey's test;  $p < 0.05$ ).

### 3.2. Activity of the Plants Extracts against Growth and Aflatoxin Production of the Two Micotoxigenic *Aspergillus flavus* Strains

The plant extracts were tested for their influence on the growth of two *Aspergillus flavus* strains and their effect on aflatoxin production. For this purpose, the concentrations of the extracts were adjusted at 250 and 150 mg/L of total phenolic compounds. This assay was carried out during 11 days of incubation at 25 °C. Figure 1 shows the final growth of strains Cq103 and Cq8 in a PDA medium in the presence of 250 mg/L of the four plant extracts used. Control was performed without the addition of any extract. It can be observed that at the end of the study, *A. flavus* grew with a similar growth rate in the presence of tested extracts except for the *Ulmus* sp. extract, where slower growth was observed in both strains. The final growths were between 8.6 and 5.2 cm in diameter at 11 days for strain CQ103 and between 8.4 and 5.4 cm for strain CQ8.



**Figure 1.** Growth of *A. flavus* strains Cq103 and Cq8 in PDA medium in the presence of 250 mg/L of the four plant extracts and a control without any extract.

The results of the growth rate at different days of sampling and with both concentrations of each extract are shown in Table 3.

**Table 3.** Growth rate (mm/day) of *A. flavus* strains Cq103 and Cq8 obtained during 11 days of incubation at 25 °C.

Extract	Concentration (mg/L)	Cq103 Strain			Cq8 Strain		
		Mean	SD <sup>1</sup>	Mean	SD		
Control	0	7.04	± 0.51 <sup>a,b</sup>	7.69	± 0.21 <sup>a</sup>		
<i>Quercus ilex</i>	150	6.40	± 0.07 <sup>a,b</sup>	7.19	± 0.13 <sup>a</sup>		
	250	6.63	± 0.77 <sup>a,b</sup>	6.94	± 0.33 <sup>a,b</sup>		
<i>Rubus ulmifolius</i>	150	6.50	± 0.20 <sup>a,b</sup>	7.01	± 0.48 <sup>a,b</sup>		
	250	6.01	± 0.19 <sup>a,b</sup>	6.87	± 0.07 <sup>a,b</sup>		
<i>Ulmus</i> sp.	150	7.88	± 0.01 <sup>a</sup>	7.05	± 0.03 <sup>a,b</sup>		
	250	4.75	± 0.66 <sup>b</sup>	4.96	± 0.58 <sup>c</sup>		
<i>Cistus albidus</i>	150	6.93	± 0.69 <sup>a,b</sup>	7.17	± 0.50 <sup>a</sup>		
	250	5.87	± 0.34 <sup>a,b</sup>	6.07	± 0.51 <sup>b</sup>		

<sup>1</sup> SD, standard deviation. <sup>a,b,c</sup> values with different superscripts are significantly different ( $p \leq 0.05$ ) between samples for each column.

*A. flavus* Cq103 grew at a rate between 7 and 5.8 mm/day with no significant differences detected between the control and the samples with 150 mg/L and 250 mg/L of the extracts of *Quercus ilex*, *Rubus ulmifolius* and *Cistus albidus* plants. However, at 250 mg/L of *Ulmus* sp. extract, significant differences were detected with respect to the control in the growth rate, which was 4.75 mm/day. Similar results were observed for the study with strain Cq8.

Different studies have observed inhibition of the growth of several types of hazardous molds in food in the presence of plant extracts; however, in our study, this effect on growth was not as marked. Abbaszadeh et al. [28] evaluated the antifungal efficacy of plant phenolic compounds, and the results indicated that all compounds were effective to varying degrees against the growth of different molds. The highest inhibitory activity of pure thymol, carvacrol, eugenol and menthol compounds were found for *Cladosporium* sp. between 100 and 350 µg/mL and *Aspergillus* sp. at 100 and 125 µg/mL. Faustino et al. [29] studied the effects of phenolic extracts obtained from *Calendula* L., rich in hydroxycinnamic acid and flavonoid derivatives, observing significant activity against *Microsporium* strains. Thus, other authors also observed that the inhibition of the growth of various types of harmful molds in food was different when they were in the presence of plant extracts.

Table 4 shows the effect of the selected plant extracts on the production of aflatoxins AFB<sub>1</sub> and AFB<sub>2</sub> by *A. flavus* Cq103 and Cq8. In this case, it was observed that while there were no significant differences in growth for aflatoxin production, there were differences with respect to the control. All extracts produced inhibition in terms of aflatoxin production, although to different extents.

In general, AFB<sub>1</sub> production was higher than AFB<sub>2</sub> for both strains, and strain Cq103 was less aflatoxin-producing at 25 °C than strain Cq8. In addition, the extracts had higher activity concentrated at 250 mg/L than those at 150 mg/L.

*Quercus ilex* produced the greatest inhibition, followed by *Ulmus* sp. On the other hand, the extract that had the least effect on aflatoxin production was that of *Rubus ulmifolius*.

Strain Cq103 was also inhibited in aflatoxin production by *Quercus ilex* and *Ulmus* sp. extracts, but Cq8 was more inhibited by *Quercus ilex* extracts.

The extracts tested have a different composition of phenolic compounds, as presented above. This may be the cause of the different activity against aflatoxin production by *A. flavus* strains. Different studies on the influence of phenolic compounds on mold growth have been published. However, there are few studies on the influence of aflatoxin production.

The results of the relative expression of *A. flavus* genes in the presence of plant extracts are shown in Table 5. The *aflR* gene of *A. flavus* was activated on expression in the presence of *Rubus ulmifolius* extract for strain Cq8. However, no significant differences were observed. No significant changes were seen in the expression of this regulatory gene in any of its forms.

**Table 4.** Aflatoxin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> (ppb) of strains Cq103 and Cq8 of *A. flavus* determined in the samples with the different extracts at the end of the assay at 25 °C.

Extract	Concentration (mg/L)	Cq103 <i>A. flavus</i> Strain				Cq8 <i>A. flavus</i> Strain			
		Aflatoxin B <sub>1</sub> (ppb)		Aflatoxin B <sub>2</sub> (ppb)		Aflatoxin B <sub>1</sub> (ppb)		Aflatoxin B <sub>2</sub> (ppb)	
		Mean	SD <sup>1</sup>	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Control	0	210.82	± 24.74 <sup>a</sup>	14.12	± 0.83 <sup>a</sup>	621.31	± 164.20 <sup>a</sup>	37.05	± 13.99 <sup>a,b</sup>
<i>Quercus ilex</i>	150	64.37	± 11.71 <sup>b</sup>	2.74	± 0.27 <sup>b</sup>	199.00	± 12.73 <sup>b,c,d</sup>	8.07	± 2.22 <sup>b</sup>
	250	53.22	± 6.90 <sup>b</sup>	3.33	± 0.48 <sup>b</sup>	105.06	± 21.26 <sup>d</sup>	3.51	± 1.19 <sup>b</sup>
<i>Rubus ulmifolius</i>	150	106.01	± 24.37 <sup>b</sup>	8.93	± 0.27 <sup>b</sup>	446.05	± 60.43 <sup>a,b</sup>	60.86	± 1.53 <sup>a</sup>
	250	96.01	± 74.37 <sup>b</sup>	6.93	± 5.27 <sup>b</sup>	411.05	± 30.43 <sup>a,b,c</sup>	30.86	± 1.53 <sup>b</sup>
<i>Ulmus</i> sp.	150	69.86	± 13.11 <sup>b</sup>	4.42	± 0.90 <sup>b</sup>	217.38	± 42.71 <sup>b,c,d</sup>	9.51	± 1.77 <sup>b</sup>
	250	39.66	± 24.05 <sup>b</sup>	2.99	± 2.00 <sup>b</sup>	163.44	± 74.01 <sup>c,d</sup>	6.44	± 4.15 <sup>b</sup>
<i>Cistus albidus</i>	150	94.00	± 19.30 <sup>b</sup>	6.97	± 2.23 <sup>b</sup>	402.93	± 76.71 <sup>b,c</sup>	65.73	± 15.21 <sup>a</sup>
	250	60.84	± 12.11 <sup>b</sup>	4.61	± 1.20 <sup>b</sup>	218.68	± 25.26 <sup>b,c,d</sup>	22.31	± 4.77 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> SD, standard deviation, <sup>a,b,c,d</sup> values with different superscripts are significantly different ( $p \leq 0.05$ ) between samples for each column.

**Table 5.** Relative gene expression log<sub>2</sub> of the *aflR* gene of *A. flavus* strains Cq103 and Cq8 determined in the samples with the different extracts at the end of the assay at 25 °C.

Extract	Concentration (mg/L)	Cq103 <i>A. flavus</i> Strain			Cq8 <i>A. flavus</i> Strain		
		Mean	±	SD <sup>1</sup>	Mean	±	SD
Control	0	0.00	±	0.000	0.00	±	0.000
<i>Quercus ilex</i>	150	−0.46	±	0.337	−0.12	±	1.061
	250	−3.04	±	0.001	−0.26	±	0.742
<i>Rubus ulmifolius</i>	150	−2.37	±	0.004	0.21	±	0.531
	250	−2.49	±	0.004	0.21	±	0.531
<i>Ulmus</i> sp.	150	−0.40	±	0.519	−2.00	±	0.012
	250	−0.58	±	0.321	0.00	±	1.087
<i>Cistus albidus</i>	150	−0.27	±	0.593	−2.17	±	0.000
	250	−0.29	±	0.647	−1.79	±	0.023

<sup>1</sup> SD, standard deviation.

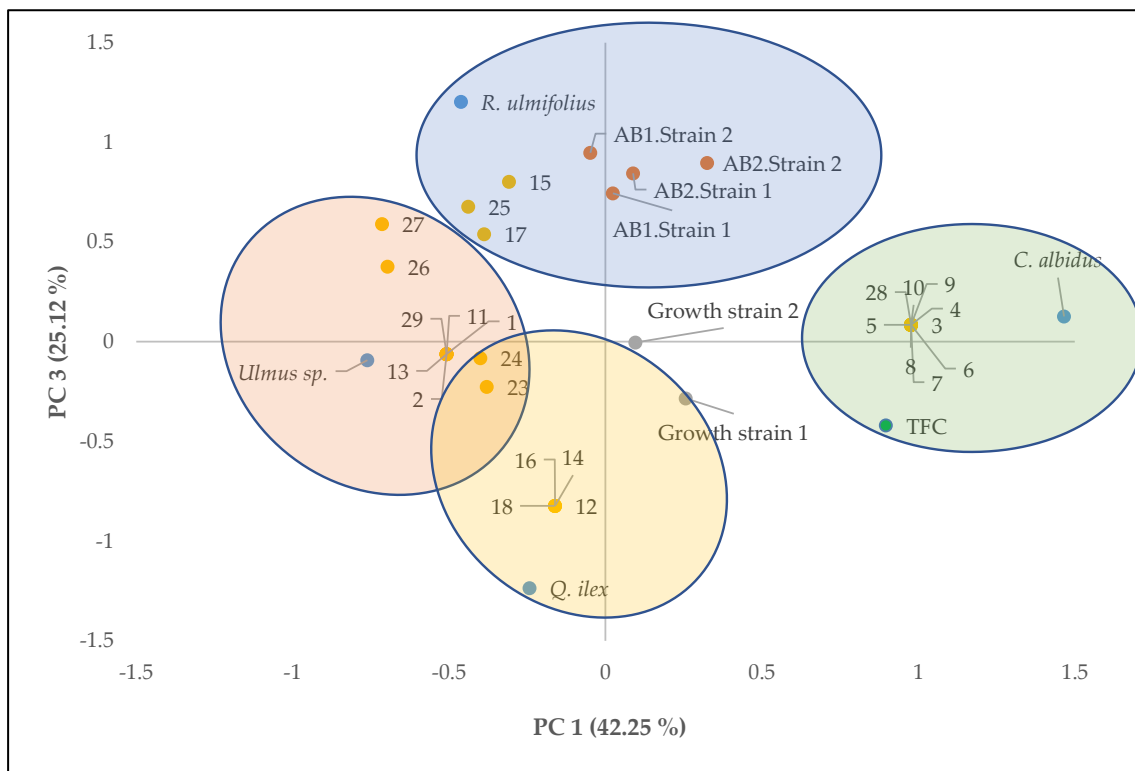
These results are not as expected since the extracts significantly decreased the production of AFB<sub>1</sub> and AFB<sub>2</sub> by both *A. flavus* strains. This inhibition is not observed in the expression of the regulatory gene of this biosynthetic pathway. Previous studies have shown that *aflR* gene expression and AFB<sub>1</sub> synthesis are closely related [18,30]. This may be because both gene expression and aflatoxin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> production were determined on the same incubation day, at the end of the assay, 11 days. Different studies have shown that the expression of genes involved in aflatoxin biosynthesis is cyclic [20], so there may be a lag between both parameters. Other research has concluded that, although the *aflR* gene has been described as the key gene in aflatoxin synthesis, sometimes there is no relationship between *aflR* gene expression and toxin production [31] depending on the environmental and nutritional conditions tested. On the other hand, the fact that the tested strains are capable of producing more than one mycotoxin makes it more complicated to correlate the expression of a gene with the production of a specific mycotoxin since the mold activates several mechanisms to achieve the synthesis of both secondary metabolites [32].

### 3.3. Multivariate Analysis of the Parameters Studied

Principal component analysis was carried out for phenolic compound content, growth of *A. flavus* strains, aflatoxin production and compounds identified in each of the extracts of the different plants studied to provide an interpretable understanding of the inhibition of aflatoxin production with the compounds identified in each extract.

Figure 2 shows the two-way loadings and score plots, where PC3 was plotted against PC1, explaining 67.37% of the total variance. According to Figure 2, aflatoxin productions were explained by the positive axis of CP3 and were also related to extracts of *R. ulmifolius* and its compounds. Extracts of *Quercus ilex* and *Ulmus* sp. were located on the negative axis of CP3, correlating with the lowest values of aflatoxin production. These were mainly compounds dihydroquercetin, coumaric acid, eriodictyol, protocatechuic acid and cinnamic acid from *Quercus ilex* and *Ulmus* sp. These compounds have been identified in aromatic and medicinal plants with important functional activities, primarily antioxidant activity [24–26].





**Figure 2.** Principal component analysis of the analytical results of the plant extracts (*Quercus ilex*, *Rubus ulmifolius*, *Ulmus sp.* and *Cistus albidus*); total phenolic compounds (TFC); Growth of strain 1 (Cq103) and strain 2 (Cq8); aflatoxin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> production of strains 1 and 2 (AB<sub>1</sub> strain 1, AB<sub>2</sub> strain 1, AB<sub>1</sub> strain 2 and AB<sub>2</sub> strain 2) at 250 mg/L concentration of the extracts and the phenolic compounds identified (Table 2).

#### 4. Conclusions

The results obtained in the present study are of great importance to promote the use of new natural antifungal compounds that inhibit the production of aflatoxins and that have been obtained from the natural resources of the Dehesa, fomenting respect for the environment by avoiding the use of chemical fungicides.

Extracts obtained from plants of the *Quercus ilex* genus were very useful in inhibiting the production of aflatoxin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> produced by two strains of *A. flavus*. This extract was one of the extracts in which a greater number of different compounds were identified and also had a higher concentration of phenolic compounds than *Ulmus sp.*

Furthermore, in this study, it has been demonstrated that the compound composition of the extracts is of vital importance for antifungal activity. In this sense, the compounds identified from the leaves of *Quercus ilex* and *Ulmus sp.* are the ones that may be the most effective to use as potential antifungals.

The gene expression studies involved in the aflatoxin synthesis pathway to determine the production were not effective as they were performed at the end of the trial, and, probably, these genes were expressed earlier.

Consequently, the results obtained are very promising, but future studies are needed to determine whether pure phenolic compounds are the only ones responsible for the antifungal activity of *Quercus ilex* and *Ulmus sp.* and to verify the mechanism of action of these compounds.

**Author Contributions:** Conceptualization, R.C. and M.J.B.; methodology, F.R.B., I.G., R.C. and M.J.B.; formal analysis, F.R.B., I.G., B.P. and A.V.M.; investigation, F.R.B. and A.V.M.; resources, B.P. and A.V.M.; data management, R.C. and M.J.B.; writing—original draft preparation, R.C. and M.J.B.; writing—review and editing, R.C. and M.J.B.; visualization, B.P.; supervision, M.J.B.; funding acquisition, R.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Junta de Extremadura with the projects IB16158 and GR21180.

**Data Availability Statement:** Data is contained within the article.

**Acknowledgments:** The authors are grateful to M. Cabrero and J. Hernández Barreto for technical assistance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Christaki, E.; Bonos, E.; Giannenas, I.; Florou-Paneri, P. Aromatic plants as a source of bioactive compounds. *Agriculture* **2012**, *2*, 228–243. [[CrossRef](#)]
2. Ekren, S.; Yerlikaya, O.; Tokul, H.E.; Akpınar, A.; Açu, M. Chemical composition, antimicrobial activity and antioxidant capacity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2013**, *7*, 383–388. [[CrossRef](#)]
3. Tardío, J.; Pardo-de-Santayana, M.; Morales, R. Ethnobotanical review of wild edible plants in Spain. *Bot. J. Linn. Soc.* **2006**, *152*, 27–71. [[CrossRef](#)]
4. Boy, F.R.; Casquete, R.; Martínez, A.; Córdoba, M.G.; Ruíz-Moyano, S.; Benito, M.J. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of phenolic compounds obtained from native plants by different extraction methods. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 2475. [[CrossRef](#)]
5. Taib, M.; Rezzak, Y.; Bouyazza, L.; Lyoussi, B. Medicinal uses, phytochemistry, and pharmacological activities of *Quercus* species. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2020**, *2020*, 1920683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Guimarães, R.; Barros, L.; Carvalho, A.M.; Sousa, M.J.; Morais, J.S.; Ferreira, I.C.F.R. Aromatic plants as a source of important phytochemicals: Vitamins, sugars and fatty acids in *Cistus ladanifer*, *Cupressus lusitanica* and *Eucalyptus gunnii* leaves. *Ind. Crops Prod.* **2009**, *30*, 427–430. [[CrossRef](#)]
7. Durazzo, A.; Lucarini, M.; Souto, E.B.; Cicala, C.; Caiazzo, E.; Izzo, A.A.; Novellino, E.; Santini, A. Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytother. Res.* **2019**, *33*, 2221–2243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Pitt, J.I.; Hocking, A.D. *Fungi and Food Spoilage*; Springer: New York, NY, USA, 2009; Volume 519, p. 388.
9. Magan, N.; Olsen, M. *Mycotoxins in Food: Detection and Control*; Woodhead Publishing: Sawston, UK, 2004.
10. Pereira, C.; Cunha, S.C.; Fernandes, J.O. Mycotoxins of concern in children and infant cereal food at European level: Incidence and bioaccessibility. *Toxins* **2022**, *14*, 488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Bashiry, M.; Javanmardi, F.; Sadeghi, E.; Shokri, S.; Hossieni, H.; Oliveira, C.A.; Khaneghah, A.M. The prevalence of aflatoxins in commercial baby food products: A global systematic review, meta-analysis, and risk assessment study. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *114*, 100–115. [[CrossRef](#)]
12. Xing, Y.; Ouyang, Q.; Wang, S.; Zhou, X. Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, and M1 in dairy products by high-performance liquid chromatography/fluorescence. *New J. Chem.* **2017**, *41*, 9840–9846. [[CrossRef](#)]
13. Kortei, N.K.; Annan, T.; Akonor, P.T.; Richard, S.A.; Annan, H.A.; Kyei-Baffour, V.; Esua-Amofo, P. The occurrence of aflatoxins and human health risk estimations in randomly obtained maize from some markets in Ghana. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 4295. [[CrossRef](#)]
14. Pickova, D.; Ostry, V.; Toman, J.; Malir, F. Aflatoxins: History, significant milestones, recent data on their toxicity and ways to mitigation. *Toxins* **2021**, *13*, 399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Bhardwaj, K.; Adunphatcharaphon, S.; Banerjee, K.; Elliott, C.; Petchkongkaew, A.; Kolawole, O. A Review of The Fundamental Factors and Processes Leading to The Accumulation of Aflatoxins in Cereal Crops. *Preprints.org* **2022**, 2022010400. [[CrossRef](#)]
16. Jallow, A.; Xie, H.; Tang, X.; Qi, Z.; Li, P. Worldwide aflatoxin contamination of agricultural products and foods: From occurrence to control. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2021**, *20*, 2332–2381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Tian, F.; Chun, H.S. Natural products for preventing and controlling aflatoxin contamination of food. In *Aflatoxin-Control, Analysis, Detection and Health Risks*; Abdur'uf, L.B., Ed.; IntechOpen Limited: London, UK, 2017; pp. 13–44. [[CrossRef](#)]
18. Georgianna, D.R.; Payne, G.A. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: From gene to genome. *Fungal Genet. Biol.* **2009**, *46*, 113–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Casquete, R.; Benito, M.J.; Aranda, E.; Martín, A.; Ruiz-Moyano, S.; Córdoba, M.G. Gene expression of *Aspergillus flavus* strains on a cheese model system to control aflatoxin production. *J. Dairy Sci.* **2019**, *102*, 7765–7772. [[CrossRef](#)]
20. Peromingo, B.; Rodríguez, M.; Delgado, J.; Andrade, M.J.; Rodríguez, A. Gene expression as a good indicator of aflatoxin contamination in dry-cured ham. *Food Microbiol.* **2017**, *67*, 31–40. [[CrossRef](#)]
21. Wettasinghe, M.; Shahidi, F. Evening primrose meal: A source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1801–1812. [[CrossRef](#)]
22. Casquete, R.; Benito, M.J.; Córdoba, M.G.; Ruiz-Moyano, S.; Martín, A. The growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* strains on a cheese model system are influenced by physicochemical factors. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 6987–6996. [[CrossRef](#)]

23. Abu-Orabi, S.T.; Al-Qudah, M.A.; Saleh, N.R.; Bataineh, T.T.; Obeidat, S.M.; Al-Sheraideh, M.S.; Lahham, J.N. Antioxidant activity of crude extracts and essential oils from flower buds and leaves of *Cistus creticus* and *Cistus salvifolius*. *Arab. J. Chem.* **2020**, *13*, 6256–6266. [[CrossRef](#)]
24. Sánchez-Gutiérrez, M.; Gómez-García, R.; Carrasco, E.; Bascón-Villegas, I.; Rodríguez, A.; Pintado, M. *Quercus ilex* leaf as a functional ingredient: Polyphenolic profile and antioxidant activity throughout simulated gastrointestinal digestion and antimicrobial activity. *J. Funct. Foods* **2022**, *91*, 105025. [[CrossRef](#)]
25. Wojdyło, A.; Oszmiański, J.; Czemerys, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.* **2007**, *105*, 940–949. [[CrossRef](#)]
26. Rababah, T.M.; Ereifej, K.I.; Esoh, R.B.; Al-u'datt, M.H.; Alrababah, M.A.; Yang, W. Antioxidant activities, total phenolics and HPLC analyses of the phenolic compounds of extracts from common Mediterranean plants. *Nat. Prod. Res.* **2011**, *25*, 596–605. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Bensid, A.; El Abed, N.; Houicher, A.; Regenstein, J.M.; Özogul, F. Antioxidant and antimicrobial preservatives: Properties, mechanism of action and applications in food—A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022**, *62*, 2985–3001. [[CrossRef](#)]
28. Abbaszadeh, S.; Sharifzadeh, A.; Shokri, H.; Khosravi, A.R.; Abbaszadeh, A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *J. Mycol. Med.* **2014**, *24*, e51–e56. [[CrossRef](#)]
29. Faustino, M.V.; Pinto, D.C.; Gonçalves, M.J.; Salgueiro, L.; Silveira, P.; Silva, A.M. *Calendula* L. species polyphenolic profile and in vitro antifungal activity. *J. Funct. Foods* **2018**, *45*, 254–267. [[CrossRef](#)]
30. Price, M.S.; Yu, J.; Nierman, W.C.; Kim, H.; Pritchard, B.; Jacobus, C.A.; Bhatnagar, D.; Cleveland, T.E.; Payne, G.A. The aflatoxin pathway regulator AflR induces gene transcription inside and outside of the aflatoxin biosynthetic cluster. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, *255*, 275–279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Bernáldez, V.; Cordoba, J.J.; Magan, N.; Peromingo, B.; Rodríguez, A. The influence of ecophysiological factors on growth, *aflR* gene expression and aflatoxin B1 production by a type strain of *Aspergillus flavus*. *LWT-Food Sci. Technol.* **2017**, *83*, 283–291. [[CrossRef](#)]
32. Medina, A.; Schmidt-Heydt, M.; Rodríguez, A.; Parra, R.; Geisen, R.; Magan, N. Impacts of environmental stress on growth, secondary metabolite biosynthetic gene clusters and metabolite production of xerotolerant/xerophilic fungi. *Curr. Genet.* **2015**, *61*, 325–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



## **CAPÍTULO 3**

---





International Journal of  
*Environmental Research  
and Public Health*



an Open Access Journal by MDPI

## Antimicrobial Properties of Essential Oils Obtained from Autochthonous Aromatic Plants

Francisco Ramiro Boy; María José Benito; María de Guía Córdoba; Alicia Rodríguez; Rocío Casquete

*Int. J. Environ. Res. Public Health* 2023, Volume 20, Issue 3, 1657







Article

# Antimicrobial Properties of Essential Oils Obtained from Autochthonous Aromatic Plants

Francisco Ramiro Boy, María José Benito \*, María de Guía Córdoba , Alicia Rodríguez and Rocío Casquete

Nutrición y Bromatología, Instituto Universitario de Investigación en Recursos Agrarios (INURA), Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de Extremadura, 06007 Badajoz, Spain

\* Correspondence: mjbenito@unex.es

**Abstract:** The aim of this work was to determine the antimicrobial activity of the essential oils of six plants widely distributed in the Dehesa of Extremadura, such as *Calendula officinalis*, *Cistus ladanifer*, *Cistus salviifolius*, *Cistus multiflorus*, *Lavandula stoechas*, and *Rosmarinus officinalis*. The content of total phenolic compounds (TPC) and the antimicrobial activity of the essential oils against pathogenic and spoilage bacteria and yeasts as well as aflatoxin-producing molds were determined. A great variability was observed in the composition of the essential oils obtained from the six aromatic plants. The *Cistus ladanifer* essential oil had the highest content of total phenols (287.32 ppm), followed by the *Cistus salviifolius* essential oil; and the *Rosmarinus officinalis* essential oil showed the lowest amount of these compounds. The essential oils showed inhibitory effects on the tested bacteria and also yeasts, showing a maximum inhibition diameter of 11.50 mm for *Salmonella choleraesuis* and *Kregeroanrija fluxuum* in the case of *Cistus ladanifer* and a maximum diameter of 9 mm for *Bacillus cereus* and 9.50 mm for *Priceomyces carsonii* in the case of *Cistus salviifolius*. The results stated that antibacterial and antiyeast activity is influenced by the concentration and the plant material used for essential oil preparation. In molds, aflatoxin production was inhibited by all the essential oils, especially the essential oils of *Cistus ladanifer* and *Cistus salviifolius*. Therefore, it can be concluded that the essential oils of native plants have significant antimicrobial properties against pathogenic and spoilage microorganisms, so they could be studied for their use in the industry as they are cheap, available, and non-toxic plants that favor the sustainability of the environment of the Dehesa of Extremadura.

**Keywords:** essential oils; Dehesa plants; phenolic compounds; antimicrobial activity; aflatoxins



**Citation:** Boy, F.R.; Benito, M.J.; Córdoba, M.d.G.; Rodríguez, A.; Casquete, R. Antimicrobial Properties of Essential Oils Obtained from Autochthonous Aromatic Plants. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2023**, *20*, 1657. <https://doi.org/10.3390/ijerph20031657>

Academic Editor: David Rodríguez-Lázaro

Received: 23 December 2022

Revised: 11 January 2023

Accepted: 13 January 2023

Published: 17 January 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The use in the pharmaceutical and food industry of medicinal and aromatic plants is recognized throughout the world [1], and these plants are the source of a wide variety of chemical compounds that are synthesized to perform important biological functions for the plants themselves [2]. In the Dehesa of Extremadura, many species of plants considered to be medicinal can be encountered, being relevant in the pharmaceutical sector [3,4]. Some of these medicinal plants include *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula stoechas* [5] and *Cistus ladanifer*, *Cistus multiflorus*, and *Cistus salviifolius* [6]. Besides their medicinal properties, these are aromatic plants, which has made them excellent condiments for foods for many years. One of the most important benefits of these plants is their antimicrobial activity, and it has been shown that this is mainly because of the phenolic compounds contained in their flowers, stems, leaves, seeds, and fruits [7,8].

To guarantee the microbial safety of food, consumers are demanding “healthier” and eco-friendly food production systems, encouraging the development of novel biopreservation strategies based on the use of natural antimicrobial agents in place of synthetic preservatives. These concerns and the growing demand for organic foods are driving an increasing interest in natural antimicrobials, which show an effective antagonistic effect

against a wide range of undesirable microorganisms in food. According to different researchers, the growth of pathogenic and spoilage microorganisms can be strongly reduced or inhibited by several plant extracts, some of these plants being native to the Dehesa of Extremadura [7,9]. Phenolic compounds seem to be the main substances responsible for the antimicrobial effect, and this has been mainly associated with the presence of hydroxyl groups in their molecules. In fact, the position and number of these groups, i.e., the hydroxylation pattern, on the phenolic ring appears to be linked to the importance of the inhibitory properties exerted by phenolic compounds on microorganisms [10,11]. Thus, a bactericidal effect has been demonstrated against food-borne bacteria, such as *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., and *Escherichia coli* [12–14]; spoilage yeasts [9]; and food pathogenic molds [15].

Most of the natural alternatives to synthetic food preservatives explored in recent studies are plant extracts in crude or purified form, mainly essential oils or pure compounds, most of which have been used since ancient times. These have become the focus of interest for direct application in food products [16]. Essential oils are the plant extracts that have been most studied for their antimicrobial activity.

Essential oils are aromatic oily liquids obtained from plant material (flowers, buds, seeds, leaves, twigs, bark, herbs, wood, fruits, and roots). They can be obtained by different methods, but the steam distillation method is most commonly used for the commercial production of essential oils [17]. Other extraction methods, such as extraction using liquid carbon dioxide at low temperature and high pressure, produce a more natural compound and organoleptic profile, but this is much more expensive and laborious [18]. For this reason, hydrodistillation is the most used method, although the high extraction temperature may cause some volatile components to be lost and this may also influence antimicrobial properties. This seems to be confirmed by the fact that herbal essential oils extracted with hexane have been shown to exhibit higher antimicrobial activity than the corresponding steam-distilled essential oils [19]. Essential oils are volatile and should therefore be stored in airtight containers and in the dark to avoid changes in their composition, as they are susceptible to damage by factors such as light, heat, oxidation, and hydration.

Essential oils may have more than 60 individual components, depending on the species and subspecies of the plant from which they are obtained, and the major components may constitute up to 85% of an essential oil, while other components are present only in trace form [18]. They contain cyclic and acyclic compounds of different types, such as alcohols, esters, phenols, ketones, lactones, aldehydes, and oxides. According to different authors, phenolic compounds are mainly responsible for antibacterial properties, as mentioned before; however, there is evidence that minor compounds play a key role in antibacterial activity, possibly by producing a synergistic effect among other compounds [20]. It is therefore logical to think that considering the great variety of chemical compounds present in essential oils, their antimicrobial activity is not attributable to a specific mechanism of action but to the combined action of several of them on different parts of the microbial cell.

Essential oils are effective against molds, yeasts, and bacteria; however, different levels of susceptibility have been observed for each of group probably due to the difference in their membranes, as occurs with Gram-negative and Gram-positive bacteria [21]. There are also different studies on the inhibition of mold growth; however, there are not so many on the influence on mycotoxin production [22].

For this reason, although there are a large number of studies on essential oils obtained from aromatic plants, there are few reports focused on native plants of the Dehesa of Extremadura. Therefore, this study aims to evaluate essential oils obtained from different native plants of the Dehesa of Extremadura, which have been scarcely studied, for their antimicrobial activity against pathogenic bacteria, spoilage yeasts, and aflatoxin-producing molds.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Plant Material and Essential Oil Preparation

For the development of this work, different parts, as specified by Boy et al. [9], of 6 plant species (flowers from *Calendula officinalis*; stems from *Cistus ladanifer*, *Cistus multiflorus*, *Cistus salviifolius*, and *Lavandula stoechas*; and leaves from *Rosmarinus officinalis*) were used. They were collected in the region of Extremadura (Spain) by a local company in February 2021. The samples were packed in plastic bags under vacuum and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until they were used to obtain the essential oils. The essential oils were obtained by steam distillation of the aerial parts, flowers, stems, and leaves of wild plants. The essential oils were obtained according to the procedure described in the European Pharmacopoeia, using 100 g of dried plant material, completely immersed in distilled water and subjected to hydrodistillation for 3 h, using a Clevenger-type apparatus, in which the essential oils were obtained as final products. All essential oils were stored in dark glass bottles at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  until further testing.

### 2.2. Bacterial, Yeasts, and Mold Strains

Pathogenic and spoilage food-borne bacteria, yeasts, and molds in food were used to carry out the study. The pathogenic bacteria were *Staphylococcus aureus* CECT 976, *Bacillus cereus* CECT 131, *Listeria monocytogenes* CECT 911, *Listeria innocua* CECT 910, *Salmonella choleraesuis* CECT 4395, and *Escherichia coli* CECT 4267, which were obtained from the Spanish Type Culture Collection (CECT). For spoilage yeasts, *Candida boidinii* CECT 11153, *Priceomyces carsonii* CECT 10230, *Kregeraanrija fluxuum* CECT 12787, and *Zygosacharomyces bailii* CECT 11043 were used, also collected from the Spanish Type Culture Collection (CECT). Finally, 2 strains of *Aspergillus flavus* strains 1 and strain 2 (CQ8 and CQ103) that produce aflatoxins B<sub>1</sub> and B<sub>1</sub> isolated from plants [23] were used.

### 2.3. Total Phenolic Content

The total phenolic content was determined using Folin–Ciocalteu reagent according to the method described by Wettasinghe and Shahidi [24] in a UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, USA). As a standard, gallic acid was used. Results are expressed in mg/L. All experiments were performed in triplicate.

### 2.4. Antimicrobial Activity against Bacteria and Yeasts

Suspensions of target cells (Section 2.2) were obtained from cultures incubated overnight at 37 and 25 °C on brain heart infusion agar (BHI; Oxoid, Madrid, Spain) for bacteria and peptone agar and dextrose extract (YPD; Oxoid, Madrid, Spain) for yeasts. Strains were transferred to a peptone water sterile solution (Scharlab, Barcelona, Spain) to reach a turbidity level equivalent to 0.5 McFarland standards after the incubation time had been completed. Next, 1 mL of each suspension was pipetted into separate sterile Petri dishes, to which was added 20 mL of melted (45 °C) BHI for bacteria and YPD for yeasts with 1% agar. Plates with 10 µL of each essential oil were spread over the surface of the plate. The plates were incubated at 37 °C for bacteria and at 25 °C for yeasts overnight, and the resulting diameter (mm) of the inhibition zone was measuring. All experiments were performed in triplicate.

### 2.5. Antimicrobial Activity against *Aspergillus Flavus* Strains

First, inocula of the two *Aspergillus flavus* strains were prepared. For this purpose, the strains were initially grown on malt extract agar (Scharlab S.L., Barcelona, Spain) at 25 °C for 10 days. A spore suspension of each strain was collected by adding 10 mL of sterile 0.05% (vol/vol) Tween 80 (Scharlab S.L.) to each mold plate and then rubbing the surface with a glass rod. The suspension formed was filtered through 2 layers of gauze. The concentration of each spore suspension was quantified using a Neubauer chamber and a microscope (Olympus CX 400, Tokyo, Japan) and adjusted to 10<sup>6</sup> spores/mL with sterile water.

For antifungal activity, potato dextrose agar (PDA; Oxoid, Madrid, Spain) plates were prepared and 100  $\mu$ L of each essential oil was added and spread over the surface of the plate. After spreading, the plates were allowed to dry under sterile conditions around a flame.

For the assay, 10  $\mu$ L of the spore suspension of each mold was inoculated in a central spot of the plate. The strains were inoculated separately. Sterile water was used as a negative control. Plates were incubated at 25 °C for 10 days.

### 2.5.1. Assessment of Growth

The diameter of the growing colonies was measured in 2 perpendicular directions every 24 h during the 10 days. The average of both diameters was recorded as the growth measurement for each strain. The mean colony diameter (mm) of each experiment and condition was plotted against incubation time (days) to establish growth curves for each fungal strain, as described by Casquete et al. [23]. The colony growth rate ( $\mu$  (mm/days)) was determined from the slope of the growth curve.

### 2.5.2. Aflatoxin Determination

Mycelia were harvested at 10 days, and five 4-mm-diameter agar plugs were extracted from each fungal colony culture in 2 mL microcentrifuge tubes. For extraction for aflatoxin quantification, the procedure of Casquete et al. [23] was followed. Aflatoxin analysis was performed with an Agilent 1100 series HPLC system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a diode array detector (Agilent G1315B) set at 360 nm and using a C18 HPLC column (250  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m particle size; Supelco, Bellefonte, PA, USA). A calibration curve was plotted for aflatoxins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Results are expressed as ppb.

### 2.6. Statistical Analysis

Statistical processing of data was performed using SPSS for Windows, version 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Statistical descriptions of the results were established, and differences, both between and within groups, were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) and explained using Tukey's honest significant difference test ( $p < 0.05$ ).

## 3. Results and Discussion

The total phenolic compounds of the essential oils obtained from the different plants used in the study are presented in Table 1.

**Table 1.** Total phenolic compounds (mg/L) of essential oils obtained from aromatic plants.

Essential Oil	Total Phenolic Content (mg/L)		
	Mean		SD <sup>1</sup>
<i>Calendula officinalis</i>	54.26	±	0.77 <sup>c</sup>
<i>Cistus ladanifer</i>	287.32	±	8.10 <sup>a</sup>
<i>Cistus salvifolius</i>	228.64	±	16.36 <sup>b</sup>
<i>Cistus multiflorus</i>	40.68	±	7.05 <sup>c</sup>
<i>Lavandula stoechas</i>	44.37	±	1.81 <sup>c</sup>
<i>Rosmarinus officinalis</i>	10.66	±	5.25 <sup>d</sup>

<sup>1</sup> SD: standard deviation. <sup>a-d</sup> Values with different superscript letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) between plants.

In general, it was observed that the *Cistus ladanifer* essential oil showed the highest amount of phenolic compounds, 287.32 mg/L, followed by the *Cistus salvifolius* essential oil; and the *Rosmarinus officinalis* essential oil showed the lowest amount of these compounds.

Boy et al. [9] studied the extraction of phenolic compounds from these plants using two different methods of agitation and ultrasound and found that *Cistus ladanifer* and *Cistus salvifolius* stems show the highest amounts of phenolic compounds using the two

extraction methods compared to *Calendula officinalis* and *Rosmarinus officinalis*. However, *Cistus multiflorus* and *Lavandula stoechas* also showed high amounts of phenolic compounds using these two methods in contrast to those in the essential oils of this study. The extraction method, therefore, significantly influences the composition of phenolic compounds, as suggested by different researchers [25].

Table 2 shows the antimicrobial effect of the essential oils studied on the six pathogenic bacteria analyzed: *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, and *Salmonella choleraesuis*.

**Table 2.** Activity of different essential oils obtained from aromatic plants against pathogenic bacteria, expressed as the diameter of inhibition zones in mm.

Essential Oil	<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Listeria innocua</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Bacillus cereus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Salmonella choleraesuis</i>	
	Mean	SD <sup>1</sup>	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
<i>Calendula officinalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cistus ladanifer</i>	9.50	± 0.71 <sup>a</sup>	9.50	± 0.71 <sup>a</sup>	8.00	± 0.24 <sup>a</sup>	9.00	± 1.51 <sup>a</sup>	10.00	± 0.00 <sup>a</sup>	11.50	± 0.71 <sup>a</sup>
<i>Cistus salvifolius</i>	3.50	± 4.95 <sup>b</sup>	7.50	± 0.71 <sup>b</sup>	6.75	± 0.35 <sup>b</sup>	9.00	± 3.24 <sup>a</sup>	7.50	± 0.71 <sup>b</sup>	6.50	± 0.71 <sup>b</sup>
<i>Cistus multiflorus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lavandula stoechas</i>	-	-	7.50	± 0.71 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rosmarinus officinalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup> SD: standard deviation; -: no inhibition; <sup>a,b</sup>: statistical differences ( $p < 0.05$ ) found between the values are indicated by different superscript letters.

It can be observed that *Cistus ladanifer* and *Cistus salvifolius* essential oils presented a greater inhibition capacity on the six pathogenic bacteria studied ( $p < 0.05$ ), showing a maximum inhibition diameter of 11.50 mm for *Salmonella choleraesuis* in the case of *Cistus ladanifer* and a maximum diameter of 9 mm for *Bacillus cereus* in the case of *Cistus salvifolius*. The *Lavandula stoechas* essential oil only showed a greater inhibition capacity against *Listeria innocua*—7.50 mm as the diameter of inhibition. The other three essential oils, from *Calendula officinalis*, *Cistus multiflorus*, and *Rosmarinus officinalis*, did not show activity against any of the pathogenic bacteria studied.

These results agree partially with the essential oils that contained a higher concentration of phenolic compounds, which were those of *Cistus ladanifer* and *Cistus salvifolius*. However, this did not occur in the case of *Lavandula stoechas*, which presented significant activity against *Listeria innocua* and had a low concentration of phenolic compounds in the essential oil. Consequently, this supports the fact that not only the concentration of phenolic compounds present in the essential oil is important but also the nature of the compounds present and their synergies [20]. Gram-positive bacteria are known to be more sensitive to natural extracts, and Gram-negative bacteria are reported to be less sensitive [21]. However, exceptions have been reported in which Gram-negative bacteria were found to be more susceptible than Gram-positive bacteria [9,26,27], highlighting the susceptibility of *Salmonella choleraesuis* and *Escherichia coli*. In contrast, the genus *Cistus* has been remarked by some authors for its antimicrobial capacity, after testing the antimicrobial activity of different species of the genus *Cistus* and observing greater activity against diverse pathogenic bacterial species and higher activity against Gram-negative ones [9,27]. The essential oil obtained from *Cistus multiflorus* did not show activity against any of the evaluated bacteria, which is in agreement with the work of other authors [9]. *Calendula officinalis* and *Rosmarinus officinalis* essential oils also showed no activity, although the antimicrobial effects of these plant extracts against bacteria have been reported at high concentrations [28,29].

According to the results, it is possible to conclude that the antibacterial activity may be influenced by the concentration and the plant material used for essential oil preparation.

The antimicrobial effect of the essential oils on the four spoilage yeasts was also studied (Table 3).

**Table 3.** Activity of different essential oils obtained from aromatic plants against yeasts, expressed as the diameter of inhibition zones in mm.

Essential Oil	<i>Candida boidinii</i>		<i>Kregervanrija fluxuum</i>			<i>Priceomyces carsonii</i>		<i>Zygosacharomyces bailii</i>		
	Mean	SD <sup>1</sup>	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD		
<i>Calendula officinalis</i>	-	-	7.50	± 0.71 <sup>b</sup>	10.50	± 0.71 <sup>a</sup>	-	-		
<i>Cistus ladanifer</i>	10.50	± 0.71 <sup>a</sup>	11.50	± 0.71 <sup>a</sup>	10.50	± 0.71 <sup>a</sup>	10.00	± 0.00 <sup>a</sup>		
<i>Cistus salviifolius</i>	7.50	± 0.71 <sup>b</sup>	7.50	± 0.71 <sup>b</sup>	9.50	± 0.71 <sup>a</sup>	7.50	± 0.71 <sup>b</sup>		
<i>Cytisus multiflorus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>Lavandula stoechas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>Rosmarinus officinalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-		

<sup>1</sup> SD: standard deviation; -: no inhibition; <sup>a,b</sup>: statistical differences ( $p < 0.05$ ) found between the values are indicated by different superscript letters.

In this case, *Cistus ladanifer* and *Cistus salviifolius* essential oils also showed the greatest inhibitory capacity against the four yeasts studied, with an inhibition diameter between 11.50 and 10 mm for *Cistus ladanifer* and 9.50 and 7.50 mm for *Cistus salviifolius*, according to the greater concentration of phenolic compounds in these essential oils. However, the *Calendula officinalis* essential oil was active against the yeasts *Kregervanrija fluxuum*, with an inhibition diameter of 7.50 mm, and *Priceomyces carsonii*, with an inhibition diameter of 10.50 mm, and this plant's essential oil had a low concentration of phenolic compounds. These results are in agreement with those obtained previously in studies with extracts obtained from *Cistus* plants.

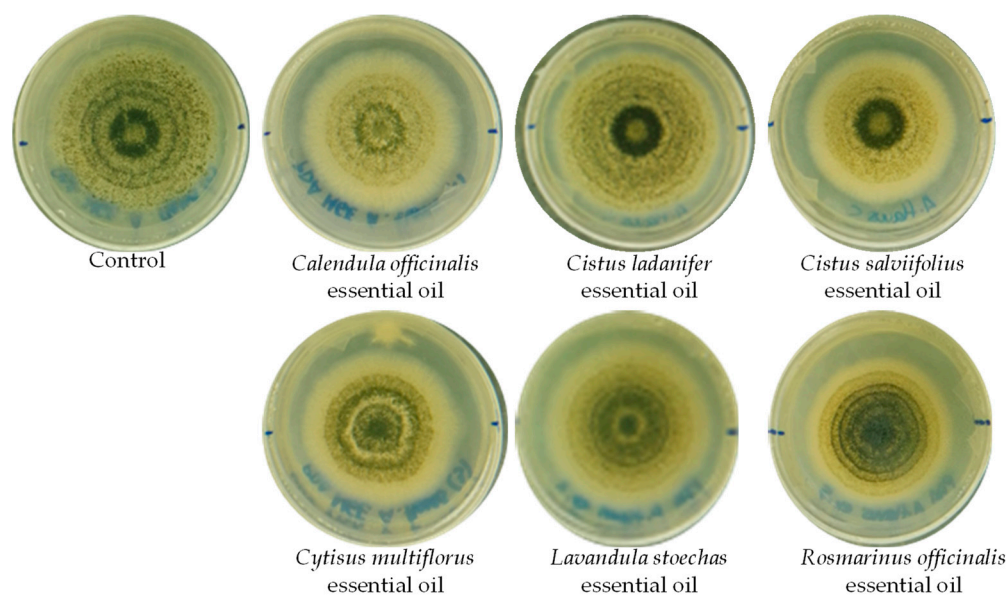
Comparing the results presented in Tables 2 and 3, it was observed that the essential oil of *Calendula officinalis* did not show activity against bacteria but did show activity against yeasts in contrast with the essential oil of *Lavandula stoechas*. Therefore, as in the case of antibacterial activity, the activity against yeasts is affected by the concentration of phenolic compounds as well as by the plant material used for essential oil preparation.

There are different studies in the bibliography that highlight the relevance of the extracts and oils of *Lavandula stoechas* and *Rosmarinus officinalis* for yeasts [30,31]; however, as previously mentioned in the case of bacteria, the activity takes place at high concentrations of phenolic compounds.

Finally, the essential oils were tested for their influence on the growth of two strains of *Aspergillus flavus* and their effect on aflatoxin production. This assay was carried out for 10 days of incubation at 25 °C. Figure 1 shows the final growth of strain 1 in PDA medium in the presence of the different essential oils after 10 days of incubation and the control without the addition of any essential oil. It can be observed that at the end of the study, *A. flavus* grew with a similar growth rate in the presence of the essential oils tested. This also was observed in the case of strain 2. The final growths were between 4 and 3.3 cm diameter at 10 days for strain 1 and between 4 and 5 cm diameter for strain 2.

Regarding the growth rate results, both strains of *Aspergillus flavus* grew at a slower rate in the presence of the essential oils and significantly in the presence of *Cistus multiflorus* and *Rosmarinus officinalis* essential oils for strain 1 and in the presence of all essential oils except *Lavandula stoechas* for strain 2 (Table 4).

Although the essential oils assayed showed a similar effect on *Aspergillus flavus* growth, significant differences were observed in aflatoxin production. For aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) production, the essential oils of *Cistus ladanifer* and *Cistus salviifolius* had the greatest effect, followed by the essential oils of *Cistus multiflorus*, *Lavandula stoechas*, *Rosmarinus officinalis*, and, finally, *Calendula officinalis* (Table 5).



**Figure 1.** Growth of *Aspergillus flavus* strain 1 in PDA medium after 10 days of incubation in the presence of different essential oils.

**Table 4.** Growth rate (mm/day) of *A. flavus* strains 1 and 2 that produce aflatoxins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> obtained over 10 days of incubation at 25 °C.

Essential Oil	<i>A. flavus</i> Strain 1			<i>A. flavus</i> Strain 2		
	Mean		SD <sup>1</sup>	Mean		SD
Control	4.07	±	0.15 <sup>a</sup>	5.03	±	0.35 <sup>a</sup>
<i>Calendula officinalis</i>	3.68	±	0.26 <sup>a,b</sup>	4.32	±	0.19 <sup>b</sup>
<i>Cistus ladanifer</i>	3.83	±	0.13 <sup>a,b</sup>	4.48	±	0.22 <sup>b</sup>
<i>Cistus salviifolius</i>	3.73	±	0.10 <sup>a,b</sup>	4.26	±	0.09 <sup>b</sup>
<i>Cistus multiflorus</i>	3.38	±	0.03 <sup>b</sup>	4.04	±	0.37 <sup>b</sup>
<i>Lavandula stoechas</i>	3.69	±	0.12 <sup>a,b</sup>	4.81	±	0.25 <sup>a,b</sup>
<i>Rosmarinus officinalis</i>	3.42	±	0.03 <sup>b</sup>	4.16	±	0.10 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> SD: standard deviation; <sup>a,b</sup>: values with different superscript letters in the same column indicate statistical differences ( $p < 0.05$ ).

**Table 5.** Production of aflatoxins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> (ppb) of *Aspergillus flavus* strains 1 and 2 determined in samples with different essential oils at the end of incubation.

Essential Oil	<i>Aspergillus flavus</i> Strain 1				<i>Aspergillus flavus</i> Strain 2			
	Aflatoxin B <sub>1</sub>		Aflatoxin B <sub>2</sub>		Aflatoxin B <sub>1</sub>		Aflatoxin B <sub>2</sub>	
	Mean	SD <sup>1</sup>	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Control	1406.93	± 406.06 <sup>a</sup>	77.60	± 12.15 <sup>a</sup>	750.28	± 406.06 <sup>a</sup>	78.34	± 11.08 <sup>a</sup>
<i>Calendula officinalis</i>	516.91	± 227.43 <sup>b</sup>	7.80	± 1.26 <sup>b</sup>	636.55	± 227.43 <sup>b</sup>	16.01	± 9.45 <sup>b</sup>
<i>Cistus ladanifer</i>	118.35	± 48.96 <sup>c</sup>	15.23	± 7.03 <sup>b</sup>	259.75	± 48.96 <sup>c</sup>	10.23	± 4.89 <sup>b</sup>
<i>Cistus salviifolius</i>	164.94	± 68.31 <sup>c</sup>	1.70	± 0.02 <sup>c</sup>	129.71	± 68.31 <sup>c</sup>	2.92	± 0.36 <sup>b</sup>
<i>Cistus multiflorus</i>	309.78	± 52.93 <sup>b</sup>	5.65	± 1.26 <sup>b</sup>	342.46	± 52.93 <sup>b,c</sup>	4.61	± 1.20 <sup>b</sup>
<i>Lavandula stoechas</i>	313.00	± 45.29 <sup>b</sup>	10.02	± 1.26 <sup>b</sup>	335.63	± 45.29 <sup>b,c</sup>	8.36	± 4.12 <sup>b</sup>
<i>Rosmarinus officinalis</i>	268.47	± 84.90 <sup>b,c</sup>	9.98	± 2.10 <sup>b</sup>	393.61	± 84.90 <sup>b,c</sup>	9.98	± 2.10 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> SD: standard deviation; <sup>a-c</sup>: values with different superscript letters in the same column indicate statistical differences ( $p < 0.05$ ).

The production of aflatoxin B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>) in both strains was lower than that of AFB<sub>1</sub>. Although significant differences were observed with respect to the control, for AFB<sub>2</sub>, no

differences were detected with respect to the effect of the different essential oils, probably because as less aflatoxin is produced, the impact may be more difficult to evaluate.

There are different studies highlighting the ability of plant essential oils to inhibit the growth of molds. Wan et al. [22] investigated the effect of the nanoemulsions of selected essential oils (thyme, lemongrass, cinnamon, peppermint, and clove) on antifungal activity and mycotoxin inhibitory activity using two strains of *Fusarium graminearum*. Regarding the inhibition of mycotoxin production, significant inhibitory activity was observed and the same essential oils presented significant differences in the inhibition of mycotoxin production in the two strains of *Fusarium graminearum*, which coincides with our results, since we also obtained differences in the inhibition of the two strains by the same essential oils. The antifungal activity of widely known essential oils, such as oregano (*Origanum vulgare*) [32], cinnamon [33], clove [34], peppermint, and eucalyptus [35] has also been tested.

Few research works have focused on the impact of essential oils on mycotoxin production, and widely available native plants, such as those of the genus *Cistus*, as in this work, have proved to be the ones with the greatest effect.

#### 4. Conclusions

In general, when the different essential oils used were compared, it was observed that *Cistus ladanifer* and *Cistus salvifolius* essential oils had the highest amount of phenolic compounds, and this may be one of the reasons why these essential oils showed higher antimicrobial activity against all the microorganisms used, including bacteria, yeasts, and molds. However, against the pathogenic bacteria tested, the essential oil of *Lavandula stoechas* showed significant activity against *Listeria innocua* and had a low concentration of phenolic compounds. Something similar occurred with the essential oil of *Calendula officinalis*, which was also active against two of the yeasts tested (*Kregervanrija fluxuum* and *Priceomyces carsonii*), although this essential oil also had a low concentration of phenolic compounds. In the case of experiments on the inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production, all the essential oils inhibited production, especially the essential oils of *Cistus ladanifer* and *Cistus salvifolius*, followed by the other four essential oils. Thus, the activities observed were different in the assays, depending on the microorganisms studied, which corroborates the fact that microorganisms are affected by the concentration of phenolic compounds as well as by the plant material used for the preparation of the essential oil.

Therefore, it can be concluded that the essential oils of native plants have significant antimicrobial properties against pathogenic and spoilage microorganisms, so they could be studied for their use in the industry as they are cheap, available, and non-toxic plants that favor the sustainability of the environment of the Dehesa of Extremeña. However, future analysis of the specific chemical compounds occurring in these essential oils should be carried out using gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS).

**Author Contributions:** Conceptualization, M.J.B. and R.C.; methodology, A.R., R.C., and M.J.B.; investigation, F.R.B.; resources, F.R.B. and R.C.; formal analysis, F.R.B. and A.R.; data management, M.J.B. and R.C.; writing—original draft preparation, M.J.B. and R.C.; visualization, A.R.; writing—review and editing, R.C.; supervision, M.J.B. and M.d.G.C.; funding acquisition, M.d.G.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The study was funded by projects IB16158 and GR21180 from the Junta de Extremadura.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** For technical assistance, the authors would like to thank J. Hernández Barreto and M. Cabrero.



**Conflicts of Interest:** No conflict of interest is declared by the authors.

## References

1. Quílez, M.; Ferreres, F.; López-Miranda, S.; Salazar, E.; Jordán, M.J. Seed oil from Mediterranean aromatic and medicinal plants of the *Lamiaceae* family as a source of bioactive components with nutritional. *Antioxidants* **2020**, *9*, 510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Lubbe, A.; Verpoorte, R. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Ind. Crops Prod.* **2011**, *34*, 785–801. [[CrossRef](#)]
3. Blanco Salas, J.; Vázquez, F.M.; Alonso, D.; Gutierrez Esteban, M.; Márquez-García, F.; Chaparro, J.; Barrena, M.; Ramos, S.; Hércules, S. Recursos fitogenéticos de las dehesas extremeñas: Plantas medicinales. In *Libro de Aportaciones al V Congreso Forestal Español*; S.E.C.F. Junta de Castilla y León: Ávila, Spain, 2009.
4. Costa, D.C.; Costa, H.S.; Albuquerque, T.G.; Ramos, F.; Castilho, M.C.; Sanches-Silva, A. Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. *Trends Food Sci. Technol.* **2015**, *45*, 336–354. [[CrossRef](#)]
5. Pacheco, D.P.; Villalobos, J.R. Contribución al conocimiento de nombres vernáculos de plantas medicinales en la comarca de Zafra-Río Bodión. *Rev. De Estud. Extrem.* **2007**, *63*, 343–352.
6. Ruíz, T.T.; Escobar, G.P.; Pérez, C.J.L. La Serena y Sierras Limítrofes: Flora y Vegetación. In *Consejería de Agricultura y Medio Ambiente*; Junta de Extremadura: Mérida, Spain, 2007.
7. Bouarab Chibane, L.; Degraeve, P.; Ferhout, H.; Bouajila, J.; Oulahal, N. Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 1457–1474. [[CrossRef](#)]
8. Brewer, M.S. Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2011**, *10*, 221–247. [[CrossRef](#)]
9. Boy, F.R.; Casquete, R.; Martínez, A.; Córdoba, M.D.G.; Ruíz-Moyano, S.; Benito, M.J. Antioxidant, Antihypertensive and Antimicrobial Properties of Phenolic Compounds Obtained from Native Plants by Different Extraction Methods. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 2475. [[CrossRef](#)]
10. Oh, E.; Jeon, B. Synergistic anti-*Campylobacter jejuni* activity of fluoroquinolone and macrolide antibiotics with phenolic compounds. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1129. [[CrossRef](#)]
11. Sanhueza, L.; Melo, R.; Montero, R.; Maisey, K.; Mendoza, L.; Wilkens, M. Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0172273. [[CrossRef](#)]
12. Cáceres, M.; Hidalgo, W.; Stashenko, E.; Torres, R.; Ortiz, C. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities against pathogenic bacteria. *Antibiotics* **2020**, *9*, 147. [[CrossRef](#)]
13. Vieitez, I.; Maceiras, L.; Jachmanián, I.; Alborés, S. Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology. *J. Supercrit. Fluids* **2018**, *133*, 58–64. [[CrossRef](#)]
14. Weerakkody, N.S.; Caffin, N.; Turner, M.S.; Dykes, G.A. In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. *Food Control* **2010**, *21*, 1408–1414. [[CrossRef](#)]
15. Skendi, A.; Katsantonis, D.N.; Chatzopoulou, P.; Irakli, M.; Papageorgiou, M. Antifungal activity of aromatic plants of the *Lamiaceae* family in bread. *Foods* **2020**, *9*, 1642. [[CrossRef](#)]
16. Caroch, M.; Barreiro, M.F.; Morales, P.; Ferreira, I.C.F.R. Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2014**, *13*, 377–399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Van de Braak, S.A.A.J.; Leijten, G.C.J.J. *Essential Oils and Oleoresins: A Survey in The Netherlands and Other Major Markets in the European Union*; Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries (CBI): Rotterdam, The Netherlands, 1999; p. 116.
18. Dima, C.; Dima, S. Essential oils in foods: Extraction, stabilization, and toxicity. *Curr. Opin. Food Sci.* **2015**, *5*, 29–35. [[CrossRef](#)]
19. Packiyasothy, E.V.; Kyle, S. Antimicrobial properties of some herb essential oils. *Food Aust.* **2002**, *54*, 384–387.
20. Marino, M.; Bersani, C.; Comi, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *67*, 187–195. [[CrossRef](#)]
21. Kalemba, D.; Kunicka, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 813–829. [[CrossRef](#)]
22. Wan, J.; Zhong, S.; Schwarz, P.; Chen, B.; Rao, J. Physical properties, antifungal and mycotoxin inhibitory activities of five essential oil nanoemulsions: Impact of oil compositions and processing parameters. *Food Chem.* **2019**, *291*, 199–206. [[CrossRef](#)]
23. Casquete, R.; Benito, M.J.; Córdoba, M.G.; Ruiz-Moyano, S.; Martín, A. The growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* strains on a cheese model system are influenced by physicochemical factors. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 6987–6996. [[CrossRef](#)]
24. Wettasinghe, M.; Shahidi, F. Evening primrose meal: A source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1801–1812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Reyes-Jurado, F.; Franco-Vega, A.; Ramírez-Corona, N.; Palou, E.; López-Malo, A. Essential oils: Antimicrobial activities, extraction methods, and their modeling. *Food Eng. Rev.* **2015**, *7*, 275–297. [[CrossRef](#)]
26. Chaudhary, N.; Sabikhi, L.; Hussain, S.A.; Sathish Kumar, M.H. A comparative study of the antioxidant and ACE inhibitory activities of selected herbal extracts. *J. Herb. Med.* **2020**, *22*, 100343. [[CrossRef](#)]
27. Mahmoudi, H.; Aouadhi, C.; Kaddour, R.; Gruber, M.; Zargouni, H.; Zaouali, W.; Ben Hamida, N.; Ben Nasri, M.; Ouerghi, Z.; Hosni, K. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of two cultivated *Cistus* species from Tunisia. *J. Biosci.* **2016**, *32*, 226–237. [[CrossRef](#)]

28. Rigane, G.; Younes, S.B.; Ghazghazi, H.; Salem, R.B. Investigation into the biological activities and chemical composition of *Calendula officinalis* L. growing in Tunisia. *Int. Food Res. J.* **2013**, *20*, 3001.
29. Genena, A.K.; Hense, H.; Smânia Junior, A.; Souza, S.M.D. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*): A study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *Food Sci. Technol.* **2008**, *28*, 463–469. [[CrossRef](#)]
30. Zuzarte, M.; Gonçalves, M.J.; Cavaleiro, C.; Cruz, M.T.; Benzarti, A.; Marongiu, B.; Maxia, A.; Piras, A.; Salgueiro, L. Antifungal and anti-inflammatory potential of *Lavandula stoechas* and *Thymus herba-barona* essential oils. *Ind. Crops. Prod.* **2013**, *44*, 97–103. [[CrossRef](#)]
31. Tavassoli, S.K.; Mousavi, S.M.; Emam-Djomeh, Z.; Razavi, S.H. Chemical composition and evaluation of antimicrobial properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil. *Afr. J. Biotechnol.* **2011**, *10*, 13895–13899.
32. Bedoya-Serna, C.M.; Dacanal, G.C.; Fernandes, A.M.; Pinho, S.C. Antifungal activity of nanoemulsions encapsulating oregano (*Origanum vulgare*) essential oil: In vitro study and application in Minas Padrão cheese. *Braz. J. Microbiol.* **2018**, *49*, 929–935. [[CrossRef](#)]
33. Munhuweyi, K.; Caleb, O.J.; van Reenen, A.J.; Opara, U.L. Physical and antifungal properties of  $\beta$ -cyclodextrin microcapsules and nanofibre films containing cinnamon and oregano essential oils. *LWT* **2018**, *87*, 413–422. [[CrossRef](#)]
34. Estrada-Cano, C.; Castro, M.A.A.; Muñoz-Castellanos, L.N.A.O.A.; García-Triana, N.A.O.A.; Hernández-Ochoa, L. Antifungal activity of microcapsulated clove (*Eugenia caryophyllata*) and Mexican oregano (*Lippia berlandieri*) essential oils against *Fusarium oxysporum*. *J. Microb. Biochem. Technol.* **2017**, *9*, 567–571. [[CrossRef](#)]
35. Pandey, A.K.; Kumar, P.; Singh, P.; Tripathi, N.N.; Bajpai, V.K. Essential oils: Sources of antimicrobials and food preservatives. *Front. Microbiol.* **2017**, *7*, 2161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## **DISCUSIÓN GENERAL**

---



La importancia de las **plantas aromáticas y medicinales** es reconocida mundialmente, no sólo por sus propiedades curativas y preventivas, sino también por sus usos en la industria farmacéutica y alimentaria (Quílez et al., 2020). La **Dehesa de Extremadura** se caracteriza por ser un ecosistema con una gran biodiversidad donde se encuentran numerosas especies de plantas consideradas medicinales y de **gran importancia** en la industria farmacéutica (Blanco et al., 2009; Costa et al., 2015). Entre estas plantas medicinales se encuentran *Calendula officinalis*, *Lavandula stoechas*, *Crataegus monogyna*, *Malva sylvestris*, *Rosmarinus officinalis*, *Asparagus* sp., *Cistus ladanifer*, *C. multiflorus*, *C. albidus*, *C. salviifolius*, *Morus alba*, *Ulmus* sp., *Urginea maritima*, *Rubus ulmifolius* y *Quercus ilex* (Pacheco et al., 2007; Ruíz et al., 2007).

Además de sus **propiedades medicinales**, algunas de estas plantas son **aromáticas**, lo que las convierte en excelentes condimentos para las comidas. Sin embargo, su aroma no es el único beneficio en la comida; su naturaleza **antioxidante y antimicrobiana** también es importante. Pueden competir con antioxidantes y conservantes químicos a los que se han asociado a posibles consecuencias para la salud (reacciones alérgicas, trastornos en mujeres embarazadas y niños, posible acción cancerígena, etc.) (Kamala et al., 2019; Suhaj et al., 2006).

Las **propiedades funcionales** de estas plantas, como sus propiedades antioxidantes o antimicrobianas, se deben a los **compuestos fenólicos** presentes en sus frutos, semillas, hojas, tallos y flores (Brewer et al., 2011). Los compuestos fenólicos constituyen un amplio grupo de compuestos resultantes del metabolismo secundario de las plantas que se encuentran en diferentes fuentes naturales. Por este motivo, para la obtención de los extractos fenólicos, los **métodos de extracción utilizados** son cruciales, ya que determinan la concentración, el grado de pureza al que se extraen los compuestos fenólicos y, al mismo tiempo, afectan a todas sus propiedades funcionales. Aunque existen diferentes métodos de extracción, buscar **métodos sencillos y rentables** es prioritario para la revalorización de las plantas de la Dehesa Extremeña. Las técnicas que utilizan **solventes orgánicos adecuados** para extraer estos compuestos, entre los que se encuentran el etanol o metanol (70-80%) y el agua, ayudados por la utilización de

**agitación y ultrasonidos** pueden ser muy adecuadas al ser utilizadas en diferentes estudios con exitosos resultados (Caldas et al., 2018). **En nuestro trabajo**, cuando se **compararon los dos métodos de extracción**, se observó que existían diferencias significativas, encontrándose los **valores más altos** de concentraciones de compuestos fenólicos para la **extracción por ultrasonidos** tal y como observaron otros autores ( Bimakr et al., 2017; He et al., 2016). En la comparación entre las plantas se observa que *Cistus albidus*, *C. salviifolius*, *Rubus ulmifolius* y *Q. ilex* fueron las que mayores concentraciones de compuestos fenólicos obtuvieron. Las plantas pertenecientes al género *Cistus* son muy aromáticas, y también es el caso de las hojas de algunos árboles como *Q. ilex*, de ahí que sea lógico encontrar importantes concentraciones de compuestos fenólicos como ha sido reportado por algunos investigadores (Abu-Orabi et al., 2020; Amessis-Ouchemoukh et al., 2017; Hadidi et al., 2017).

La presencia de estos compuestos está relacionada con diferentes propiedades bioactivas como se comentó anteriormente. **Las propiedades antioxidantes** de estos compuestos se deben a sus propiedades redox y a su estructura química, responsables de neutralizar radicales libres, quelar metales y descomponer peróxidos (Chun et al., 2005; Moon et al., 2009; Zulueta et al., 2009). Esta propiedad beneficiosa retrasa el desarrollo de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como el cáncer, la diabetes y la enfermedad de Alzheimer (Kumar et al., 2020; Pate et al., 2017), así como la actividad antiinflamatoria (Crozier et al., 2009). Además, se ha observado un papel protector frente a la oxidación de los lípidos insaturados en los alimentos, principalmente en la carne y los productos cárnicos (Burri et al., 2020; Lourenço et al., 2019). La actividad antioxidante analizada por los **dos métodos, DPPH y ABTS**, mostró que los **extractos** obtenidos **por ultrasonidos** tenían **más actividad antioxidante** en general que los extractos obtenidos por agitación. Además, *Cistus* y *Q. ilex* fueron también los que presentaron los valores más altos. Los extractos con mayor actividad antioxidante no fueron los que presentaron mayores concentraciones de compuestos fenólicos totales, lo que puede deberse a las diferentes composiciones de compuestos en los extractos de las diferentes plantas (Márquez et al., 2014; Puertas-Mejía et al., 2012). Otros autores también encontraron las plantas del género *Cistus* es propiedades

beneficiosas, entre las que destaca su actividad antioxidante, relacionada con su contenido en compuestos fenólicos extraídos principalmente con etanol (Stępień et al., 2018). También otros estudios (Arina y Harisun et al., 2019) obtuvieron un 90% de inhibición de radicales libres en extractos de *Q. ilex*.

En cuanto a **la actividad antihipertensiva**, no hay muchos estudios recientes sobre esta actividad en plantas aromáticas. La hipertensión es uno de los factores que contribuyen a las enfermedades cardiovasculares, por lo que es muy importante encontrar compuestos naturales con esta actividad inhibitoria. Algunos estudios con *Hibiscus sabdariffa* han atribuido la actividad antihipertensiva al elevado número de compuestos fenólicos que poseen sus extractos siendo los flavonoides y las antocianinas los principales componentes (Vargas-León et al., 2018). La actividad antihipertensiva determinada por la actividad inhibidora de la ECA de los extractos obtenidos de las 15 plantas mostró que los compuestos extraídos de las especies del género *Cistus*, entre ellas *C. albidus*, *C. ladanifer* y *C. salviifolius*, seguidos de *Malva sylvestris*, *Cistus multiflorus*, *R. ulmifolius*, *Q. ilex*, *Morus alba* y *Urginea marina* mediante **ultrasonidos** eran más eficaces para esta actividad.

La posible utilización de estas plantas por sus **propiedades antimicrobianas** es otro de las actividades importantes para conseguir la revalorización de las plantas autóctonas de la Dehesa Extremeña. Esto incluye actividad frente a procariotas, como las **bacterias**, y eucariotas, como las **levaduras** y los **mohos**. Diferentes estudios recientes han documentado los efectos antibacterianos de extractos ricos en fenoles que se encuentran habitualmente en las plantas. Estos estudios han puesto de relieve el uso de compuestos fenólicos para controlar bacterias patógenas, incluidas aquellas con un perfil comercial de resistencia a los antibióticos (Cáceres et al., 2020; Gomes et al., 2020). Los efectos **antibacterianos** de los compuestos fenólicos también se han asociado principalmente a la presencia de grupos hidroxilo en sus moléculas. De hecho, el número y la posición de estos grupos hidroxilo, es decir, el patrón de hidroxilación, en el anillo fenólico, parece estar asociado con la importancia de los efectos inhibidores ejercidos por los compuestos fenólicos sobre las bacterias diana (Oh et al., 2015; Sanhueza et al., 2017). Se ha demostrado un efecto

bactericida contra bacterias transmitidas por los alimentos, como *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Cáceres et al., 2020; Vieitez et al., 2018; Weerakkody et al., 2010). Menos estudios se han realizado en levaduras alterantes o mohos micotoxigénicos en cuanto a la producción de micotoxinas. En esta Tesis se observó que, en general **los extractos** obtenidos mediante **ultrasonidos** tuvieron más actividad antibacteriana, destacando *C. salviifolius* y *Q. ilex* presentaron una mayor capacidad de inhibición sobre las seis **bacterias patógenas** estudiadas, *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *Salmonella choleraesuis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Los extractos de las plantas pertenecientes al género *Cistus* (*C. multiflorus*, *C. albidus* y *C. ladanifer*) presentaron una mayor capacidad de inhibición frente a *Salmonella choleraesuis*. *R. ulmifolius* presentó una mayor capacidad de inhibición frente a *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli*. La concentración del extracto también afectó a esta actividad, ya que, a mayor concentración, mayor capacidad de inhibición, siendo 2 mg/mL la concentración con mayor capacidad antimicrobiana frente a las seis bacterias estudiadas. Por lo tanto, el género *Cistus* se destaca por su capacidad antimicrobiana. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Mahmoudi et al. (2016) quienes, tras estudiar la actividad antimicrobiana de dos especies del género *Cistus*, observaron una mayor actividad frente a *E. coli*. Se ha reportado que las bacterias Gram-positivas son más sensibles a los extractos naturales, no obstante, existen excepciones en las que las bacterias Gram negativas son más susceptibles que las Gram positivas frente a algunos extractos naturales (Kalemba et al., 2003), destacando la susceptibilidad de *E. coli*. Además, el extracto de *Quercus ilex*, también mostró importantes actividades, y, en este sentido, algunos autores han reportado que las hojas de *Q. ilex* y de otros *Quercus* spp. contienen compuestos químicos; fundamentalmente compuestos fenólicos, reportados como compuestos antimicrobianos en (Karioti et al., 2011). La actividad antimicrobiana ha sido demostrada frente a varios microorganismos, incluyendo *E. coli* y *S. aureus*, dependiendo esta actividad de la especie de planta y del método de extracción (Burlacu et al., 2020).

En cuanto a los microorganismos eucariotas, como las **levaduras alterantes** analizadas, *Candida boidinii*, *Priceomyces carsonii*, *Kregervanrija*



*fluxuum* y *Zygosacharomyces bailii*, fueron los extractos de *Cistus ladanifer* y *C. albidus* los que mostraron una mayor capacidad de inhibición frente a las levaduras alterantes y también los extractos de *Q. ilex*. Igual que en el caso de las bacterias la mayor concentración de extractos, 2 mg/mL, mostró una mayor capacidad frente a las levaduras alterantes. Aunque no hay muchos estudios frente a levaduras, Ceylan et al. (2019) realizaron estudios con varias plantas aromáticas y observaron su actividad contra levaduras del género *Candida*.

Por último, en cuanto a la **actividad antifúngica**, el crecimiento de moho en los alimentos puede causar diferentes alteraciones en los alimentos y graves riesgos para la salud de los consumidores debido a la producción de metabolitos tóxicos. Por eso en este estudio se utilizaron dos cepas de *Aspergillus flavus*, **Cq103 and Cq8**, productoras de **aflatoxina B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>**. Se utilizaron los extractos de algunas plantas con mejores resultados frente a bacterias y levaduras como del género *Cistus*, *Cistus albidus*, y *Quercus ilex*, además de un *Rubus ulmifolius* por su actividad media y *Ulmus* sp. por su escasa actividad frente a bacterias y nula frente a levaduras. En este caso se estudió su efecto sobre el crecimiento de *A. flavus*, la producción de aflatoxinas y la expresión de un gen relacionado con su síntesis, además se identificaron los compuestos en los extractos utilizados. *Cistus albidus* fue la planta con mayor concentración de compuestos fenólicos, seguida de *Quercus ilex*, tal y como se había observado en los ensayos anteriores. Existía una gran variabilidad de compuestos entre los extractos de las plantas en cuanto al tipo y la cantidad, identificándose principalmente ácidos fenólicos y flavonoides. Los extractos no influyeron en el crecimiento del moho, sin embargo, los extractos de *Quercus ilex*, seguidos de *Ulmus* sp., fueron **muy efectivos para inhibir la producción de aflatoxina B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>** producida por las dos cepas de *A. flavus*. Diferentes estudios han observado la inhibición del crecimiento de varios tipos de mohos peligrosos en los alimentos en presencia de extractos de plantas; sin embargo, en nuestro estudio, este efecto sobre el crecimiento no fue tan marcado. Abbaszadeh et al. (2014) evaluaron la eficacia antifúngica de compuestos fenólicos vegetales, y los resultados indicaron que todos los compuestos eran eficaces en diversos grados contra el crecimiento de diferentes mohos. La mayor actividad inhibitoria de los compuestos puros de timol, carvacrol, eugenol y mentol se encontró para *Cladosporium* sp. entre 100 y 350

$\mu\text{g/mL}$  y *Aspergillus* sp. a 100 y 125  $\mu\text{g/mL}$ . Faustino et al. (2018) estudiaron los efectos de extractos fenólicos obtenidos de *Caléndula* L., ricos en ácido hidroxicinámico y derivados flavonoides, observando una actividad significativa frente a cepas de *Microsporum*. Así, otros autores también observaron que la inhibición del crecimiento de diversos tipos de mohos nocivos en los alimentos era diferente cuando estaban en presencia de extractos vegetales. Todos estos estudios se han centrado en la influencia de los compuestos fenólicos en el crecimiento de mohos, sin embargo, hay muy pocos estudios sobre la influencia de la producción de aflatoxinas.

Así, se observó que, la actividad frente a los diferentes tipos de microorganismo, bacterias, levaduras y mohos, es muy variable y está determinada, no solo por la cantidad, sino por el tipo de compuestos extraídos de las plantas. El uso de estos nuevos compuestos naturales de la Dehesa para la inhibición del crecimiento de patógenos y la producción metabolitos tóxicos es muy deseable, promoviendo el respeto al medio ambiente al evitar el uso de compuestos químicos.

Uno de los beneficios más importantes, por tanto, de estas plantas es su actividad antimicrobiana que se debe principalmente a los compuestos fenólicos que contienen (Brewer et al., 2011; Bouarab et al., 2019). Para garantizar la seguridad microbiana de los alimentos, los consumidores demandan sistemas de **producción de alimentos "más sanos" y respetuosos con el medio ambiente**, lo que fomenta el desarrollo de nuevas estrategias de bioconservación basadas en el uso de agentes antimicrobianos naturales en lugar de conservantes sintéticos. La mayoría de las alternativas naturales a los conservantes alimentarios sintéticos exploradas en estudios son los **aceites esenciales**, la mayoría de los cuales se han utilizado desde la antigüedad. Éstos se han convertido en el centro de interés para su aplicación directa en productos alimentarios (Carocho et al., 2014). Los aceites esenciales son los extractos vegetales que más se han estudiado por su actividad antimicrobiana. Son líquidos oleosos aromáticos que se obtienen a partir de material vegetal y pueden obtenerse por diferentes métodos, pero el método de destilación al vapor es el más utilizado para la producción comercial de aceites esenciales (Van de Braak y Leijten, 1999). Por este motivo, el estudio final de esta

Tesis se realizó con aceites esenciales de seis de las plantas evaluadas, *Calendula officinalis*; *Cistus ladanifer*, *Cistus multiflorus*, *Cistus salviifolius*, *Lavandula stoechas* y *Rosmarinus officinalis*. Se utilizaron estas plantas para comparar las del género *Cistus* con otras que son más comúnmente utilizadas como Caléndula, Lavanda y Romero. Se determinó la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales frente a las bacterias patógenas, levaduras alterantes y mohos productores de aflatoxinas anteriormente estudiados.

La gran variabilidad en la composición de los aceites esenciales de las seis plantas aromáticas fue muy evidente. Los aceites esenciales de *Cistus* presentaron mayor contenido de fenoles totales. Los aceites esenciales pueden tener más de 60 componentes individuales, dependiendo de la especie y subespecie de la planta de la que se obtengan, y los componentes principales pueden constituir hasta el 85% de un aceite esencial, mientras que otros componentes sólo están presentes en forma de trazas (Dima y Dima, 2015). Según diferentes autores, los compuestos fenólicos son los principales responsables de las propiedades antibacterianas, como se ha mencionado anteriormente; sin embargo, existen pruebas de que los compuestos menores desempeñan un papel clave en la actividad antibacteriana, posiblemente produciendo un efecto sinérgico entre otros compuestos (Marino et al., 2001). Por tanto, es lógico pensar que, teniendo en cuenta la gran variedad de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales, su actividad antimicrobiana no sea atribuible a un mecanismo de acción específico, sino a la acción combinada de varios de ellos sobre diferentes partes de la célula microbiana.

Los **aceites esenciales mostraron efectos inhibitorios** sobre las bacterias analizadas y también sobre las levaduras, mostrando un diámetro máximo de inhibición de 11,50 mm para *Salmonella choleraesuis* y *Kregervanrija fluxuum* en el caso de *Cistus ladanifer* y un diámetro máximo de 9 mm para *Bacillus cereus* y 9,50 mm para *Priceomyces carsonii* en el caso de *Cistus salviifolius*. Los resultados indicaron que la actividad antibacteriana y frente a levaduras está influida por la concentración y el material vegetal utilizado para la preparación del aceite esencial. Los aceites esenciales son eficaces contra los microorganismos, sin embargo, se han observado diferentes niveles de susceptibilidad para cada uno

de los grupos, probablemente debido a la diferencia en sus membranas, como ocurre con las bacterias Gram negativas y Gram positivas (Kalemba y Kunicka, 2003). También hay diferentes estudios sobre la inhibición del crecimiento de mohos; sin embargo, no hay tantos sobre la influencia en la producción de micotoxinas (Wan et al., 2019). El aceite esencial obtenido de *Cistus multiflorus* no mostró actividad contra ninguna de las bacterias evaluadas, lo que concuerda con los resultados de los extractos en el capítulo 1 de esta Tesis. Los aceites esenciales de *Calendula officinalis* y *Rosmarinus officinalis* tampoco mostraron actividad, aunque se han descrito los efectos antimicrobianos de estos extractos vegetales frente a bacterias a altas concentraciones (Rigane et al., 2013; Genena et al., 2008). Existen diferentes estudios en la bibliografía que destacan la relevancia de los extractos y aceites de *Lavandula stoechas* y *Rosmarinus officinalis* para las levaduras (Zuzarte et al., 2013; Tavassoli et al., 2011); sin embargo, como se ha mencionado anteriormente en el caso de las bacterias, la actividad tiene lugar a altas concentraciones de compuestos fenólicos.

En cuanto a la influencia en los mohos, los aceites produjeron inhibición la tasa de **crecimiento** de ambas cepas de *Aspergillus flavus*, y significativamente en presencia de los aceites esenciales de *Cistus multiflorus* y *Rosmarinus officinalis* para la **cepa 1** y en presencia de **todos los aceites esenciales excepto *Lavandula stoechas*** para la **cepa 2**. Esto difiere del estudio anterior con los extractos, en los que estos no tuvieron efecto en el crecimiento de los mohos.

Aunque los aceites esenciales ensayados mostraron un efecto similar sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus*, se observaron diferencias significativas en la **producción de aflatoxinas**. En cuanto a la producción de **aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)**, los aceites esenciales de *Cistus ladanifer* y *Cistus salviifolius* tuvieron el mayor efecto, seguidos de los aceites esenciales de *Cistus multiflorus*, *Lavandula stoechas*, *Rosmarinus officinalis* y, por último, *Calendula officinalis*. La producción de **aflatoxina B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>)** en ambas cepas fue inferior a la de AFB<sub>1</sub>. Aunque **se observaron diferencias significativas con respecto al control**, en el caso de la AFB<sub>2</sub> no se detectaron diferencias con respecto al efecto de los distintos aceites esenciales, probablemente porque al producirse menos aflatoxina, el impacto puede ser más difícil de evaluar. Existen diferentes estudios que destacan

la capacidad de los aceites esenciales vegetales para inhibir el crecimiento de mohos. Wan et al. (2019) investigaron el efecto de las nanoemulsiones de aceites esenciales seleccionados (tomillo, hierba limón, canela, menta y clavo) sobre la actividad antifúngica y la actividad inhibidora de micotoxinas utilizando dos cepas de *Fusarium graminearum*. En cuanto a la inhibición de la producción de micotoxinas, se observó una actividad inhibidora significativa y los mismos aceites esenciales presentaron diferencias significativas en la inhibición de la producción de micotoxinas en las dos cepas de *Fusarium graminearum*, lo que coincide con nuestros resultados, ya que también obtuvimos diferencias en la inhibición de las dos cepas por los mismos aceites esenciales. También se ha probado la actividad antifúngica de aceites esenciales ampliamente conocidos, como el orégano (*Origanum vulgare*) (Bedoya-Serna et al., 2018), la canela (Munhuweyi et al., 2018), el clavo (Estrada et al., 2017), la menta piperita y el eucalipto (Pandey et al., 2017). Pocos trabajos de investigación se han centrado en el impacto de los aceites esenciales en la producción de micotoxinas, y tampoco en plantas autóctonas ampliamente disponibles, como las del género *Cistus*, que han demostrado ser las que tienen un mayor efecto en esta Tesis.

Queda por tanto demostrado que los extractos y aceites esenciales de plantas autóctonas de la Dehesa Extremeña tienen importantes propiedades funcionales, antioxidantes, antihipertensivas y antimicrobianas, por lo que podrían ser utilizados la industria al tratarse de plantas baratas, disponibles y no tóxicas que favorecen la sostenibilidad del entorno de la Dehesa Extremeña.



## **CONCLUSIONES**

---





## PRIMERA

En general, cuando se compararon los métodos de extracción utilizados para obtener compuestos fenólicos, se observó que existían diferencias significativas, encontrándose los valores más altos en la extracción por **ultrasonidos**. Además, los extractos obtenidos de *Cistus albidus*, *C. salviifolius*, *R. ulmifolius* y *Q. ilex* fueron los que presentaron mayores concentraciones de compuestos fenólicos. La actividad **antioxidante** fue mayor en los extractos de *Cistus* y *Q. ilex* obtenidos por ultrasonidos, al igual que la actividad **antihipertensiva**.

## SEGUNDA

La **actividad antimicrobiana** también es mayor en los extractos obtenidos por **ultrasonidos**. Además, para **bacterias** los extractos de las plantas de *C. salviifolius* y *Q. ilex* fueron más efectivos y para las **levaduras** los de *C. ladanifer*. En el caso de los **mohos**, los extractos no influyen en su crecimiento, pero sí en la producción de **aflatoxinas**, siendo los extractos de *Quercus ilex* los **mejores para la inhibición** de la producción de aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> producidas por dos cepas de *A. flavus*, seguido de *Ulmus* sp.

## TERCERA

La **extracción por ultrasonidos es más eficiente** para la obtención de los compuestos fenólicos de las plantas, y la **composición en compuestos de los extractos** es de vital importancia para su actividad, siendo los extractos de las plantas del género *Cistus* y de *Quercus ilex* los que tienen propiedades funcionales más significativas para su uso en la obtención de productos sanos y seguros, favoreciendo la **sostenibilidad del entorno de la Dehesa Extremeña**, y fomentando el **respeto al medio ambiente** al evitar el uso de compuestos químicos.

## CUARTA

Los **aceites esenciales** utilizados de *Cistus ladanifer* y *Cistus salviifolius* tenían la mayor cantidad de compuestos fenólicos, y mostraron una **mayor actividad antimicrobiana contra todos los microorganismos utilizados, incluidas bacterias, levaduras y mohos, así como la producción de micotoxinas**. Sin embargo, el aceite esencial los aceites de *Lavandula stoechas* y *Calendula officinalis* mostraron una actividad significativa también con baja concentración de compuestos fenólicos.

## QUINTA

**La utilización de extractos y aceites** de plantas autóctonas de la Dehesa Extremeña puede **favorecer la seguridad y salubridad** de los productos en los que se utilicen al ser sustancias con **importantes actividades funcionales, naturales y no tóxicas**, además de ser un recurso **barato y disponible**, que favorecen la sostenibilidad del entorno de la Dehesa Extremeña. La concentración y composición, en cuanto a los compuestos, que se hayan presentes en estos extractos y aceites esenciales de las plantas, son muy importantes e influyen en las actividades funcionales de los mismos, de ahí que, podrían realizarse futuros análisis de los compuestos químicos puros presentes, para conseguir efectos más específicos en su aplicación.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---



## BIBLIOGRAFÍA

- Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A. R., & Abbaszadeh, A. (2014). Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal of Mycology and Medical*, 24, e51-e56.
- Abdullah, A. R., Hapidin, H., & Abdullah, H. (2018). The role of semipurified fractions isolated from *Quercus infectoria* on bone metabolism by using HFOB 1.19 human fetal osteoblast cell model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5319528.
- Abu-Orabi, S. T., Al-Qudah, M. A., Saleh, N. R., Bataineh, T. T., Obeidat, S. M., Al-Sheraideh, M. S., Al-Jaber, H. I., Tashtoush, H. I., & Lahham, J.N. (2020). Antioxidant activity of crude extracts and essential oils from flower buds and leaves of *Cistus creticus* and *Cistus salviifolius*. *Arabian Journal of Chemistry*, 13, 6256-6266.
- Accame, M. E. C. (2016). Plantas con interés en Farmacia: moras. *Panorama actual del medicamento*, 40(392), 371-375.
- Aftab, T. (2019). A review of medicinal and aromatic plants and their secondary metabolites status under abiotic stress. *Journal of Medicinal Plants*, 7(3), 99-106.
- Agnieszka Stepień, A., David Aebisher, D., & Dorota Bartusik-Aebisher, D. (2018). Biological properties of *Cistus* species. *European Journal of Clinical and Experimental Medicine*, (2), 27-132.
- Agostini-Costa, T. D. S., Vieira, R. F., Bizzo, H. R., Silveira, D., & Gimenes, M. A. (2012). Secondary metabolites. *Chromatography and its applications*, 1, 131-164.
- Ahmad, M., Masood, S., Sultana, S., Hadda, T. B., Bader, A., & Zafar, M. (2015). Antioxidant and nutraceutical value of wild medicinal *Rubus berries*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(1), 241-247.
- Ahn, E., Choi, S. W., & Kim, E. (2017). Anti-diabetic effect of sericultural product in high fat diet-fed mice. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 46, 289-297.
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, 4, 200-214.

- Alías, J. C., Sosa, T., Escudero, J. C., & Chaves, N. (2006). Autotoxicity against germination and seedling emergence in *Cistus ladanifer* L. *Plant and Soil*, 282, 327-332.
- Algieri, F., Rodriguez-Nogales, A., Vezza, T., Garrido-Mesa, J., Garrido-Mesa, N., Pilar Utrilla, M., ... & Galvez, J. (2016). Anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts of *Lavandula dentate* L. and *Lavandula stoechas* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 190, 142-158.
- Alirezalu, A., Salehi, P., Ahmadi, N., Sonboli, A., Aceto, S., Hatami Maleki, H., & Ayyari, M. (2018). Flavonoids profile and antioxidant activity in flowers and leaves of hawthorn species (*Crataegus* spp.) from different regions of Iran. *International journal of food properties*, 21(1), 452-470.
- Alizadeh, F., Khodavandi, A., & Faraji, F. S. (2017). *Malva sylvestris* inhibits *Candida albicans* biofilm formation. *Journal of Herbmmed Pharmacology*, 6(2), 62-68.
- Almanac, Old Farmers'. (2021). Birth Month Flowers. *Old Farmer Almanac*, 98-120.
- Al-Snafi, A.E. (2013). *Calendula officinalis*: A review on its medicinal potentials. *International Journal of Pharmacy and Industrial Research*, 3, 257-265.
- Amessis-Ouchemoukh, N., Ouchemoukh, S., Meziat, N., Idiri, Y., Hernanz, D., Stinco, C.M., Rodríguez-Pulido, F.J., Heredia, F.J., Madani, K., & Luis, J. (2017). Bioactive metabolites involved in the antioxidant, anticancer and anticalpain activities of *Ficus carica* L., *Ceratonia siliqua* L. and *Quercus ilex* L. extracts. *Industrial Crops and Products*, 95, 6-17.
- Andrade, J.M., Faustino, C., Garcia, C., Ladeiras, D., Reis, C.P., & Rijo, P. (2018). *Rosmarinus officinalis* L.: An update review of its phytochemistry and biological activity. *Future Science OA*, 4(4), FSO283.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Arina, M.I., & Harisun, Y. (2019). Effect of extraction temperatures on tannin content and antioxidant activity of *Quercus infectoria* (Manjakani). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19, 101104.
- Arnold, A.E., & Lutzoni, F. (2007). Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*, 88, 541–549.

- Asensio, C. M. (2013). Utilización de aceites esenciales de variedades de orégano como conservante antimicrobiano, antioxidante y de las propiedades sensoriales de alimentos: quesos cottage, ricota y aceite de oliva. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- AshwlayanVD, K. A., & Verma, M. (2018). Therapeutic potential of *Calendula officinalis*. *Pharm Pharmacol Int J*, 6(2), 149-155.
- Attaguile, G., Russo, A., Campisi, A., Savoca, F., Acquaviva, R., Ragusa, N., & Vanella, A. (2000). Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. *Cell biology and toxicology*, 16, 83-90.
- Attard, E., & Attard, H. (2006). The Potential Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Oleanolic Acid in the Hydroethanolic Extract of *Crataegus monogyna* Jacq. *Natural Product Communications*, 1(4), 381-386.
- Aumeeruddy-Elalfi, Z., Gurib-Fakim, A., & Mahomoodally, M.F. (2016). Chemical composition, antimicrobial and antibiotic potentiating activity of essential oils from 10 tropical medicinal plants from Mauritius. *Journal of Herb Medicine*, 6(2), 88-95.
- Aziz, M., Tab, N., Karim, A., Mekhfi, H., Bnouham, M., Ziyat, A., ... & Legssyer, A. (2006). Relaxant Effect of Aqueous Extract of *Cistus ladaniferus* on Rodent Intestinal Contractions. *Fitoterapia*, 77, 425-428.
- Azuola, R., & Vargas-Aguilar, P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Revista Tecnología en marcha*, 20(4).
- Bajalan, I., Rouzbahani, R., Pirbalouti, A. G., & Maggi, F. (2017). Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils obtained from seven Iranian populations of *Rosmarinus officinalis*. *Industrial crops and products*, 107, 305-311.
- Bajpai, V. K., Baek, K. H., & Kang, S. C. (2012). Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*, 45(2), 722-734.
- Baliga, M. S., Shivashankara, A. R., Venkatesh, S., Bhat, H. P., Palatty, P. L., Bhandari, G., & Rao, S. (2019). Phytochemicals in the prevention of ethanol-induced hepatotoxicity: A revisit. In *Dietary Interventions in Liver Disease* (pp. 79-89). Academic Press.
- Bandeira Reidel, R. V., Melai, B., Cioni, P., Flamini, G., & Pistelli, L. (2016). Aroma profile of *Rubus ulmifolius* flowers and fruits during different ontogenetic phases. *Chemistry & biodiversity*, 13(12), 1776-1784.

- Barajas-Farias, L. M., Pérez-Carreón, J. I., Arce-Popoca, E., Fattel-Fazenda, S., Alemán-Lazarini, L., Hernández-García, S., ... & Villa-Treviño, S. (2006). A dual and opposite effect of *Calendula officinalis* flower extract: chemoprotector and promoter in a rat hepatocarcinogenesis model. *Planta medica*, 72(03), 217-221.
- Barbosa-Pereira, L., Aurrekoetxea, G. P., Angulo, I., Paseiro-Losada, P., & Cruz, J. M. (2014). Development of new active packaging films coated with natural phenolic compounds to improve the oxidative stability of beef. *Meat science*, 97(2), 249-254.
- Barkaoui, M., Katiri, A., Boubaker, H., & Msanda, F. (2017). Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes in Chtouka Ait Baha and Tiznit (Western anti-atlas), Morocco. *Journal of Ethnopharmacology*, 198, 338-350.
- Barrajón-Catalán, E., Fernández-Arroyo, S., Saura, D., et al. (2010). *Cistaceae* aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2273-2282.
- Barrajón-Catalán, E., Tomás-Menor, L., Morales-Soto, A., Bruñá, N. M., López, D. S., Segura-Carretero, A., & Micol, V. (2016). Rockroses (*Cistus* sp.) oils. In *Essential oils in food preservation, flavor and safety* (pp. 649-658). Academic Press.
- Barros, L., Carvalho, A.M., & Ferreira, I.C. (2011). Comparing the composition and bioactivity of *Crataegus monogyna* flowers and fruits used in folk medicine. *Phytochemical Analysis*, 22, 181–188.
- Barros, L., Dueñas, M., Aloes, C.T., et al. (2013). Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. *Industrial Crops and Products*, 41, 41–45.
- Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Ferreira, I. C., & Santos-Buelga, C. (2012). Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 1576-1582.
- Bedoya-Serna, C.M., Dacanal, G.C., Fernandes, A.M., & Pinho, S.C. (2018). Antifungal activity of nanoemulsions encapsulating oregano (*Origanum vulgare*) essential oil: In vitro study and application in Minas Padrão cheese. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 929-935.
- Begum, A., Sandhya, S., Shaffath Ali, S., Vinod, K.R., Reddy, S., & Banji, D. (2013). An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (*Lamiaceae*). *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 12(1), 61-73.



- Ben Jemia, M., Kchouk, M. E., Senatore, F., Marzocco, S., De Feo, V., & Bruno, M. (2013). Antiproliferative activity of hexane extract from Tunisian *Cistus libanotis*, *Cistus monspeliensis* and *Cistus villosus*. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 1-7.
- Benabdelkader, T., Zitouni, A., Guitton, Y., Jullien, F., Maitre, D., Casabianca, H., Legendre, L., & Kameli, A. (2011). Essential oils from wild populations of Algerian *Lavandula stoechas* L.: Composition, chemical variability, and in vitro biological properties. *Chemistry & Biodiversity*, 8, 937–953.
- Beretta, G., Artali, R., Facino, R.M., & Gelmini, F. (2011). An analytical and theoretical approach for the profiling of the antioxidant activity of essential oils: The case of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55(5), 1255-1264.
- Bernhoft, A. (2010). A brief review on bioactive compounds in plants. *Bioactive compounds in plants- benefits and risks for man and animals*. 11-17.
- Bimakr, M., Ganjloo, A., Zarringhalami, S., & Ansarian, E. (2017). Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from *Malva sylvestris* leaves and its comparison with agitated bed extraction technique. *Food Science and Biotechnology*, 26, 1481-1490.
- Blanco-Salas, J., Vázquez, F.M., Alonso, D., Gutierrez Esteban, M., Márquez-García, F., Chaparro, J., Barrena, M., Ramos, S., & Hércules, S. (2009). Recursos fitogenéticos de las dehesas extremeñas: Plantas medicinales. In *Proceedings of the V Congreso Forestal Español*, Ávila, Spain, 21–25 September 2009.
- Bolumar, T., LaPeña, D., Skibsted, L. H., & Orlien, V. (2016). Rosemary and oxygen scavenger in active packaging for prevention of high-pressure induced lipid oxidation in pork patties. *Food Packaging and Shelf Life*, 7, 26-33.
- Borges, R. S., Ortiz, B. L. S., Pereira, A. C. M., Keita, H., & Carvalho, J. C. T. (2019). *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *Journal of ethnopharmacology*, 229, 29-45.
- Botsoglou, N., Taitzoglou, I., Zervos, I., Botsoglou, E., Tsantarliotou, M., & Chatzopoulou, P.S. (2010). Potential of long-term dietary administration of rosemary in improving the antioxidant status of rat tissues following carbon tetrachloride intoxication. *Food and Chemical Toxicology*, 48(3), 944-950.

- Bouayyadi, L., El Hafian, M., & Zidane, L. (2015). Étude floristique et ethnobotanique de la flore médicinale dans la région du Gharb, Morocco. *Journal of Applied Biosciences*, 93, 8760-8769.
- Bouzouita, N., Kachouri, F., Hamdi, M., & Chaabouni, M. M. (2005). Volatile constituents and antimicrobial activity of *Lavandula stoechas* L. oil from Tunisia. *Journal of Essential Oil Research*, 17, 584-586.
- Brewer, M.S. (2011). Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 221-247.
- Bouarab Chibane, L., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J., & Oulahal, N. (2019). Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 1457-1474.
- Burlacu, E., Nisca, A., & Tanase, C. (2020). A comprehensive review of phytochemistry and biological activities of *Quercus* species. *Forests*, 11, 904.
- Burri, S.C., Ekholm, A., Bleive, U., Jensen, M., Hellström, J., Månsson, S., Korpinen, R., Mattila, P.H., Radenkovska, V., Segliņa, D., et al. (2020). Lipid oxidation inhibition capacity of plant extracts and powders in a processed meat model system. *Meat Science*, 162, 108033.
- Cáceres, M., Hidalgo, W., Stashenko, E., Torres, R., & Ortiz, C. (2020). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities against pathogenic bacteria. *Antibiotics*, 9, 147.
- Caldas, T.W., Mazza, K.E., Teles, A.S., Mattos, G.N., Brígida, A.I.S., Conte-Junior, C.A., Borguini, G.R., Godoy, L.R., Cabral, L.M.C., & Tonon, R.V. (2018). Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 111, 86-91.
- Calderón-Montaño, J., Burgos-Morón, E., Pérez-Guerrero, C., & López-Lázaro, M. (2011). A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(4), 298-344.
- Cardoso, A. M. R., Cavalcanti, Y. W., de Almeida, L. D. F. D., de Lima Pérez, A. L. A., & Padilha, W. W. N. (2012). Antifungal activity of plant-based tinctures on *Candida*. *RSBO Revista Sul-Brasileira de Odontologia*, 9(1), 25-30.
- Carocho, M., Barreiro, M.F., Morales, P., & Ferreira, I.C.F.R. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 377-399.

- Camejo-Rodrigues, J., Ascensao, L., Bonet, M. À., & Valles, J. (2003). An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of “Serra de São Mamede” (Portugal). *Journal of ethnopharmacology*, 89(2-3), 199-209.
- Can, Ö. D., Özkay, Ü. D., Öztürk, N., & Öztürk, Y. (2010). Effects of hawthorn seed and pulp extracts on the central nervous system. *Pharmaceutical Biology*, 48(8), 924-931.
- Carlier, J., Leitao, J., & Fonseca, F. (2008). Population genetic structure of *Cistus ladanifer* L. (*Cistaceae*) and genetic differentiation from co-occurring *Cistus* species. *Plant Species Biology*, 23(3), 141-151.
- Carrasco, A., Ortiz-Ruiz, V., Martinez-Gutierrez, R., Tomas, V., & Tudela, J. (2015). *Lavandula stoechas* essential oil from Spain: Aromatic profile determined by gas chromatography–mass spectrometry, antioxidant and lipoxygenase inhibitory bioactivities. *Industrial Crops and Products*, 73, 16-27.
- Casquete, R., Benito, M. J., Martín, A., Martínez, A., de los Ángeles Rivas, M., & de Guía Córdoba, M. (2022). Influence of different extraction methods on the compound profiles and functional properties of extracts from solid by-products of the wine industry. *LWT*, 170, 114097.
- Castejón Martínez, L., Rosillo, M., Villegas, I., Sánchez-Hidalgo, M., Hadidi, L., Zaidi, F., & Lastra, C. (2019). *Quercus ilex* extract ameliorates acute TNBS-induced colitis in rats. *Planta Medica*, 85.
- Catoni, R., Gratani, L., & Varone, L. (2012). Physiological, morphological and anatomical trait variations between winter and summer leaves of *Cistus* species. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 207(6), 442-449.
- Caudullo, G., & De Rigo, D. (2016). *Ulmus*-elms in Europe: distribution, habitat, usage and threats. *European atlas of forest tree species*, 186-188.
- Ceylan, S., Cetin, S., Camadan, Y., Saral, O., Ozsen, O., & Tutus, A. (2019). Antibacterial and antioxidant activities of traditional medicinal plants from the Erzurum region of Turkey. *Irish Journal of Medical Science*, 188, 1303-1309.
- Chang, J. (2000). Medicinal herbs: Drugs or dietary supplements? *Biochemical Pharmacology*, 59, 211–219.
- Chan, E. W. C., Wong, S. K., Tangah, J., Inoue, T., & Chan, H. T. (2020). Phenolic constituents and anticancer properties of *Morus alba* (white mulberry) leaves. *Journal of integrative medicine*, 18(3), 189-195.

- Chakraborty, G. S., Arora, R., & Majee, C. (2011). Antidiabetic and Antihyperlipidaemic Effect of Hydroalcoholic extract of *Calendula officinalis*. *International Research Journal of Pharmacy*, 2(1), 61-65.
- Chaves-Silva, S., Santos, A.L.D., Chalfun-Júnior, A., Zhao, J., Peres, L.E.P., & Benedito, V.A. (2018). Understanding the genetic regulation of anthocyanin biosynthesis in plants - Tools for breeding purple varieties of fruits and vegetables. *Phytochemistry*, 153, 11-27.
- Chiarini, A., Micucci, M., Malaguti, M., Budriesi, R., Ioan, P., Lenzi, M., ... & Hrelia, S. (2013). Sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) bark extract: Cardiovascular activity and myocyte protection against oxidative damage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 471790.
- Chitrakar, B., Zhang, M., & Adhikari, B. (2019). Asparagus (*Asparagus officinalis*): Effect of processing on nutritional composition and phytochemicals of tough stem and spear by-products. *Trends in Food Science & Technology*, 93, 1-11.
- Choi, K. H., Lee, H. A., Park, M. H., & Han, J.-S. (2016). Mulberry (*Morus alba* L.) fruit extract containing anthocyanins improves glycemic control and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic C57BL/Ksj-db/db mice. *Journal of Medicinal Food*, 19, 737-745.
- Chun, S.S., Vatter, D.A., Lin, Y.T., & Shetty, K. (2005). Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry*, 40, 809-816.
- Costa, D.C., Costa, H.S., Albuquerque, T.G., Ramos, F., Castilho, M.C., & Sanches-Silva, A. (2015). Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. *Trends in Food Science & Technology*, 45, 336-354.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Productos naturales (metabolitos secundarios). *Bioquímica y biología molecular de plantas*, 24(1), 1250-1319.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., & Clifford, M.N. (2009). Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26, 1001-1043.
- Cruceriu, D., Balacescu, O., & Rakosy, E. (2018). *Calendula officinalis*: potential roles in cancer treatment and palliative care. *Integrative cancer therapies*, 17(4), 1068-1078.
- Ćujić, N., Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G., & Ibrić, S. (2016). Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food chemistry*, 194, 135-142.

- Dahake, A. P., Joshi, V. D., & Joshi, A. B. (2009). Antimicrobial Screening of Different Extract of *Anacardium occidentale* Linn. International Journal of ChemTech Research, 1(4), 856-858.
- Daniela, A., Pichichero, E., Canuti, L., Cicconi, R., Karou, D., D’Arcangelo, G., & Canini, A. (2007). Identification of phenolic compounds from medicinal and melliferous plants and their cytotoxic activity in cancer cells. Caryologia, 60(1-2), 90-95.
- da Silva, L. P., Pereira, E., Pires, T. C., Alves, M. J., Pereira, O. R., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2019). *Rubus ulmifolius* Schott fruits: A detailed study of its nutritional, chemical and bioactive properties. Food research international, 119, 34-43.
- de Elguea-Culebras, G.O., Bravo, E.M., & Sánchez-Vioque, R. (2022). Potential sources and methodologies for the recovery of phenolic compounds from distillation residues of Mediterranean aromatic plants. An approach to the valuation of by-products of the essential oil market—A review. Industrial Crops and Products, 175, 114261.
- de Elguea-Culebras, G. O., Sánchez-Vioque, R., Santana-Méridas, O., Herraiz-Peñalver, D., Carmona, M., & Berruga, M. I. (2016). In vitro antifungal activity of residues from essential oil industry against *Penicillium verrucosum*, a common contaminant of ripening cheeses. LWT, 73, 226-232.
- Dekić, V., Ristić, N., Dekić, B., & Ristić, M. (2020). Phenolic and flavonoid content and antioxidant evaluation of hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) fruits and leaves extracts. Bulletin of Natural Sciences Research, 10(1), 20-25.
- de la Torre Carreras, R., & Gonzalez, J. L. (2011). Las plantas aromáticas y medicinales: Futuro y potencialidad en Extremadura. In La agricultura y la ganadería extremeñas: informe 2010 (pp. 139-152). Caja de Ahorros de Badajoz.
- Demirci, F., Karadağ, A. E., Bıltekin, S. N., & Demirci, B. (2022). In vitro ACE2 and 5-LOX inhibition of *Rosmarinus officinalis* L. Essential oil and its major component 1, 8-cineole. Records of Natural Products.
- Díaz-Montaña, E. J., Aparicio-Ruiz, R., & Morales, M. T. (2023). Effect of Flavorization on Virgin Olive Oil Oxidation and Volatile Profile. Antioxidants, 12(2), 242.
- Dima, C., & Dima, S. (2015). Essential oils in foods: Extraction, stabilization, and toxicity. Current Opinion in Food Science, 5, 29-35.
- Dong, T., Han, R., Yu, J., Zhu, M., Zhang, Y., Gong, Y., & Li, Z. (2019). Anthocyanins accumulation and molecular analysis of correlated genes by metabolome and

- transcriptome in green and purple asparaguses (*Asparagus officinalis*, L.). Food chemistry, 271, 18-28.
- D'urso, G., Mes, J. J., Montoro, P., Hall, R. D., & de Vos, R. C. (2020). Identification of bioactive phytochemicals in mulberries. *Metabolites*, 10(1), 7.
- El Euch, S. K., Bouajila, J., & Bouzouita, N. (2015). Chemical composition, biological and cytotoxic activities of *Cistus salviifolius* flower buds and leaves extracts. *Industrial Crops and Products*, 76, 1100-1105.
- Elsaid, F. G., Shati, A. A., & Sarhan, M. A. (2015). Role of *Matricaria recutita* L. and *Asparagus officinalis* L. against the neurotoxicity of diazinon in rats. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 72, 26-35.
- Eloff, J. N., & McGaw, L. J. (2014). Using African plant biodiversity to combat microbial infections. *Novel Plant Bioresources: Applications in Food, Medicine and Cosmetics*, 163-173.
- El Omri, A., Han, J., Ben Abdrabbah, M., & Isoda, H. (2012). Down-regulation effect of *Rosmarinus officinalis* polyphenols on cellular stress proteins in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Cytotechnology*, 64(3), 231-240.
- Espada-Bellido, E., Ferreiro-González, M., Carrera, C., Palma, M., Álvarez, J. A., F. Barbero, G., & Ayuso, J. (2019). Extraction of antioxidants from blackberry (*Rubus Ulmifolius* L.): Comparison between ultrasound-and microwave-assisted extraction techniques. *Agronomy*, 9(11), 745.
- Estrada-Cano, C., Castro, M.A.A., Muñoz-Castellanos, L.N.A.O.A., García-Triana, N.A.O.A., & Hernández-Ochoa, L. (2017). Antifungal activity of microcapsulated clove (*Eugenia caryophyllata*) and Mexican oregano (*Lippia berlandieri*) essential oils against *Fusarium oxysporum*. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 9, 567-571.
- Ez Zoubi, Y., Bousta, D., El Mansouri, L., Boukhira, S., Siham, L., Achour, S., & Farah, A. (2016). Phytochemical screening, anti-inflammatory activity and acute toxicity of hydro-ethanolic, flavonoid, Tannin and Mucilage Extracts of *Lavandula stoechas* L from Morocco. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(1), 31–37.
- Ez Zoubi, Y., Fadil, M., Bousta, D., El Ouali Lalami, A., Lachkar, M., & Farah, A. (2021). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Moroccan *Lavandula stoechas* L.: optimization using response surface methodology. *Journal of Chemistry*, 2021, 1-11.

- Deveci, E., Cayan, G. T., Karakurt, S., & Duru, M. E. (2020). Antioxidant, cytotoxic, and enzyme inhibitory activities of agropyron repens and crataegus monogyna species. *European Journal of Biology*, 79(2), 98-105.
- Domonkos, I., Kis, M., Gombos, Z., & Ughy, B. (2013). Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. *Progress in lipid research*, 52(4), 539-561.
- Fadda, A., Barberis, A., & Sanna, D. (2018). Influence of pH, buffers and role of quinolinic acid, a novel iron chelating agent, in the determination of hydroxyl radical scavenging activity of plant extracts by Electron Paramagnetic Resonance (EPR). *Food chemistry*, 240, 174-182.
- Fallah, S., Karimi, A., Panahi, G., Nejad, S. G., Fadaei, R., & Seifi, M. (2016). Human colon cancer HT-29 cell death responses to doxorubicin and *Morus alba* leaves flavonoid extract. *Cell and Molecular Biology*, 62(4), 72-77.
- Farhad, M., Karimi, A., & Alidadi, S. (2016). In vitro antiproliferative and apoptosis-inducing activities of crude ethanolic extract of *Quercus brantii* L. acorn and subsequent fractions. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 14(3), 196-202.
- Farrugia, D. L., Shoemake, C., Attard, E., Azzopardi, L. M., & Mifsud, S. J. (2013). Investigative study on the angiotensin converting enzyme (ACE) inhibiting properties of the terpenoid extract of *Crataegus monogyna* using in silico models.
- Faustino, M.V., Pinto, D.C., Gonçalves, M.J., Salgueiro, L., Silveira, P., & Silva, A.M. (2018). *Calendula* L. species polyphenolic profile and in vitro antifungal activity. *Journal of Functional Foods*, 45, 254-267.
- Ferreira, M. R., Almeida, A. M., Quintela-Sabarís, C., Roque, N., Fernandez, P., & Ribeiro, M. M. (2021). The role of littoral cliffs in the niche delimitation on a microendemic plant facing climate change. *PLoS One*, 16(10), e0258976.
- Ferreira, V. C., Morcuende, D., Hernández-López, S. H., Madruga, M. S., Silva, F. A., & Estévez, M. (2017). Antioxidant extracts from acorns (*Quercus ilex* L.) effectively protect ready-to-eat (RTE) chicken patties irrespective of packaging atmosphere. *Journal of Food Science*, 82(3), 622-631.
- Ferreras, P., Díaz-Ruiz, F., Alves, P. C., & Monterroso, P. (2017). Optimizing camera-trapping protocols for characterizing mesocarnivore communities in south-western Europe. *Journal of Zoology*, 301(1), 23-31.
- Fuentes-Alventosa, J. M., Jaramillo-Carmona, S., Rodríguez-Gutiérrez, G., Guillén-Bejarano, R., Jiménez-Araujo, A., Fernández-Bolaños, J., & Rodríguez-Arcos, R.

- (2013). Preparation of bioactive extracts from asparagus by-product. *Food and Bioproducts Processing*, 91(2), 74-82.
- Gallego, R., Bueno, M., & Herrero, M. (2019). Sub-and supercritical fluid extraction of bioactive compounds from plants, food-by-products, seaweeds and microalgae – an update. *Trends in Analytical Chemistry*, 116, 198-213.
- Gasparetto, J. C., Martins, C. A. F., Hayashi, S. S., Otuky, M. F., & Pontarolo, R. (2012). Ethnobotanical and scientific aspects of *Malva sylvestris* L.: A millennial herbal medicine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64(2), 172–189.
- Gazim, Z. C., Rezende, C. M., Fraga, S. R., Svidzinski, T. I., & Cortez, D. A. (2008). Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L. (*Asteraceae*) growing in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 61-63.
- Ghasemzadeh, A., & Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plant Research*, 5, 6697-6703.
- Ghosh, S., Sarangi, A. N., Mukherjee, M., Bhowmick, S., & Tripathy, S. (2019). Reanalysis of *Lactobacillus paracasei* Lbs2 strain and large-scale comparative genomics places many strains into their correct taxonomic position. *Microorganisms*, 7(11), 487.
- Genena, A.K., Hense, H., Smânia Junior, A., & Souza, S.M.D. (2008). Rosemary (*Rosmarinus officinalis*): A study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *Food Science and Technology*, 28, 463-469.
- Giada, M.L.R. (2013). Food phenolic compounds: Main classes, sources and their antioxidant power. In J.A.M. González (Ed.), *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases—A Role for Antioxidants* (pp. 87–112). Rijeka, Croatia: InTech.
- Gomes, F., Dias, M.I., Lima, Â., Barros, L., Rodrigues, M.E., Ferreira, I.C., & Henriques, M. (2020). *Satureja montana* L. and *Origanum majorana* L. decoctions: Antimicrobial activity, mode of action and phenolic characterization. *Antibiotics*, 9, 294.
- González, J. A., Mena, A. J. A., & Amich, F. (2014). Plant-based rituals for the prevention and cure of the evil eye in a rural community of western Spain. Practices, ethnic and cultural aspects and role in emotional healing, 59.



- González-Vallinas, M., Molina, S., Vicente, G., & Rodríguez, J. A. (2013). Antitumor effect of 5-fluorouracil is enhanced by rosemary extract in both drug sensitive and resistant colon cancer cells. *Pharmacological Research*, 72, 61-68.
- Gören, A. C., Topçu, G., Bilsel, G., Bilsel, M., Aydoğmuş, Z., & Pezzuto, J. M. (2002). The chemical constituents and biological activity of essential oil of *Lavandula stoechas* ssp. *stoechas*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(9-10), 797-800.
- Gudiño, I., Martín, A., Casquete, R., Prieto, M. H., Ayuso, M. C., & Córdoba, M. D. G. (2022). Evaluation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) crop by-products as sources of bioactive compounds. *Scientia Horticulturae*, 304, 111284.
- Guimarães, R., Barros, L., Carvalho, A. M., Sousa, M. J., Morais, J. S., & Ferreira, I. C. (2009). Aromatic plants as a source of important phytochemicals: Vitamins, sugars and fatty acids in *Cistus ladanifer*, *Cupressus lusitanica* and *Eucalyptus gunnii* leaves. *Industrial crops and products*, 30(3), 427-430.
- Guo, Q., Wang, N., Liu, H., Li, Z., Lu, L., & Wang, C. (2020). The bioactive compounds and biological functions of *Asparagus officinalis* L.—A review. *Journal of Functional Foods*, 65, 103727.
- Guzmán, B., & Vargas, P. (2005). Systematics, character evolution, and biogeography of *Cistus* L. (*Cistaceae*) based on ITS, trnL-trnF, and matK sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, 37(3), 644-660.
- Guzmán, B., & Vargas, P. (2009). Long-distance colonization of the Western Mediterranean by *Cistus ladanifer* (*Cistaceae*) despite the absence of special dispersal mechanisms. *Journal of Biogeography*, 36(5), 954-968.
- Hadidi, L., Babou, L., Zaidi, F., Valentão, P., Andrade, P.B., & Grosso, C. (2017). *Quercus ilex* L.: How season, plant organ and extraction procedure can influence chemistry and bioactivities. *Chemistry & Biodiversity*, 14, e1600187.
- Hajaji, S., Jabri, M. A., Sifaoui, I., Lopez-Arencibia, A., Reyes-Batlle, M., B'chir, F., ... & Akkari, H. (2017). Amoebicidal, antimicrobial and in vitro ROS scavenging activities of Tunisian *Rubus ulmifolius* Schott, methanolic extract. *Experimental parasitology*, 183, 224-230.
- He, B., Zhang, L.L., Yue, X.Y., Liang, J., Jiang, J., Gao, X.L., & Yue, P.X. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chemistry*, 204, 70-76.

- Hendry, E. R., Worthington, T., Conway, B. R., & Lambert, P. A. (2009). Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64, 1219-1225.
- Holley, R. A., & Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food microbiology*, 22(4), 273-292.
- Iannicelli, J., Guariniello, J., Pitta Alvarez, S. I., & Escandon, A. S. (2018). Traditional uses, conservation status and biotechnological advances for a group of aromatic/medicinal native plants from America.
- Irakli, M., Chatzopoulou, P., & Ekateriniadou, L. (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds: oleuropein, phenolic acids, phenolic alcohols and flavonoids from olive leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 124, 382-388.
- Jha, S., Gupta, S. K., Bhattacharyya, P., Ghosh, A., & Mandal, P. (2018). In vitro antioxidant and antidiabetic activity of oligopeptides derived from different mulberry (*Morus alba* L.) cultivars. *Pharmacognosy Research*, 10(4), 361.
- Kalemba, D., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 813-829.
- Kamala, P.V., Akhila, S., Srinivasa, Y., & Rama, B. (2019). Alternative to artificial preservatives. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 10(Suppl 1), S13-S16.
- Kang, A., & Lee, T.S. (2016). Chapter 2—Secondary metabolism for isoprenoid-based biofuels. In C.A. Eckert & C.T. Trinh (Eds.), *Biotechnology for Biofuel Production and Optimization* (pp. 35–71). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Kaplan, M., Mutlu, E. A., Benson, M., Fields, J. Z., Banan, A., & Keshavarzian, A. (2007). Use of herbal preparations in the treatment of oxidant mediated inflammatory disorders. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, 13, 207-216.
- Karioti, A., Sokovic, M., Ciric, A., Koukoulitsa, C., Bilia, A.R., & Skaltsa, H. (2011). Antimicrobial properties of *Quercus ilex* L. proanthocyanidin dimers and simple phenolics: Evaluation of their synergistic activity with conventional antimicrobials and prediction of their pharmacokinetic profile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 6412-6422.
- Kaur, S., & Das, M. (2011). Functional foods: An overview. *Food Science and Biotechnology*, 20, 861-875.

- Kazemi Rad, H., Memarzia, A., Amin, F., & Boskabady, M. H. (2021). Relaxant Effect of *Urginea maritima* on Tracheal Smooth Muscle Mediated by the Effect on Beta-2 Adrenergic, Muscarinic Receptors and Calcium and Potassium Channels. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 1-9.
- Khare, C.P. (2004). *Encyclopedia of Indian Medicinal Plants*. Germany, Springer-Verlag Publisher, p. 116-117.
- Kidd, P. S., Díez, J., & Monterroso Martínez, C. (2004). Tolerance and bioaccumulation of heavy metals in five populations of *Cistus ladanifer* L. subsp. *ladanifer*. *Plant and soil*, 258, 189-205.
- Klančnik, A., Guzej, B., Kolar, M. H., Abramovič, H., & Možina, S. S. (2009). In vitro antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *Journal of Food Protection*, 72(8), 1744-1752.
- Kumar, D., Karthik, M., & Rajakumar, R. (2018). GC-MS analysis of bioactive compounds from ethanolic leaves extract of *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms and their pharmacological activities.
- Kumar, R. V., Srivastava, D., Singh, V., Kumar, U., Vishvakarma, V. K., Singh, P., ... & Kumar, R. (2020). Characterization, biological evaluation and molecular docking of mulberry fruit pectin. *Scientific Reports*, 10, 1-16.
- Kuo, C. F., Su, J. D., Chiu, C. H., et al. (2011). Anti-inflammatory effects of supercritical carbon dioxide extract and its isolated carnosic acid from *Rosmarinus officinalis* leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3674-3685.
- Lee, C.J., Chen, L.G., Chang, T.L., Ke, W.M., Lo, Y.F., & Wang, C.C. (2011). The correlation between skin-care effects and phytochemical contents in *Lamiaceae* plants. *Food Chemistry*, 124, 833-841.
- Li, A.N., Li, S., Zhang, Y.J., Xu, X.R., Chen, Y.M., & Li, H.B. (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6(12), 6020–6047.
- Li, T.S.C. (2006). The range of medicinal herbs and spices. In K.V. Peter (Ed.), *Handbook of Herbs and Spices*, Volume 3 (pp. 113–125). Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited.
- Long, S. R., Carey, R. A., Crofoot, K. M., Proteau, P. J., & Filtz, T. M. (2006). Effect of hawthorn (*Crataegus oxyacantha*) crude extract and chromatographic fractions on multiple activities in a cultured cardiomyocyte assay. *Phytomedicine*, 13(9-10), 643-650.

- Lourenço, K. R., Costa, M. D. C., & Palma, M. L. (2015). Possibilidades terapêuticas da esteva (*Cistus ladanifer* L). *Rev. fitoter*, 21-35.
- Lourenço, S.C., Moldão-Martins, M., & Alves, V.D. (2019). Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. *Molecules*, 24, 4132.
- Lucarini, R., Bernardes, W. A., Ferreira, D. S., et al. (2013). In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of *Rosmarinus officinalis* aqueous extracts, rosmarinic acid and its acetyl ester derivative. *Pharmaceutical Biology*, 51(9), 1087-1090.
- Ludwiczuk, A., Skalicka-Woźniak, K., & Georgiev, M.I. (2017). Chapter 11—Terpenoids. In S. Badal & R. Delgoda (Eds.), *Pharmacognosy* (pp. 233–266). Boston, MA, USA: Academic Press.
- Lukas, B., Bragagna, L., Starzyk, K., Labeledz, K., Stolze, K., & Novak, J. (2021). Polyphenol diversity and antioxidant activity of european *Cistus creticus* L. (*cistaceae*) compared to six further, partly sympatric cistus species. *Plants*, 10(4), 615.
- Luo, X., Cui, J., Zhang, H., Duan, Y., Zhang, D., Cai, M., & Chen, G. (2018). Ultrasound assisted extraction of polyphenolic compounds from red sorghum (*Sorghum bicolor* L.) bran and their biological activities and polyphenolic compositions. *Industrial Crops and Products*, 112, 296-304.
- Machado, A. P. D. F., Pasquel-Reátegui, J. L., Barbero, G. F., & Martínez, J. (2015). Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. *Food Research International*, 77, 675-683.
- Mahboubi, M., & Kazempour, N. (2009). The antimicrobial activity of essential oil from *Perovskia abrotanoides* karel and its main components. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(3), 343-347.
- Mahmoudi, H., Aouadhi, C., Kaddour, R., et al. (2016). Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of two cultivated *Cistus* species from Tunisia. *Biosciences Journal*, 32(1), 226-237.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747.
- Mander, L., & Liu, H.-W. (2010). Comprehensive natural products II. In *Chemistry and Biology*, 1st ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.

- Manganelli, R. U., & Tomei, P. E. (1999). Ethnopharmacobotanical studies of the Tuscan Archipelago. *Journal of Ethnopharmacology*, 65(3), 181-202.
- Mansinhos, I., Gonçalves, S., Rodriguez-Solana, R., Ordóñez-Díaz, J. L., Moreno-Rojas, J. M., & Romano, A. (2021). Ultrasonic-assisted extraction and natural deep eutectic solvents combination: A green strategy to improve the recovery of phenolic compounds from *Lavandula pedunculata* subsp. *lusitanica* (chaytor) franco. *Antioxidants*, 10(4), 582.
- Marino, M., Bersani, C., & Comi, G. (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 187-195.
- Márquez, C. J., Otero, C. M., Rojano, B. A., & Osorio, J. A. (2014). Actividad Antioxidante y Concentración de Compuestos Fenólicos del Tomate de Árbol (*Cyphomandra betacea* S.) en Poscosecha. *Temas Agrarios*, 19, 173-184.
- Marouane, W., Soussi, A., Murat, J.C., Bezzine, S., & El Feki, A. (2011). The protective effect of *Malva sylvestris* on rat kidney damaged by vanadium. *Lipids in Health and Disease*, 10(1), 1-8.
- Martín, J. A., Solla, A., Burón, M., López-Almansa, J. C., & Gil, L. (2006). Caracterización histórica, ecológica, taxonómica y fitosanitaria de una olmeda relicta en Rivas-Vaciamadrid (Madrid). *Invest Agrar: Sist Recur For*, 15(2), 208-217.
- Martínez-Ramos, T., Benedito-Fort, J., Watson, N. J., Ruiz-López, I. I., Che-Galicia, G., & Corona-Jiménez, E. (2020). Effect of solvent composition and its interaction with ultrasonic energy on the ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Mango peels (*Mangifera indica* L.). *Food and Bioproducts Processing*, 122, 41-54.
- Maoka, T. (2020). Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of natural medicines*, 74(1), 1-16.
- Mazraedoost, S. & Behbudi, G. (2021). Nano materials-based devices by photodynamic therapy for treating cancer applications. *Advances in Applied NanoBio-Technologies*, 2(3), 9–21.
- Memon, A. A., Memon, N., Luthria, D. L., Bhangar, M. I., & Pitafi, A. A. (2010). Phenolic acids profiling and antioxidant potential of mulberry (*Morus laevigata* W., *Morus nigra* L., *Morus alba* L.) leaves and fruits grown in Pakistan. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 60(1).

- Messaoud, C., Chograni, H., & Boussaid, M. (2012). Chemical composition and antioxidant activities of essential oils and methanol extracts of three wild *Lavandula* L. species. *Natural product research*, 26(21), 1976-1984.
- Metwally, F. M., Rashad, H., & Mahmoud, A. A. (2019). *Morus alba* L. Diminishes visceral adiposity, insulin resistance, behavioral alterations via regulation of gene expression of leptin, resistin and adiponectin in rats fed a high-cholesterol diet. *Physiology & Behavior*, 201, 1-11.
- Miura, T., Yasueda, A., Sakaue, M., Maeda, K., Hayashi, N., Ohno, S., & Ito, T. (2016). SUN-LB271: A Double-Blind Randomized Controlled Trial Regarding the Safety and Efficacy of Enzyme-Treated Asparagus Extract Intake in Healthy Human Subjects. *Clinical Nutrition*, 1(35), S145.
- Mohammed, H. J. (2011). Screening of Antibacterial Properties for Some Iraqi Plants Against *Salmonella typhimurium*. *Iraqi Journal of Veterinary Medicine*, 35(2), 28-35.
- Mohd AS, Mohd K, Juber A, Siddiqui B, Usama A, Farogh A, Mohd MK, Mohammad A, Asad A. (2016). Review article: *Lavandula stoechas* (Ustukhuddus): a miracle plant. *Journal of Innovative Pharmacy and Biological Sciences*, 3(1), 96–102.
- Moon, J. K., & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1655-1666.
- Morgado, J. M., Tapias, R., & Alesso, P. (2005, June). Producción de goma bruta de jara (*Cistus ladanifer* L.) en el suroeste de la península ibérica. In *Congresos Forestales*.
- Mousavi, S. M., Hashemi, S. A., Behbudi, G., Mazraedoost, S., Omidifar, N., Gholami, A., ... & Pynadathu Rumjit, N. (2021). A review on health benefits of *Malva sylvestris* L. nutritional compounds for metabolites, antioxidants, and anti-inflammatory, anticancer, and antimicrobial applications. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 1-13.
- Mousavi, S.M., Hashemi, S.A., Zarei, M., et al. (2020). Data on cytotoxic and antibacterial activity of synthesized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles using *Malva sylvestris*. *Data in Brief*, 28, 104929.
- Msaada, K., Salem, N., Tammar, S., Hammami, M., Jamal Saharkhiz, M., Debiche, N., & Marzouk, B. (2012). Essential oil composition of *Lavandula dentata*, *L. stoechas* and *L. multifida* cultivated in Tunisia. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 15(6), 1030-1039.

- Mukesh, S., Pankaj, S., Nagori, K., et al. (2011). Organoleptic properties in-vitro and in-vivo pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 3(4), 655-663.
- Muley, B. P., Khadabadi, S. S., & Banarase, N. B. (2009). Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (*Asteraceae*): a review. Tropical journal of pharmaceutical research, 8(5).
- Munhuweyi, K., Caleb, O. J., van Reenen, A. J., & Opara, U. L. (2018). Physical and antifungal properties of  $\beta$ -cyclodextrin microcapsules and nanofibre films containing cinnamon and oregano essential oils. LWT, 87, 413-422.
- Nabavi, S. F., Habtemariam, S., Ahmed, T., Sureda, A., Daglia, M., Sobarzo-Sánchez, E., & Nabavi, S. M. (2015). Polyphenolic composition of *Crataegus monogyna* Jacq.: from chemistry to medical applications. Nutrients, 7(9), 7708-7728.
- Nerín, C., Tovar, L., Djenane, D., Camo, J., Salafranca, J., Beltrán, J. A., & Roncalés, P. (2006). Stabilization of beef meat by a new active packaging containing natural antioxidants. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(20), 7840-7846.
- Nicoletti, M., Toniolo, C., Venditti, A., Bruno, M., & Ben Jemia, M. (2015). Antioxidant activity and chemical composition of three Tunisian Cistus: *Cistus monspeliensis*, *Cistus villosus* and *Cistus libanotis*. Natural Product Research, 29(3), 223-230.
- Oh, M., Bae, S. Y., & Chung, M. S. (2013). Mulberry (*Morus alba*) seed extract and its polyphenol compounds for control of foodborne viral surrogates. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 56, 655-660.
- Oh, E., & Jeon, B. (2015). Synergistic anti-*Campylobacter jejuni* activity of fluoroquinolone and macrolide antibiotics with phenolic compounds. Frontiers in Microbiology, 6, 1129.
- Okoh, O. O., Sadimenko, A. A., & Afolayan, A. J. (2007). The effects of age on the yield and composition of the essential oils of *Calendula officinalis*. Journal of Applied Sciences, 7(23), 3806-3810.
- Ozarowski, M., Mikolajczak, P. L., Bogacz, A., & others. (2013). *Rosmarinus officinalis* L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain. Fitoterapia, 91, 261-271.
- Pacheco, D. P., & Villalobos, J. R. (2007). Contribución al conocimiento de nombres vernáculos de plantas medicinales en la comarca de Zafra-Río Bodión. Revista de Estudios Extremeños, 63, 343-352.

- Pandey, A. K., Kumar, P., Singh, P., Tripathi, N. N., & Bajpai, V. K. (2017). Essential oils: Sources of antimicrobials and food preservatives. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2161.
- Panche, A.N., Diwan, A.D., & Chandra, S.R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutrition Science*, 5, 5.
- Paolini, J., Tomi, P., Bernardini, A.-F., Bradesi, P., Casanova, J., & Kaloustian, J. (2008). Detailed analysis of the essential oil from *Cistus albidus* L. by combination of GC/RI, GC/MS and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy. *Natural Product Research*, 22, 1270–1278.
- Pate, K. M., Rogers, M., Reed, J. W., van der Munnik, N., Vance, S. Z., & Moss, M. A. (2017). Anthoxanthin polyphenols attenuate A $\beta$  oligomer-induced neuronal responses associated with Alzheimer's disease. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 23, 135-144.
- Pawluczyk, M., Weiss, J., Vicente-Colomer, M. J., & Egea-Cortines, M. (2012). Two alleles of rpo B and rpo C1 distinguish an endemic European population from *Cistus heterophyllus* and its putative hybrid (*C. clausonis*) with *C. albidus*. *Plant systematics and evolution*, 298, 409-419.
- Peñuelas, J., Filella, I., Llusia, J., Siscart, D., & Piñol, J. (1998). Comparative field study of spring and summer leaf gas exchange and photobiology of the Mediterranean trees *Quercus ilex* and *Phillyrea latifolia*. *Journal of experimental botany*, 49(319), 229-238.
- Pérez, P., Saúl, L., & Ciria, M. P. (2011). Distribución Geográfica, Caracterización Ecológica y Evaluación de *Cistus laurifolius* y *Cistus ladanifer*. *Estudios Sobre El Matorral Como Recurso Energético. Agroenerg. Biomassa Vida Rural*, 331, 66-70.
- Peterson, J., Dwyer, J., Adlercreutz, H., Scalbert, A., Jacques, P., & McCullough, M. L. (2010). Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutrition reviews*, 68(10), 571-603.
- Petkova, N., Popova, A., & Alexieva, I. (2019). Antioxidant properties and some phytochemical components of the edible medicinal *Malva sylvestris* L. *Journal of Medicinal Plants*, 7(1), 96-99.
- Pinto, T., Aires, A., Cosme, F., Bacelar, E., Morais, M. C., Oliveira, I., ... & Gonçalves, B. (2021). Bioactive (Poly)phenols, volatile compounds from vegetables, medicinal and aromatic plants. *Foods*, 10(1), 106.
- Pinto-Correia, T., & Vos, W. (2004). Multifunctionality in Mediterranean landscapes-past and. *New Dimens. Eur. Landsc*, 4, 135.



- Poormoosavi, S. M., Najafzadehvarzi, H., Behmanesh, M. A., & Amirgholami, R. (2018). Protective effects of *Asparagus officinalis* extract against Bisphenol A-induced toxicity in Wistar rats. *Toxicology reports*, 5, 427-433.
- Popović, Z., Matić, R., Bojović, S., Stefanović, M., & Vidaković, V. (2016). Ethnobotany and herbal medicine in modern complementary and alternative medicine: An overview of publications in the field of I&C medicine 2001–2013. *Journal of ethnopharmacology*, 181, 182-192.
- Prakash, B., & Kiran, S. (2016). Essential oils: a traditionally realized natural resource for food preservation. *Current Science*, 110(10), 1890-1892.
- Preethi, K. C., Kuttan, G., & Kuttan, R. (2006). Antioxidant potential of an extract of *Calendula officinalis* flowers in vitro and in vivo. *Pharmaceutical Biology*, 44(9), 691-697.
- Preethi, K. C., Kuttan, G., & Kuttan, R. (2009). Anti-inflammatory activity of flower extract of *Calendula officinalis* Linn and its possible mechanism of action. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47(2), 113-120.
- Puertas-Mejía, M. A., Rivera-Echeverry, F., Villegas-Guzmán, P., Rojano, C. B. A., & Palaez-Jaramillo, C. (2012). Comparación entre el Estado de Maduración del Fruto de Café (*Coffea arabica* L.), el Contenido de Antocianinas y su Capacidad Antioxidante. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17, 360-367.
- Pulido, F. J. (1999). Herbivorismo y regeneración de la encina (*Quercus ilex* L.) en bosques y dehesas (Doctoral dissertation, Universidad de Extremadura).
- Quílez, M., Ferreres, F., López-Miranda, S., Salazar, E., & Jordán, M. J. (2020). Seed oil from Mediterranean aromatic and medicinal plants of the *Lamiaceae* family as a source of bioactive components with nutritional. *Antioxidants*, 9, 510.
- Rached, M. B., Abdallah, M., & Guerfel, M. (2014). Compositional quality of Zalmati virgin olive oil: Effect of the aromatization process with rosemary essential oils (*Rosmarinus officinalis* L.). *African Journal of Agricultural Research*, 9(44), 3276-3282.
- Raimundo, J. R., Frazão, D. F., Domingues, J. L., Quintela-Sabarís, C., Dentinho, T. P., Anjos, O., ... & Delgado, F. (2018). Neglected Mediterranean plant species are valuable resources: The example of *Cistus ladanifer*. *Planta*, 248, 1351-1364.
- Rašković, A., Milanović, I., Pavlović, N., Čebović, T., Vukmirović, S., & Mikov, M. (2014). Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and

- its hepatoprotective potential. *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1), 1-9.
- Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial crops and products*, 62, 250-264.
- Razavi, S. M., Zarrini, G., Molavi, G., & Ghasemi, G. (2011). Bioactivity of *Malva sylvestris* L., a medicinal plant from Iran. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 14(6), 574-579.
- Redondo-Blanco, S. L., Fernández, J., López-Ibáñez, S., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2019). Plant phytochemicals in food preservation: Antifungal bioactivity: A review. *Journal of Food Protection*, 83, 163-171.
- Ribera, A. E., & Zuñiga, G. (2012). Induced plant secondary metabolites for phytopathogenic fungi control: a review. *Journal of soil science and plant nutrition*, 12(4), 893-911.
- Rigane, G., Younes, S. B., Ghazghazi, H., & Salem, R. B. (2013). Investigation into the biological activities and chemical composition of *Calendula officinalis* L. growing in Tunisia. *International Food Research Journal*, 20, 3001.
- Rivas, M. Á., Casquete, R., de Guía Córdoba, M., Benito, M. J., Hernández, A., Ruiz-Moyano, S., & Martín, A. (2021). Functional properties of extracts and residual dietary fibre from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel obtained with different supercritical fluid conditions. *LWT*, 145, 111305.
- Rtibi, K., Hammami, I., Selmi, S., Grami, D., Sebai, H., Mohamed, A., & Marzouki, L. (2017). Phytochemical properties and pharmacological effects of *Quercus ilex* L. aqueous extract on gastrointestinal physiological parameters in vitro and in vivo. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 787-793.
- Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A. H., & Khalel, K. I. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43, 827-831.
- Rocha-Guzmán, N. E., González-Laredo, R. F., Vázquez-Cabral, B. D., Moreno-Jiménez, M. R., Gallegos-Infante, J. A., Gamboa-Gómez, C. I., & Flores-Rueda, A. G. (2019). Oak leaves as a new potential source for functional beverages: their antioxidant capacity and monomer flavonoid composition. In *Functional and medicinal beverages* (pp. 381-411). Academic Press.

- Rodrigues, S., Calhella, R. C., Barreira, J. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Abreu, R. M., ... & Ferreira, I. C. (2012). *Crataegus monogyna* buds and fruits phenolic extracts: Growth inhibitory activity on human tumor cell lines and chemical characterization by HPLC–DAD–ESI/MS. *Food Research International*, 49(1), 516-523.
- Roopashree, T. S., Dang, R., Rani, R. H., & others. (2008). Antibacterial activity of antipsoriatic herbs: *Cassia tora*, *Momordica charantia* and *Calendula officinalis*. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 1(3), 20-28.
- Rosenbaum, C. C., O'Mathúna, D. P., Chavez, M., & Shields, K. (2010). Antioxidants and anti-inflammatory dietary supplements for osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, 16(2), 32-40.
- Rossini-Oliva, S., Mingorance, M. D., Monaci, F., & Valdés, B. (2016). Ecophysiological indicators of native *Cistus ladanifer* L. at Riotinto mine tailings (SW Spain) for assessing its potential use for rehabilitation. *Ecological Engineering*, 91, 93-100.
- Ruíz, T. T., Escobar, G. P., & Pérez, C. J. L. (2007). *La Serena y Sierras Limítrofes: Flora y Vegetación*. Mérida, Spain: Consejería de Agricultura y Medio Ambiente, Junta de Extremadura.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., & Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food chemistry*, 91(4), 621-632.
- Saifullah, M., McCullum, R., McCluskey, A., & Vuong, Q. (2020). Comparison of conventional extraction technique with ultrasound assisted extraction on recovery of phenolic compounds from lemon scented tea tree (*Leptospermum petersonii*) leaves. *Heliyon*, 6(4).
- Salehi, S., Long, S. R., Proteau, P. J., & Filtz, T. M. (2009). Hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) extract exhibits atropine-sensitive activity in a cultured cardiomyocyte assay. *Journal of Natural Medicines*, 63(1), 1-8.
- Sánchez-Gutiérrez, M., Gómez-García, R., Carrasco, E., Bascón-Villegas, I., Rodríguez, A., & Pintado, M. (2022). *Quercus ilex* leaf as a functional ingredient: Polyphenolic profile and antioxidant activity throughout simulated gastrointestinal digestion and antimicrobial activity. *Journal of Functional Foods*, 91, 105025.

- Sánchez-Moreno, C. (2002). Compuestos polifenólicos: Estructura y clasificación. Presencia en alimentos y consumo. Biodisponibilidad y metabolismo. *Alimentaria*, (329), 19-27.
- Sánchez-Paniagua, M. (2009). Biosensores amperométricos de tirosinasa para la determinación de compuestos fenólicos en medios acuosos y no acuosos (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Sanhueza, L., Melo, R., Montero, R., Maisey, K., Mendoza, L., & Wilkens, M. (2017). Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 12, e0172273.
- Santhakumar, A. B., Kundur, A. R., Fanning, K., Netzel, M., Stanley, R., & Singh, I. (2015). Consumption of anthocyanin-rich queen garnet plum juice reduces platelet activation related thrombogenesis in healthy volunteers. *Journal of Functional Foods*, 12, 11-22.
- Savic-Gajic, I., Savic, I., Boskov, I., Žerajić, S., Markovic, I., & Gajic, D. (2019). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from black locust (*Robinia pseudoacaciae*) flowers and comparison with conventional methods. *Antioxidants*, 8(8), 248.
- Sayah, K., Chemlal, L., Marmouzi, I., El Jemli, M., Cherrah, Y., & Faouzi, M. E. A. (2017). In vivo anti-inflammatory and analgesic activities of *Cistus salviifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) aqueous extracts. *South African Journal of Botany*, 113, 160-163.
- Schulz, M., & Chim, J.F. (2019). Nutritional and bioactive value of Rubus berries. *Food Bioscience*, 31, 100438.
- Sebai, H., Selmi, S., Rtibi, K., Souli, A., Gharbi, N., & Sakly, M. (2013). Lavender (*Lavandula stoechas* L.) essential oils attenuate hyperglycemia and protect against oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *Lipids in Health and Disease*, 12(1), 189.
- Sebranek, J. G., Sewalt, V. J. H., Robbins, K., & Houser, T. A. (2005). Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. *Meat science*, 69(2), 289-296.
- Selmi, S., Rtibi, K., Grami, D., Sebai, H., & Marzouki, L. (2017). Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil components exhibit anti-hyperglycemic, anti-hyperlipidemic and antioxidant effects in experimental diabetes. *Pathophysiology*, 24(4), 297-303.

- Shadid, K. A., Shakya, A. K., Naik, R. R., Jaradat, N., Farah, H. S., Shalan, N., ... & Oriquat, G. A. (2021). Phenolic content and antioxidant and antimicrobial activities of *Malva sylvestris* L., *Malva oxyloba* Boiss., *Malva parviflora* L., and *Malva aegyptia* L. leaves extract. *Journal of Chemistry*, 2021, 1-10.
- Shahidi, F., & Naczki, M. (2003). *Phenolics in food and nutraceuticals*. CRC press.
- Simirgiotis, M.J. (2013). Antioxidant capacity and HPLC-DAD-MS profiling of Chilean Peumo (*Cryptocarya alba*) fruits and comparison with German Peumo (*Crataegus monogyna*) from Southern Chile. *Molecules*, 18, 2061-2080.
- Simões, M. P., Madeira, M., & Gazarini, L. (2008). The role of phenology, growth and nutrient retention during leaf fall in the competitive potential of two species of Mediterranean shrubs in the context of global climate changes. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 203(7), 578-589.
- Simões, M. P., Madeira, M., & Gazarini, L. (2009). Ability of *Cistus* L. shrubs to promote soil rehabilitation in extensive oak woodlands of Mediterranean areas. *Plant and soil*, 323(1), 249-265.
- Sivakumar, D., & Bautista-Baños, S. (2014). A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop protection*, 64, 27-37
- Skaria, B. P. (2007). *Aromatic plants* (Vol. 1). New Delhi: New India Publishing.
- Skendi, A., Irakli, M., Chatzopoulou, P., Bouloumpasi, E., & Biliaderis, C. G. (2022). Phenolic extracts from solid wastes of the aromatic plant essential oil industry: Potential uses in food applications. *Food Chemistry Advances*, 100065.
- Sokół-Łętowska, A., Oszmiański, J., & Wojdyło, A. (2007). Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap. *Food chemistry*, 103(3), 853-859.
- Soltanian, S., Sheikhabaei, M., & Mohamadi, N. (2017). Cytotoxicity evaluation of methanol extracts of some medicinal plants on P19 embryonal carcinoma cells. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(11), 142-149.
- Stępień, A., Aebisher, D., & Bartusik-Aebisher, D. (2018). Biological properties of *Cistus* species. *European Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 16, 127-132.
- Suhaj, M. (2006). Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 531-537.

- Sullivan, S. A., Tran, A. Q. M., Xu, G., Yin, Y., Zhou, C., & Bae-Jump, V. L. (2017). Asparagus polysaccharide inhibits cell proliferation, adhesion and invasion in endometrial cancer cells. *Gynecologic Oncology*, 145, 133.
- Swamy, M. K., Akhtar, M. S., & Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 3012462.
- Suwansri, S., Khaoprasert, S., Ratanatriwong, P., & Promboon, A. (2008). Natural preservative from Thai mulberry: The antioxidant and antibacterial properties of leaf extracts from different cultivars. *Acta Horticulturae*, 786, 115-124.
- Swapana, N., Jotinkumar, T., Devi, C. B., Singh, M. S., Singh, S. B., & Singh, C. (2012). Total phenolic, total flavonoid contents and antioxidant activity of a few indigenous fruits grown in Manipur. *Bioscan*, 7, 73-76.
- Tadić, V. M., Dobrić, S., Marković, G. M., Đorđević, S. M., Arsić, I. A., Menković, N. R., & Stević, T. (2008). Anti-inflammatory, gastroprotective, free-radical-scavenging, and antimicrobial activities of hawthorn berries ethanol extract. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(17), 7700-7709.
- Tai, J., Cheung, S., Wu, M., & Hasman, D. (2012). Antiproliferation effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells in vitro. *Phytomedicine*, 19(5), 436-443.
- Taleb, S. A., Boutoial, K., Kzaiber, F., & Oussama, A. (2016). Effect of aromatization by aromatic plants on the physicochemical, sensorial and oxidative stability of Moroccan virgin olive oil. *Int. J. Chem. Mater. Environ. Res*, 3, 73-77.
- Tanase, C., Cosarca, S., & Muntean, D.-L. (2019). A critical review of phenolic compounds extracted from the bark of woody vascular plants and their potential biological activity. *Molecules*, 24, 1182.
- Tavassoli, S. K., Mousavi, S. M., Emam-Djomeh, Z., & Razavi, S. H. (2011). Chemical composition and evaluation of antimicrobial properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil. *African Journal of Biotechnology*, 10, 13895-13899.
- Thabti, I., Elfalleh, W., Hannachi, H., Ferchichi, A., & Campos, M.D.G. (2012). Identification and quantification of phenolic acids and flavonol glycosides in Tunisian *Morus* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Journal of Functional Foods*, 4, 367-374.

- Theoduloz, C., Pertino, M. W., Rodríguez, J. A., & Schmeda-Hirschmann, G. (2011). Gastroprotective effect and cytotoxicity of carnosic acid derivatives. *Planta Medica*, 77(9), 882-887.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Batista, I., Serrano, C., Matos, O., ... & Nunes, M. L. (2012). European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Industrial Crops and Products*, 36(1), 81-87.
- Teixeira, S., Mendes, A., Alves, A., & Santos, L. (2007). Simultaneous distillation–extraction of high-value volatile compounds from *Cistus ladanifer* L. *Analytica Chimica Acta*, 584, 439–446.
- Tian, Y. G., Zhang, P., Huang, Y. M., Wang, C. Y., Zhu, S., & Qiao, J. J. (2013). Immunoregulatory functions and active components of ethanol extract from asparagus scraps. *Food Science*, 34(1), 277-280.
- Tripathi, P., & Dubey, N. K. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest biology and Technology*, 32(3), 235-245.
- Tu, Z., Moss-Pierce, T., Ford, P., & Jiang, T. A. (2013). Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract regulates glucose and lipid metabolism by activating AMPK and PPAR pathways in HepG2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(11), 2803-2810.
- Upson, T., & Andrews, S. (2004). The genus *Lavandula*, a botanical magazine monograph. Kew: Royal Botanical Gardens, Kew, UK.
- Van de Braak, S. A. A. J., & Leijten, G. C. J. J. (1999). Essential Oils and Oleoresins: A Survey in The Netherlands and Other Major Markets in the European Union. Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries (CBI), 116.
- Vaquero, M. J. R., Alberto, M. R., & de Nadra, M. C. M. (2007). Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18(5), 587-593.
- Vargas-León, E. A., Díaz-Batalla, L., González-Cruz, L., Bernardino-Nicanor, A., Castro-Rosas, J., Reynoso-Camacho, R., & Gómez-Aldapa, C. A. (2018). Effects of acid hydrolysis on the free radical scavenging capacity and inhibitory activity of the

- angiotensin converting enzyme of phenolic compounds of two varieties of jamaica (*Hibiscus sabdariffa*). *Industrial Crops and Products*, 116, 201-208.
- Vargas-Segura, A. I., Silva-Belmares, S. Y., Segura-Ceniceros, E. P., Ascacio-Valdés, J. A., Méndez-González, L., & Ilyina, A. (2020). Screening and characterization of medicinal plants extracts with bactericidal activity against *Streptococcus mutans*. *Natural product research*, 34(18), 2672-2676.
- Vasileva, I., Denkova, R., Chochkov, R., Teneva, D., Denkova, Z., Dessev, T., ... & Slavov, A. (2018). Effect of lavender (*Lavandula angustifolia*) and melissa (*Melissa officinalis*) waste on quality and shelf life of bread. *Food Chemistry*, 253, 13-21.
- Viapiana, A., Konopacka, A., Waleron, K., & Wesolowski, M. (2017). *Cistus incanus* L. commercial products as a good source of polyphenols in human diet. *Industrial crops and products*, 107, 297-304.
- Vieitez, I., Maceiras, L., Jachmanián, I., & Alborés, S. (2018). Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 133, 58-64.
- Villar-Salvador, P., Nicolás, J. L., Heredia, N., & Uscola, M. (2013). *Quercus ilex* L. Producción y manejo de semillas y plantas forestales, 2, 226-250.
- Vita, J. A. (2005). Polyphenols and cardiovascular disease: Effects on endothelial and platelet function. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 292S-297S.
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3, 2-20.
- Wan, J., Zhong, S., Schwarz, P., Chen, B., & Rao, J. (2019). Physical properties, antifungal and mycotoxin inhibitory activities of five essential oil nanoemulsions: Impact of oil compositions and processing parameters. *Food chemistry*, 291, 199-206.
- Wang, Y., Xiang, L., Wang, C., Tang, C., & He, X. (2013). Antidiabetic and antioxidant effects and phytochemicals of mulberry fruit (*Morus alba* L.) polyphenol enhanced extract. *PloS one*, 8(7), e71144.
- Wang, N., Zhang, X., Wang, S., Guo, Q., Li, Z., Liu, H., & Wang, C. (2020). Structural characterisation and immunomodulatory activity of polysaccharides from white asparagus skin. *Carbohydrate polymers*, 227, 115314.
- Wang, S., & Zhu, F. (2016). Antidiabetic dietary materials and animal models. *Food Research International*, 85, 315-331.



- Weerakkody, N. S., Caffin, N., Turner, M. S., & Dykes, G. A. (2010). In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. *Food Control*, 21(10), 1408-1414.
- Wilson, C. R. (1998). Incidence of weed reservoirs and vectors of tomato spotted wilt tospovirus on Southern Tasmanian lettuce farms. *Plant Pathology*, 47(2), 171-176.
- Wen, P., Hu, T.-G., Linhardt, R. J., Liao, S.-T., Wu, H., & Zou, Y.-X. (2018). Mulberry: A review of bioactive compounds and advanced processing technology. *Trends in Food Science & Technology*, 83, 138-158.
- Xu, G., Kong, W., Fang, Z., Fan, Y., Yin, Y., Sullivan, S. A., ... & Bae-Jump, V. L. (2021). *Asparagus officinalis* exhibits anti-tumorigenic and anti-metastatic effects in ovarian cancer. *Frontiers in Oncology*, 11, 688461.
- Yahia, Y., Benabderrahim, M. A., Tlili, N., Bagues, M., & Nagaz, K. (2020). Bioactive compounds, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from different plant parts of two *Ziziphus* Mill. species. *PloS one*, 15(5), e0232599.
- Yahia, E. M., & Carrillo-Lopez, A. (2018). *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables* (1th ed). Sawston, UK: Woodhead Publishing. ISBN: 978-0-12-813278-4.
- Yang, J. W., & Choi, I. S. (2017). Comparison of the phenolic composition and antioxidant activity of Korean black raspberry, Bokbunja, (*Rubus coreanus* Miquel) with those of six other berries. *CyTA-Journal of Food*, 15(1), 110-117.
- Yang, J.-Y., & Lee, H.-S. (2012). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of morin isolated from mulberry fruits (*Morus alba* L.). *Journal of the Korean Society of Applied Biological Chemistry*, 55, 485-489.
- Yang, L., Yang, C., Li, C., Zhao, Q., Liu, L., Fang, X., & Chen, X. Y. (2016). Recent advances in biosynthesis of bioactive compounds in traditional Chinese medicinal plants. *Science bulletin*, 61(1), 3-17.
- 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.
- Zalegh, I., Akssira, M., Bourhia, M., Mellouki, F., Rhallabi, N., Salamatullah, A. M., ... & Mhand, R. A. (2021). A review on *cistus* sp.: Phytochemical and antimicrobial activities. *Plants*, 10(6), 1214.
- Zhang, H., Birch, J., Xie, C., Yang, H. & El-Din Bekhit, A. (2019). Optimization of ultrasound-assisted extraction method for phytochemical compounds and in-vitro

- antioxidant activity of New Zealand and China *Asparagus* cultivars (*officinalis* L.) roots extracts. *Food Chemistry*, 294, 276-284.
- Zhang, Q., Zhang, F., Thakur, K., Wang, J., Wang, H., Hu, F., ... & Wei, Z. J. (2018). Molecular mechanism of anti-cancerous potential of Morin extracted from mulberry in Hela cells. *Food and Chemical Toxicology*, 112, 466-475.
- Zhao, J. J. (2012). Biological activity of woody stem of *Asparagus officinalis* L. (Doctoral dissertation). East China Normal University.
- Zin, N. M., Karim, A. A., Latifah, S. Y., & Mamot, S. (2002). Synergistic cytotoxic activity of the ethanolic extracts of *Grifola frondosa* and *Morus alba* on HepG2 cells. *Planta Medica*, 68(05), 465-467.
- Zohra, S. F., Meriem, B., & Samira, S. (2013). Fatty acids profile and antimicrobial activities of the seed oil of *Malva sylvestris* L. from Algeria. *International Journal of Chemistry, Environment and Biological Sciences*, 1(2), 233-235.
- Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food chemistry*, 114(1), 310-316.
- Zuzarte, M., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Cruz, M. T., Benzarti, A., Marongiu, B., & Salgueiro, L. (2013). Antifungal and anti-inflammatory potential of *Lavandula stoechas* and *Thymus herba-barona* essential oils. *Industrial Crops and Products*, 44, 97-103.