

COMPOSICIÓN QUÍMICA Y FTIR DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* Y *Ruta graveolens*

CHEMICAL COMPOSITION AND FTIR OF ETHANE EXTRACTS OF *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* and *Ruta graveolens*

Rómulo Bañuelos-Valenzuela¹, Lucía Delgadillo-Ruiz^{2*}, Francisco Echavarría-Cháirez³,
Olivia Delgadillo-Ruiz⁴, Carlos Meza-López¹

¹Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Zacatecas, Km 31.5 de la carretera panamericana tramo Zacatecas-Fresnillo. ²Laboratorio de Biotecnología, Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas, Avenida preparatoria s/n colonia Hidráulica, Zacatecas, Zacatecas. (delgadillolucia@gmail.com). ³INIFAP, Centro de Investigación Regional Norte Centro Campo Experimental Zacatecas, Calera de Víctor Rosales, Zacatecas. ⁴Campus San Luis Potosí, Colegio de Postgraduados. 78600. San Luis Potosí.

RESUMEN

Los principios activos en las plantas aromáticas pueden ser relevantes en la interacción planta-planta y fuente primaria de uno o más compuestos bioquímicos. Los factores genéticos, agronómicos y ambientales determinan el uso de los extractos de plantas como agentes antimicrobianos, antifúngicos y antioxidantes. La hipótesis fue que los compuestos bioactivos de los extractos son compuestos fenólicos. El objetivo fue analizar la composición química y espectroscopia de infrarrojo, con transformación de Fourier (FTIR), los extractos etanólicos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* y *Ruta graveolens* recolectadas en los municipios de Villa de Cos, Valparaíso y Calera de Víctor Rosales, Zacatecas, México. La recolección de las plantas fue aleatoria en primavera y verano de 2014 y 2015. Once muestras (20 g en base seca) se analizaron, dos de *R. graveolens* y tres de las otras especies. Los extractos se prepararon con etanol 70 %. Además del perfil químico (pruebas cualitativas) y composición química por cromatografía de gases (pruebas cuantitativas) se determinó la estructura química, mediante FTIR. En los extractos de las cuatro especies se identificaron insaturaciones y ésteres; además, se identificaron en *L. tridentata* carbohidratos y flavonoides, en *O. vulgare* carbohidratos, flavonoides y saponinas, en *A. ludoviciana* cumarinas y saponinas y en *R. graveolens* flavonoides y saponinas. La composición química mostró presencia de: timol, carvacrol, terpineno, linalol y limoneno en concentraciones diferentes. El análisis FTIR

ABSTRACT

The active principles of aromatic plants can be relevant in the plant-plant interaction and primary source of one or more biochemical compounds. The genetic, agronomic and environmental factors determine the use of the extracts of plants as antimicrobial, antifungal and antioxidant agents. The hypothesis of this study was that the bioactive compounds of the extracts are phenolic compounds. The objective was to analyze the chemical composition and infrared spectroscopy, with Fourier transformation (FTIR), the ethanolic extracts of *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* and *Ruta graveolens* collected in the municipalities of Villa de Cos, Valparaíso and Calera de Víctor Rosales, Zacatecas, Mexico. The collection of the plants was random in Spring and Summer of 2014 and 2015. Eleven samples (20 g, dry base) were analyzed, two of *R. graveolens* and three of the other species. The extracts were prepared with ethanol 70 %. In addition to the chemical profile (qualitative tests) and chemical composition by gas chromatograph (quantitative tests), the chemical structure was determined through FTIR. Unsaturates and esters were identified in the extracts of the four species; in addition, carbohydrates and flavonoids were identified in *L. tridentata*, in *O. vulgare*, carbohydrates, flavonoids and saponins, in *A. ludoviciana*, coumarins and saponins and in *R. graveolens*, flavonoids and saponins. The chemical composition showed the presence of thymol, carvacrol, terpinene, linalol and limonene in different concentrations. The FTIR analysis showed presence of groups C=C aromatics, groups C-O, links C-H, rings C=O, vibration of the aliphatic CH₂ group and vibration of the hydroxyl group. The qualitative and quantitative analyses made it possible to identify phenolic compounds, and with FTIR the chemical structure of the extracts was identified.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: noviembre, 2016. Aprobado: febrero, 2017.

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 52: 309-321. 2018.

Key words: extracts, chemical profile, chemical composition, phenolic compounds.

mostró presencia de grupos C=C aromáticos, grupos C-O, enlaces C-H, anillos C=O, vibración del grupo CH₂ alifático y vibración del grupo hidroxilo. Los análisis cualitativos y cuantitativos permitieron identificar compuestos fenólicos y con FTIR se identificó la estructura química de los extractos.

Palabras clave: extractos, perfil químico, composición química, compuestos fenólicos.

INTRODUCCIÓN

Los principios activos de las plantas aromáticas pueden repercutir en las interacciones planta-planta, porque influyen en el crecimiento, supervivencia o reproducción de otros organismos (Aliotta *et al.*, 1989; Vokou, 1992). Los antioxidantes de las plantas están relacionados específicamente con oxidrilos fenólicos, que tienen efecto en los radicales libres y las moléculas mediadoras en la regulación de procesos fisiológicos (Dröge, 2002). Los radicales libres son altamente reactivos porque tienen un electrón desapareado o libre y tienden a captar un electrón de moléculas estables y alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre sustrajo el electrón, la molécula estable que se lo cedió se transforma en radical libre, por quedar con un electrón desapareado, y así se inicia una reacción en cadena que destruye a las células (Avello y Suwalsky, 2006). Frente a agresiones externas, como infecciones y contaminantes ambientales, los radicales libres tienden a incrementarse, con daños mayores para las células (Dröge, 2002).

Los metabolitos secundarios de las plantas aromáticas son responsables de su olor (terpenos), pigmentación (quinonas y taninos) y sabor (terpenos). Algunos de los extractos de esas plantas son compuestos naturales, mezcla de varios compuestos, como terpenoides y fenoles, a los que se les atribuyen propiedades antisépticas, antifúngicas, antioxidantes y antitumorales (Uedo *et al.*, 1999). Los extractos contienen monoterpenos (C10), moléculas que constituyen 90 % de los aceites esenciales, existen en gran variedad de estructuras y se componen de radicales funcionales como carbuos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres, peróxidos y fenoles (Bakkali *et al.*, 2008). También contienen sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) y los politerpenos (C > 40) (Burt, 2004).

INTRODUCTION

The active principles of the aromatic plants can have repercussions in the plant-plant interactions, because they influence the growth, survival, or reproduction of other organisms (Aliotta *et al.*, 1989; Vokou, 1992). The antioxidants of the plants are specifically related to phenolic oxydrils, which have an effect on the free radicals and the mediating molecules in the regulation of physiological processes (Dröge, 2002). The free radicals are highly reactive because they have an unpaired or free electron and tend to capture an electron of stable molecules and reach their electrochemical stability. Once the free radical has subtracted the electron, the stable molecule that ceded it is transformed to a free radical, as a result of being left with an unpaired electron, and thus a chain reaction is initiated which destroys the cells (Avello and Suwalsky, 2006). Against external aggressions, such as infections and environmental contaminants, the free radicals tend to increase, resulting in greater damage to the cells (Dröge, 2002).

The secondary metabolites of aromatic plants are responsible for their aroma (terpenes), pigmentation (quinones and tannins) and flavor (terpenes). Some of the extracts of these plants are natural compounds, mixture of various compounds, such as terpenoids and phenols, to which antiseptic, antifungal, antioxidant and antitumoral properties are attributed (Uedo *et al.*, 1999). The extracts contain monoterpenes (C10), molecules that comprise 90 % of the essential oils, existing in a great variety of structures and are comprised of functional radicals such as carburates, alcohols, aldehydes, ketones, esters, peroxides and phenols (Bakkali *et al.*, 2008). They also contain sesquiterpenes (C15), diterpenes (C20), triterpenes (C30), tetrapenes (C40) and the polyterpenes (C>40) (Burt, 2004).

The active principles, which exert an antimicrobial effect, in plant extracts can be phenolic compounds, coumarins, flavonoids, tannins and the quinones (Cowan, 1999). Of these, the phenolic compounds and the terpenoids present the highest antimicrobial activity (Ultee *et al.*, 2000).

The plant extracts obtained with organic solvents and distillation are combinations of cyclic hydrocarbons and their derived alcohols, aldehydes

Los principios activos, que ejercen efecto antimicrobiano, en los extractos de plantas pueden ser compuestos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos y las quinonas (Cowan, 1999). De ellos los compuestos fenólicos y los terpenoides muestran la actividad antimicrobiana mayor (Ultee *et al.*, 2000).

Los extractos de plantas extraídos con disolventes orgánicos y destilación son combinaciones de hidrocarburos cíclicos y sus alcoholes, aldehídos o ésteres derivados. Inouye *et al.* (2001) observaron que los aceites con un aldehído o un fenol como componente principal fueron los más activos frente a bacterias del tracto respiratorio, le siguieron los alcoholes y, en menor grado, los aceites que contienen cetonas, ésteres o hidrocarburos.

La actividad de un aceite esencial está relacionada con la configuración estructural, grupos funcionales de sus compuestos y posibles sinergias entre estos (Dorman y Deans, 2000). La mayoría de los compuestos bioactivos de los extractos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* y *Ruta graveolens* son de tipo fenólico. El objetivo de este estudio fue determinar la composición química y espectroscopia de infrarrojo con transformación de Fourier (FTIR) de los extractos etanólicos recolectados en tres municipios del centro del estado de Zacatecas, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Región de estudio y recolección de muestras

Las plantas se recolectaron al azar, en ambiente silvestre durante la primavera-verano del 2014 y 2015, en tres municipios del estado de Zacatecas: *Larrea tridentata* y *A. ludoviciana* en Villa de Cos (23° 17' 42" N, 102° 20' 24" O), *O. vulgare* en Valparaíso (22° 46' 12" N, 103° 34' 14" O) y *R. graveolens* en Calera de Víctor Rosales (23° 27' 00" N, 102° 55' 00" O), y estos lugares tienen características climáticas adecuadas para el desarrollo de las plantas. Después de la recolección las plantas se mantuvieron dos semanas a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C), luego a 45 °C por 24 h para deshidratarlas, se trituraron y almacenaron en bolsas plásticas hasta que se usaron.

Obtención de los extractos de plantas

La extracción se hizo con 20 g de la muestra triturada y 300 mL de etanol al 70 % (J.T. Baker®) como disolvente, en frasco color ámbar de 1 L (Pesewu *et al.*, 2008). La muestra se mezcló

or esters. Inouye *et al.* (2001) observed that the oils with an aldehyde or a phenol as principal component were the most active against bacteria of the respiratory tract, followed hydrocarbons.

The activity of an essential oil is related to the structural configuration, functional groups of its compounds and possible synergies among them (Dorman and Deans, 2000). Most of the bioactive compounds of the extracts of *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* and *Ruta graveolens* are of a phenolic type. The objective of the present study was to determine the chemical composition and infrared spectroscopy with Fourier transformation (FTIR) of the ethanolic extracts collected in three municipalities of the central part of the state of Zacatecas, Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Region of study and collection of samples

The samples were collected randomly, in a wild environment during the Spring-Summer of 2014 and 2015, in three municipalities of the state of Zacatecas: *Larrea tridentata* and *A. ludoviciana* in Villa de Cos (23° 17' 42" N, 102° 20' 24" W), *O. vulgare* in Valparaíso (22° 46' 12" N, 103° 34' 14" W) and *R. graveolens* in Calera de Víctor Rosales (23° 27' 00" N, 102° 55' 00" W). These locations have adequate climatic conditions for the development of the plants. After collecting the plants, they were maintained for two weeks at room temperature (approximately 20 °C), then at 45 °C for 24 h to dehydrate them, and stored in plastic bags until they were used.

Obtainment of the plant extracts

The extraction was made with 20 g of the triturated sample and 300 mL of ethanol at 70 % (J.T. Baker®) as solvent, in amber 1 L jars (Pesewu *et al.*, 2008). The sample was mixed vigorously for 10 min, and left to set one month at room temperature (20 °C). The supernatant was filtered with Whatman No. 2 paper and the solvent was evaporated in a Soxhlet type extractor at 85 °C. Three aliquots were obtained and maintained at < 20 °C for later analysis.

Qualitative tests of chemical profile

The chemical profile of the extracts was obtained according to what was described by Dominguez (1973), in 10 mL test tubes and includes the following procedures.

con vigor por 10 min, y reposó un mes a temperatura ambiente (20 °C). El sobrenadante se filtró con papel Whatman No. 2 y el disolvente se evaporó en un extractor tipo Soxhlet a 85 °C. Tres alícuotas se obtuvieron y mantuvieron a < 20 °C para su análisis posterior.

Pruebas cualitativas de perfil químico

El perfil químico de los extractos se obtuvo de acuerdo con lo descrito por Domínguez (1973), en tubos de ensayo 10 mL e incluyó lo descrito a continuación.

Prueba con KMnO_4 para detectar insaturaciones

Muestras de 1 a 2 mg se resuspendieron en 1 mL de metanol y se añadió gota a gota KMnO_4 (SIGMA) al 2 % en agua. La prueba fue positiva cuando hubo decoloración o formación de precipitado café (formación de dióxido de magnesio).

Prueba con FeCl_3 para detectar oxidrilos fenólicos (taninos vegetales)

Muestras de 1 a 2 mg se resuspendieron en 1 mL de agua y se añadieron unas gotas de FeCl_3 (III) al 12.5 % en agua. La prueba fue positiva cuando se formó precipitado rojo, azul-violeta o verde.

Prueba de Liebermann-Burchard para detectar esteroides y triterpenos

El reactivo preparado con 1 mL de ácido acético y 1 mL de cloroformo mezclados, enfriado a 0 °C, con ácido sulfúrico añadido gota a gota hasta que no hubo reacción química y se añadió gota a gota a la muestra. La prueba fue positiva cuando se desarrollaron colores azul, verde, rojo o anaranjado en el tiempo.

Prueba de Salkowski para detectar esteroides y triterpenos

En 1 o 2 mg del extracto se añadió 1 mL de ácido sulfúrico. La prueba fue positiva para esteroides o metilesteroides cuando se desarrollaron colores amarillo o rojo.

Prueba detectar cumarinas

De 1 a 2 mg de muestra se disolvieron en NaOH al 10 %. La prueba fue positiva cuando se desarrolló coloración amarilla que se eliminó al acidular la mezcla.

Test with KMnO_4 to detect unsaturations

Samples of 1 to 2 mg were resuspended in 1 mL of methanol, and KMnO_4 (SIGMA) was added drop by drop at 2 % in water. The test was positive when there was discoloration or formation of brown precipitate (formation of magnesium dioxide).

Test with FeCl_3 to detect phenolic oxydrils (vegetable tannins)

Samples of 1 to 2 mg were resuspended in 1 mL of water and some drops of FeCl_3 (III) at 12.5 % in water were added. The test was positive when red, blue-violet or green precipitate was formed.

Liebermann-Bouchard test to detect sterols and triterpenes

The reactive prepared with 1 mL of acetic acid and 1 mL of chloroform mixed, cooled to 0 °C, with sulfuric acid added drop by drop until there was no chemical reaction, added drop by drop to the sample. The test was positive when colors blue, green, red or orange developed in the time.

Salkowski test to detect sterols and triterpenes

1 mL of sulfuric acid was added in 1 or 2 mg of the extract. The test was positive for sterols or methylsterols when yellow or red colors appeared.

Test to detect coumarins

1 to 2 mg of sample were dissolved in NaOH at 10 %. The test was positive when it developed yellow coloration which was eliminated by acidulating the mixture.

Baljet test to detect sesquiterpenlactones

1 to 2 mg of the extract were mixed with 3 or 4 drops of the mixture solution. The test was positive when the coloration changed from orange to dark red.

Test of the H_2SO_4 to detect flavonoids

1 to 2 mg of the sample were dissolved in H_2SO_4 . Yellow coloration indicated the presence of flavonoids, orange-maroon that of flavons, bluish-red that of chalcones and reddish-purple that of quinones.

Prueba de Baljet para detectar sesquiterpenlactonas

De 1 a 2 mg del extracto se mezclaron con 3 o 4 gotas de la solución mezcla. La prueba fue positiva cuando la coloración cambió de anaranjado a rojo oscuro.

Prueba del H_2SO_4 para detectar flavonoides

De 1 a 2 mg de la muestra se disolvieron en H_2SO_4 . La coloración amarilla indicó la presencia de flavonoides, naranja-guinda la de flavonas, rojo-azuloso la de chalconas y rojo-púrpura la de quinonas.

Prueba de Shinoda para flavonoides

En un tubo de ensaye se colocaron 1 a 2 mg de muestra y 1 mL de etanol, se agregó limadura de magnesio (0.5 g) y tres gotas de HCl concentrado. La presencia de flavonoides se comprobó al desarrollarse coloración anaranjada, roja, rosa, azul y violeta.

Prueba de Dragendorff para detectar alcaloides

En 1 o 2 mg de muestra se añadieron dos o tres gotas de los reactivos A (nitrato de bismuto y ácido acético glacial) y B (yoduro de potasio). La coloración anaranjada a rojiza se consideró positiva.

Composición química del extracto por cromatografía de gases

La composición química se determinó en un cromatógrafo de gases (CG; Agilent Technologies serie 6890N, EUA), con columna polar DB_WAXetr, a 250 °C y 12.13 psi, flujo de 36.5 mL de $He\ min^{-1}$. Las condiciones para la columna fueron: temperatura inicial 50 °C, de 0 a 2 min, aumento de 10 en 10 °C hasta 250 °C, constantes por 5 min, disminución a 50 °C por 2 min con flujo de 1.6 mL de $He\ min^{-1}$ a 12.13 psi y velocidad promedio de 25 $cm\ s^{-1}$, el detector utilizado fue de flama ionizante (FID) a 210 °C con flujo de 40 mL de $H_2\ min^{-1}$ y un flujo de 450 mL de aire min^{-1} . Los estándares (Sigma-Aldrich) se utilizaron en varias concentraciones (Cuadro 1).

Estructura química del extracto por Espectroscopia Infrarroja con Transformación de Fourier (FTIR)

Los análisis de espectroscopía se efectuaron en un equipo Thermo scientific (marca Nicolet™ iS50™, EUA), con celda dispersiva; los gráficos se elaboraron con OriginPro 8. Los espectros

Shinoda test for flavonoids

1 to 2 mg of sample and 1 mL of ethanol were placed in a test tube, magnesium filings were added (0.5 g) and three drops of concentrated HCl. The presence of flavonoids was confirmed when orange, red, pink and violet coloration developed.

Dragendorff test to detect alkanoids

Two or three drops of the A (bismuth nitrate and glacial acetic acid) and B (potassium iodate) reactivities were added in 1 or 2 mg of sample. Orange to red coloring was considered positive.

Chemical composition of the extract by gas chromatography

The chemical composition was determined in a gas chromatograph (GC: Agilent Technologies series 6890N, USA), with polar column DB_WAXetr, at 250 °C and 12.13 psi, flow of 36.5 mL of $He\ min^{-1}$. Conditions for the column were: initial temperature 50 °C, from 0 to 2 min, increase of 10 in 10 °C up to 250 °C, constant for 5 min, reduction to 50 °C for 2 min with flow of 1.6 mL of $He\ min^{-1}$ at 12.13 psi and average velocity of 25 $cm\ s^{-1}$. The ionizing flame detector (IFD) was used at 210 °C with flow of 40 mL of $H_2\ min^{-1}$ and a flow of 450 mL of air min^{-1} . The standards (Sigma-Aldrich) were used in various concentrations (Table 1).

Chemical structure of the extract through Infrared Spectroscopy with Fourier Transformation (FTIR)

The spectroscopy analyses were made in a Thermo scientific (Nicolet™ Is50™, USA), with dispersive cell; the graphs were made with OriginPro 8. The spectra were measured in the interval from 600 to 4000 nm, with 32 replications each one and were averaged. Each sample was concentrated in a rotoevaporator (Eppendorf Vacufuge™, USA) at 30 °C for 12 h.

RESULTS AND DISCUSSION

The differences in yield of the extracts of the four species (Table 2) are because of the time that the sample was maintained in the Soxhlet (Albado *et al.*, 2001).

Qualitative tests of chemical profile

The tests of chemical profile of the extracts did not show differences (Table 3).

Cuadro 1. Concentraciones de estándares (mg mL⁻¹) para determinar la composición química de extractos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* y *Ruta graveolens* en cromatógrafo de gases.

Table 1. Concentrations of standards (mg mL⁻¹) to determine the chemical composition of extracts of *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* and *Ruta graveolens* in gas chromatograph.

Estándar	Timol	Carvacrol	Linalol	Terpineno	Limoneno
1	10.373	8.284	7.744	7.154	8.496
2	5.186	4.142	3.872	3.577	4.248
3	2.593	2.071	1.936	1.789	2.124
4	1.297	1.035	0.968	0.894	1.062
5	0.648	0.518	0.484	0.447	0.531
6	0.324	0.259	0.242	0.224	0.265

se midieron en el intervalo de 600 a 4000 nm, con 32 repeticiones cada uno y se promediaron. Cada muestra se concentró en rotaevaporador (Eppendorf Vacufuge™, EUA) a 30 °C por 12 h.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las diferencias del rendimiento de los extractos de las cuatro especies (Cuadro 2) se deben al tiempo que la muestra se mantuvo en el equipo Soxhlet (Albado *et al.*, 2001).

Pruebas cualitativas de perfil químico

Las pruebas de perfil químico de los extractos no mostraron diferencias (Cuadro 3).

The diluted extract 3 of *L. tridentata* was positive because it was not subjected to temperature changes and conserved its chemical structure. The diluted *O. vulgare* extract was negative in the test of H₂SO₄ because its compounds were found in a lower quantity than in extracts four and five of *O. vulgare* that were concentrated.

The extract of *L. tridentata* presented unsaturations, esters, carbohydrates and flavonoids. The *in vitro* cultivation conditions can favor the synthesis of metabolites which under natural conditions would not occur (Garza *et al.*, 2010). The extracts of *O. vulgare* were positive for unsaturations, esters, carbohydrates, flavonoids and saponins, and specifically for flavonoids. In extracts of *O. vulgare*

Cuadro 2. Rendimiento de los extractos (20 g de materia seca y 300 mL de etanol) analizados en 2014 y 2015.
Table 2. Yield of the extracts (20 g of dry matter and 300 mL of ethanol) analyzed in 2014 and 2015.

Número de muestra	Extracto	Volumen extracto (mL)	Rendimiento (% W/W)
1 †	<i>L. tridentata</i> (2014)	35	11.66
2	<i>L. tridentata</i> (2015)	40	13.33
3	<i>L. tridentata</i> diluido [‡] (2015)	90	30
4	<i>O. vulgare</i> (2014)	41.5	13.83
5	<i>O. vulgare</i> (2015)	30	10
6	<i>O. vulgare</i> diluido [‡] (2015)	120	44
7	<i>A. ludoviciana</i> (2014)	36	12
8	<i>A. ludoviciana</i> (2015)	17.95	5.98
9	<i>A. ludoviciana</i> diluido [‡] (2015)	105	35
10	<i>R. graveolens</i> (2014)	31.5	10.5
11	<i>R. graveolens</i> diluido (2015)	150	50

†En la primera columna está el número de identificación de la muestra ♦ The first column shows the identification number of the sample.

‡Extracto diluido, con menos tiempo de evaporación y rendimiento mayor en estos extractos ♦ Diluted extract, with less evaporation time and higher yield in these extracts.

Cuadro 3. Pruebas cualitativas de perfil químico de extractos de plantas.**Table 3. Qualitative tests of chemical profile of plant extracts.**

Pruebas cualitativas		Número de muestra										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Insaturaciones	Prueba de KMnO_4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ésteres	Prueba de Salkowski	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Carbohidratos	Prueba de cumarinas	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Prueba de lactonas	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Flavonoides	Prueba de H_2SO_4	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	Prueba de Shinada	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Alcaloides	Prueba de Dragendorff	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saponinas	Prueba de agitación	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
	Prueba de NaHCO_3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

El extracto tres diluido de *L. tridentata* fue positivo porque no se sometió a cambios de temperatura y conservó su estructura química. El extracto *O. vulgare* diluido fue negativo en la prueba de H_2SO_4 porque sus compuestos estaban en cantidad menor que en los extractos cuatro y cinco de *O. vulgare* que se concentraron.

El extracto de *L. tridentata* mostró insaturaciones, ésteres, carbohidratos y flavonoides. Las condiciones de cultivo *in vitro* pueden favorecer la síntesis de metabolitos que en condiciones naturales no ocurriría (Garza *et al.*, 2010). Los extractos de *O. vulgare* fueron positivos para insaturaciones, ésteres, carbohidratos, flavonoides y saponinas, y específicamente para flavonoides. En extractos de *O. vulgare* se han identificado flavonoides, como crisoeriol, diosmetina, eriodictiol, cosmósido y vicenina-2 (Koukoulitsa *et al.*, 2006), que no se identificaron en este estudio. El extracto de *A. ludoviciana* mostró insaturaciones, ésteres, cumarinas y saponinas, y el de *R. graveolens* mostró insaturaciones, ésteres, flavonoides y saponinas. Lin *et al.* (2007) identificaron en *R. graveolens* los siguientes flavonoides: luteolina, taxifolina, quercetina y naringenina en concentración total de 59.8 mg g⁻¹ seco. En nuestra investigación la variación no se detectó entre los años de cosecha.

Composición química

El análisis en el cromatógrafo de gases fue de 18 min por muestra y el tiempo de retención de terpinene fue limoneno, linalol, timol y carvacrol fue 3.52, 3.62, 4.21, 8.87 y 9.45 min. En los extractos de *L. tridentata*, *O. vulgare*, *A. ludoviciana* y *R. graveolens*

flavonoides were identified, such as chrysoeriol, diosmetin, eriodictiol, cosmocide and vicenine-2 (Koukoulitsa *et al.*, 2006), which were not identified in our study.

The extract of *A. ludoviciana* exhibited unsaturations, esters, coumarins and saponins, and that of *R. graveolens* showed unsaturations, esters, flavonoids and saponins. Lin *et al.* (2007) identified the following flavonoids in *R. graveolens*: luteolin, taxifolin, quercetin and naringenin in total concentration of 59.8 mg g⁻¹ dry. In our investigation variation was not detected between the years of harvest.

Chemical composition

The analyses in the gas chromatograph was 18 min per sample and the retention time of terpinene, limonene, linalol, thymol and carvacrol was 3.52, 3.62, 4.21, 8.87 and 9.45 min. In the extracts of *L. tridentata*, *O. vulgare*, *A. ludoviciana* and *R. graveolens*, carvacrol, thymol, terpinene, linalol and limonene were determined; and in the extracts of *L. tridentata* the compounds of thymol and carvacrol were found in variable concentrations (Table 4).

These results confirm that the medicinal plants studied are rich in terpenes (carvacrol, citral, linalol and geraniol) and phenolic compounds (Cai *et al.*, 2004). The phenolic compounds, such as flavonoids, quercetin, kaempferol and nordihydroguaiaretic acid, are bioactive compounds that can be found in *L. tridentata* (Nakamura *et al.*, 2005; Tapas *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2012) with a different concentration from those of our study.

Cuadro 4. Composición química (mg mL⁻¹) de extractos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* y *Ruta graveolens* obtenida por cromatografía de gases.

Table 4. Chemical composition (mg mL⁻¹) of extracts of *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* and *Ruta graveolens* obtained by gas chromatograph.

Muestra	Extracto	Terpineno	Limoneno	Linalol	Timol	Carvacrol
1	<i>L. tridentata</i> (2014)	0	0	0	4.30	7.80
2	<i>L. tridentata</i> (2015)	0	0	0	2.39	7.55
3	<i>L. tridentata</i> diluido (2015)	0	0	0	0.30	4.43
4	<i>O. vulgare</i> (2014)	0	0.07	0.13	4.19	9.10
5	<i>O. vulgare</i> (2015)	0.06	0	0.10	4.36	10.75
6	<i>O. vulgare</i> diluido (2015)	0	0.07	0.01	0.98	2.47
7	<i>A. ludoviciana</i> (2014)	0.05	0	0.29	0.03	0.05
8	<i>A. ludoviciana</i> (2015)	0	0	0	0	0.02
9	<i>A. ludoviciana</i> diluido (2015)	0	0	0.12	0.01	0.02
10	<i>R. graveolens</i> (2014)	0	0.06	0	0	0
11	<i>R. graveolens</i> diluido (2015)	0	0.06	0	0.01	0.03

se determinó carvacrol, timol, terpinene, linalol y limoneno; y en los extractos de *L. tridentata* se encontraron los compuestos de timol y carvacrol en concentraciones variables (Cuadro 4).

Estos resultados confirman que las plantas medicinales estudiadas son ricas en terpenos (carvacrol, citral, linalol y geraniol) y compuestos fenólicos (Cai *et al.*, 2004). Los compuestos fenólicos, como los flavonoides, quercetina, kaempferol y ácido nordihidroguaiarético, son bioactivos que pueden encontrarse en *L. tridentata* (Nakamura *et al.*, 2005; Tapas *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2012) con una concentración diferente a las de nuestro estudio.

Los extractos cuatro y seis de *O. vulgare* contenían limoneno, y el extracto cinco contenía terpinene. Estos resultados coincidieron con los obtenidos en aceites de orégano que contenían terpineoles, fenoles y compuestos relacionados metabólicamente con el carvacrol (Albado *et al.*, 2001).

El extracto siete de *A. ludoviciana* contenía terpineno, linalol, timol y carvacrol, el extracto ocho contenía solo carvacrol y en el extracto nueve hubo linalol, timol y carvacrol. Estos resultados difirieron de los reportado por Kordali *et al.* (2005), quienes identificaron en *A. ludoviciana* anetol (81 %), beta-ocimeno (6.5 %), limoneno (3.0 %) y metileugenol (1.8 %), y ninguno de estos compuestos se encontró en nuestro estudio. Los contrastes se pueden deber a factores genéticos, agronómicos y ambientales (Sharapin *et al.*, 2000).

Extracts four and six of *O. vulgare* contain limonene, and extract five contains terpinene. These results coincide with those obtained in oregano oils which contain terpineols, phenols and compounds metabolically related with carvacrol (Albado *et al.*, 2001).

Extract seven of *A. ludoviciana* contains terpinene, linalol, thymol and carvacrol, extract eight contained only carvacrol, and in extract nine there was linalol, thymol and carvacrol. These results differ from those reported by Kordali *et al.* (2005), who identified in *A. ludoviciana* anetol (81 %), beta-ocimene (6.5 %), limonene (3.0 %) and methyleugenol (1.8 %), and none of these compounds was found in our study. The contrasts may be due to genetic, agronomic and environmental factors (Sharapin *et al.*, 2000).

The compounds of limonene, thymol and carvacrol were identified in the extracts of *R. graveolens*. In essential oil of *R. graveolens*, De Feo *et al.* (2002) identified nonanone (18.8 %), undecane-2-one (46.8 %), nonan-2-one (18.8 %), decan-2-one (2.2 %) and tridecan-2-one (2.5 %). The terpenoids constituted 11.2 % of the oil with α -pinene (1.3 %), limonene (3 %) and 1,8-cineole (2.9 %) as the principal monoterpenes. The presence of limonene in our study coincided with those results.

The compounds identified in the extracts are important for their pharmacological activity. Limonene is antibacterial, antifungal, antiseptic and antiviral; thymol may be less caustic than

Los compuestos de limoneno, timol y carvacrol se identificaron en los extractos de *R. graveolens*. En aceite esencial de *R. graveolens* De Feo *et al.* (2002) identificaron nonanona (18.8 %), undecan-2-one (46.8 %), nonan-2-one (18.8 %), decan-2-one (2.2 %) y tridecan-2-one (2.5%). Los terpenoides constituyeron 11.2 % del aceite con α -pineno (1.3 %), limoneno (3 %) y 1,8- cineole (2.9 %) como los monoterpenos principales. La presencia de limoneno en nuestro estudio coincidió con esos resultados.

Los compuestos identificados en los extractos son importantes por su actividad farmacológica. El limoneno es antibacteriano, antifúngico, antiséptico y antiviral; el timol puede ser menos cáustico que otros fenoles y es antibacteriano, antifúngico, antiinflamatorio, antioxidante, antirreumático y antiséptico; el carvacrol es antibacteriano, antifúngico, antiinflamatorio, antiséptico, antiespasmódico y expectorante (Sorentino y Landmesser, 2005).

Estructura química del extracto por FTIR

En la determinación de la estructura se emplearon los estándares para cromatografía de gases. Los gráficos de correlación IR expresan las frecuencias de vibración en números de onda y se obtuvieron del FTIR; la técnica se considera de alta resolución y proporciona un espectro de reflexión de las bandas de los grupos funcionales de sustancias inorgánicas y orgánicas, que permite identificarlas (Skoog *et al.*, 2001). Las frecuencias de FTIR se atribuyen al estiramiento y la flexión de vibraciones que caracterizan a los grupos funcionales (Baranska *et al.*, 2005).

Los espectros FTIR mostraron ocho regiones, cada una con tres áreas (Figura 1): 1 (1400-1500 cm^{-1}) correspondiente a CO y CC, vibraciones específicas en grupos fenilo; 2 (1500 a 1600 cm^{-1}) correspondiente al dominio aromático y NH de flexión (Baranska *et al.*, 2005); 3 (1600-1760 cm^{-1}) correspondiente a la flexión NH, estiramientos C=O (aldehídos, cetonas, ésteres) y ácidos grasos libres (1710 cm^{-1}) y glicéridos (1740 cm^{-1}) (Socaciu *et al.*, 2009 a, b).

Las frecuencias de 675 a 920 cm^{-1} en los estándares de carvacrol, timol, linalol, limoneno y terpineno se asociaron con grupos aromáticos C=C, w (C-H) de anillos aromáticos (Adinew, 2014). Las frecuencias de 1050 cm^{-1} en los cinco estándares se asignaron a vibraciones de tensión de C-O, cuyos valores

other phenols and is antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, antioxidant, antirheumatic and antiseptic; carvacrol is antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, antiseptic, antispasmodic and expectorant (Sorentino and Landmesser, 2005).

Chemical structure of the extract by FTIR

In the determination of the structure the standards for gas chromatography were used. The graphs of IR correlation express the frequencies of vibration in wave numbers and were obtained from the FTIR; the technique is considered of high resolution and provides a spectrum of reflection of the bands of the functional groups of inorganic and organic substances, which allows their identification (Skoog *et al.*, 2001). The frequencies of FTIR are attributed to the stretching and flexion of vibrations that characterize the functional groups (Baranska *et al.*, 2005).

The FTIR spectra showed eight regions, each one with three areas (Figure 1): 1 (1400-1500 cm^{-1}) corresponding to CO and CC, specific vibrations in phenyl groups; 2 (1500 to 1600 cm^{-1}) corresponding to the aromatic dominion and NH of flexion (Baranska *et al.*, 2005); 3 (1600-1760 cm^{-1}) corresponding to the NH flexion, stretching C=O (aldehydes, ketones, esters) and free fatty acids (1710 cm^{-1}) and glycerides (1740 cm^{-1}) (Socaciu *et al.*, 2009 a, b).

The frequencies of 675 to 920 cm^{-1} in the standards of carvacrol, thymol, linalol, limonene and terpinene are associated with aromatic groups C=C, w (C-H) of aromatic rings (Adinew, 2014). The frequencies of 1050 cm^{-1} in the five standards were assigned to vibrations of tension of C-O, whose values were reported by Anicuta *et al.* (2010); the values of 1161 to 1233 cm^{-1} corresponded to the ester of groups C-O, which coincided with what was pointed out by Vlachos *et al.* (2006).

The frequencies of 1360 cm^{-1} in the five standards pertained to the deformation of C-O (Martins *et al.*, 2013) and this group was identified in the five standards in frequency of 1440 (Anicuta *et al.*, 2010). The frequencies of 1580 cm^{-1} corresponded to amino groups present in carvacrol, thymol and terpinene. The values 2830 and 2872 cm^{-1} corresponded to symmetric and asymmetric vibrations of aliphatic CH_3 groups, present in carvacrol, thymol and

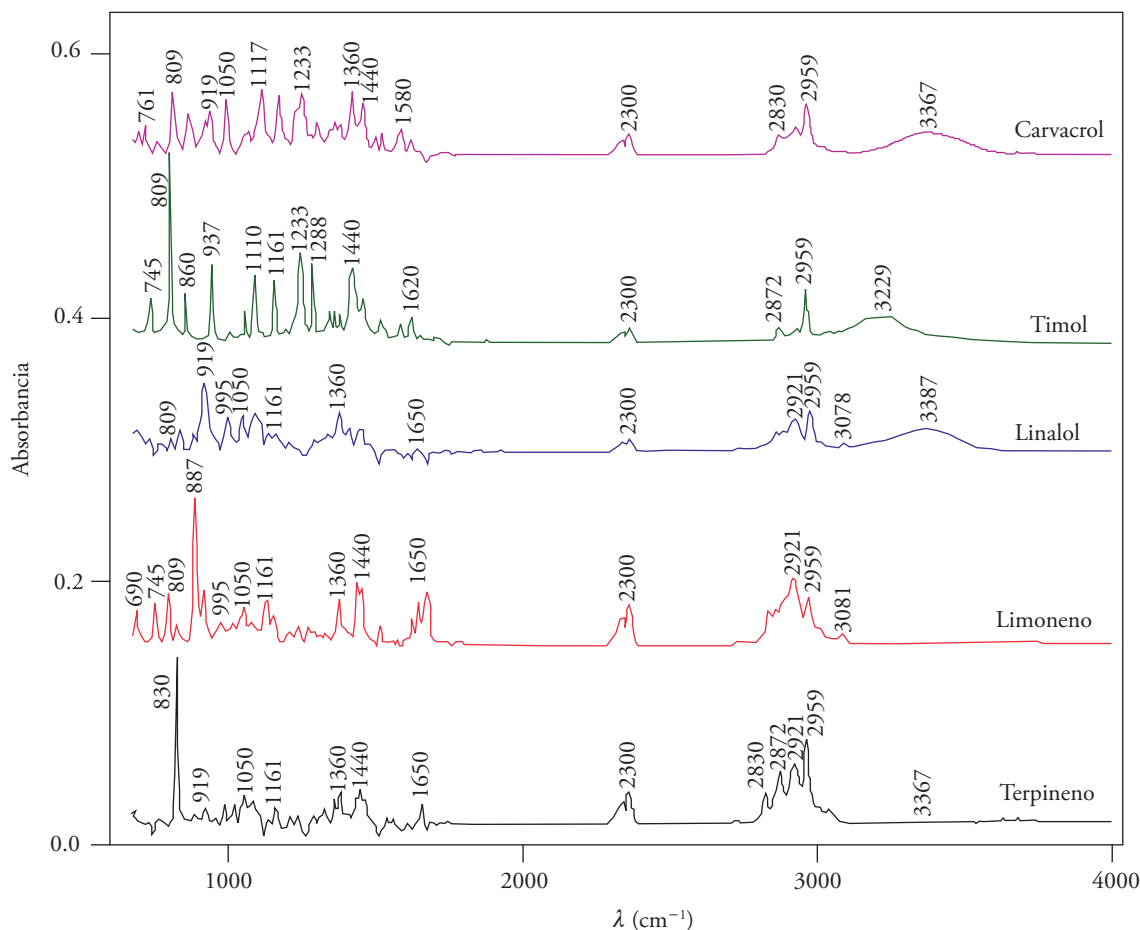


Figura 1. Espectros FTIR de cinco estándares empleados para la determinación química de extractos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisia ludoviciana* y *Ruta graveolens* mediante espectroscopia de infrarrojo.

Figure 1. FTIR spectra of five standards used for the chemical determination of extracts of *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisia ludoviciana* and *Ruta graveolens* through infrared spectroscopy.

fueron reportados por Anicuta *et al.* (2010); los valores de 1161 a 1233 cm^{-1} correspondieron al éster de grupos C-O, lo cual coincidió con lo señalado por Vlachos *et al.* (2006).

Las frecuencias de 1360 cm^{-1} en los cinco estándares pertenecieron a la deformación de C-O (Martins *et al.*, 2013) y este grupo se identificó en los cinco estándares en frecuencia de 1440 cm^{-1} (Anicuta *et al.*, 2010). Las frecuencias de 1580 cm^{-1} correspondieron a grupos amino presentes en carvacrol, timol y terpineno. Los valores 2830 y 2872 cm^{-1} correspondieron a vibraciones simétricas y asimétricas de grupos CH_3 alifático, presentes en carvacrol, timol y terpineno. Las frecuencias de 3300 a 3400 cm^{-1} correspondieron a grupos hidroxilo (O-H), uniones fuertes de hidrógeno, o absorción y estiramiento en carvacrol, linalol y terpineno.

terpinene. The frequencies of 3300 to 3400 cm^{-1} corresponded to hydroxyl groups (O-H), strong bonds of hydrogen, or absorption and stretching in carvacrol, linalol and terpinene.

In thymol, the frequencies of 745 cm^{-1} indicated superposition of oscillating CH_2 groups. The frequency of 809 cm^{-1} belonged to w (C-H) of aromatic rings, and that of 860 cm^{-1} to aromatic groups C-C. (Adinew, 2014). The frequencies of 937, 995 and 1288 cm^{-1} (flexion of bonds CH, CO, CN, CC) were in the five standards. The frequency of 1110 cm^{-1} corresponded to the aromatic skeleton and stretching of C-O present in carvacrol, thymol, linalol and terpinene. The groups O-H absorbed and conjugated to C-O were associated to the frequency of 1620 cm^{-1} in thymol.

En el timol, las frecuencias de 745 cm^{-1} indicaron superposición de grupos CH_2 oscilantes. La frecuencia de 809 cm^{-1} perteneció a w (C-H) de anillos aromáticos, y la de 860 cm^{-1} a grupos aromáticos C-C (Adinew, 2014). Las frecuencias de 937, 995 y 1288 cm^{-1} (flexión de enlaces CH, CO, CN, CC) estuvieron en los cinco estándares. La frecuencia de 1110 cm^{-1} correspondió al esqueleto aromático y estiramiento de C-O presente en carvacrol, timol, linalol y terpineno. Los grupos O-H absorbido y conjugado a C-O se asociaron a la frecuencia de 1620 cm^{-1} en timol.

La frecuencia de 2872 cm^{-1} en timol indicó vibraciones simétricas y asimétricas del grupo CH_3 alifático. Las frecuencias de 2959 a 2962 cm^{-1} pertenecen a grupos de estiramiento CH_2 y a grupos metilo en anillos fenólicos (Wu *et al.*, 2012) en los cinco estándares. El estiramiento O-H se encontró en la frecuencia 3259 cm^{-1} en el timol.

Las frecuencias de 995 cm^{-1} en linalol y limoneno correspondieron a la zona de la huella dactilar de la flexión de enlaces CH, CO, CN y CC. La frecuencia de 1650 cm^{-1} en linalol, limoneno y terpineno indicó la presencia de anillos C=O de aldehídos. Linalol, limoneno y terpineno presentaron vibraciones simétricas y asimétricas del grupo CH_2 alifático con 2921 cm^{-1} . López *et al.* (2014) indicaron que entre las frecuencias de 3000 y 3100 cm^{-1} se identificaron anillos aromáticos, los cuales se observaron en linalol y limoneno.

Las frecuencias sobresalientes de los extractos fueron 881 cm^{-1} , 1047 cm^{-1} , 1360 cm^{-1} , 1440 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} , 2921 cm^{-1} , 2959 cm^{-1} y 3367 cm^{-1} pertenecientes a C=C de grupos aromáticos (Adinew, 2014), vibración de tensión de C-O (Anicuta *et al.*, 2010), deformación de C-H (Martins *et al.*, 2013), grupos C-O (Anicuta *et al.*, 2010), anillo C=O de aldehídos (Adinew, 2014), vibración simétrica y asimétrica del grupo CH_2 alifático (Vlachos *et al.*, 2006) y grupos hidroxilo (Martins *et al.*, 2013) (Figura 2).

CONCLUSIONES

La presencia de grupos fenólicos se confirmó con técnicas cualitativas y con la técnica cuantitativa de cromatografía de gases se identificaron los compuestos fenólicos en extractos de *L. tridentata*, *O. vulgare*, *A. ludoviciana* y *R. graveolens*. El año de recolección de las plantas no influye en el perfil químico de los

The frequency of 2872 cm^{-1} in thymol indicated symmetric and asymmetric vibrations of the group aliphatic CH_3 . The frequencies of 2959 to 2962 cm^{-1} pertain to groups of stretch CH_2 and to methyl groups in phenolic rings (Wu *et al.*, 2012) in the five standards. The stretch O-H was found in the frequency 3259 cm^{-1} in the thymol.

The frequencies of 995 cm^{-1} in linalol and limonene corresponded to the zone of the fingerprint of the flexion of bonds CH, CO, CN and CC. The frequency of 1650 cm^{-1} in linalol, limonene and terpinene indicated the presence of C=O rings of aldehydes. Linalol, limonene and terpinene presented symmetric and asymmetric vibrations of the aliphatic group CH_2 with 2921 cm^{-1} . López *et al.* (2014) indicated that between the frequencies of 3000 and 3100 cm^{-1} , aromatic rings were identified, which were observed in linalol and limonene.

The outstanding frequencies of the extracts were 881 cm^{-1} , 1047 cm^{-1} , 1360 cm^{-1} , 1440 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} , 2921 cm^{-1} , 2959 cm^{-1} and 3367 cm^{-1} pertaining to C=C of aromatic groups (Adinew, 2014), vibration of tension of C-O (Anicuta *et al.*, 2010), deformation of C-H (Martins *et al.*, 2013), groups C-O (Anicuta *et al.*, 2010), ring C=O of aldehydes (Adinew, 2014), symmetric and asymmetric vibration of the group aliphatic CH_2 (Vlachos *et al.*, 2006) and hydroxyl groups (Martins *et al.*, 2013) (Figure 2).

CONCLUSIONS

The presence of phenolic groups was confirmed with qualitative techniques and with the quantitative technique of gas chromatography the phenolic compounds were identified in extracts of *L. tridentata*, *O. vulgare*, *A. ludoviciana* and *R. graveolens*. The year of collection of the plants does not influence the chemical profile of the extracts. The technique of spectroscopy makes it possible to confirm the chemical composition of the extracts of plants determined with chemical methods. The frequencies of CO-CH, of the FTIR spectra, were distinctive for each extract analyzed. This technique has advantages because it is simple, reliable and exact compared with the conventional chemical techniques.

—End of the English version—



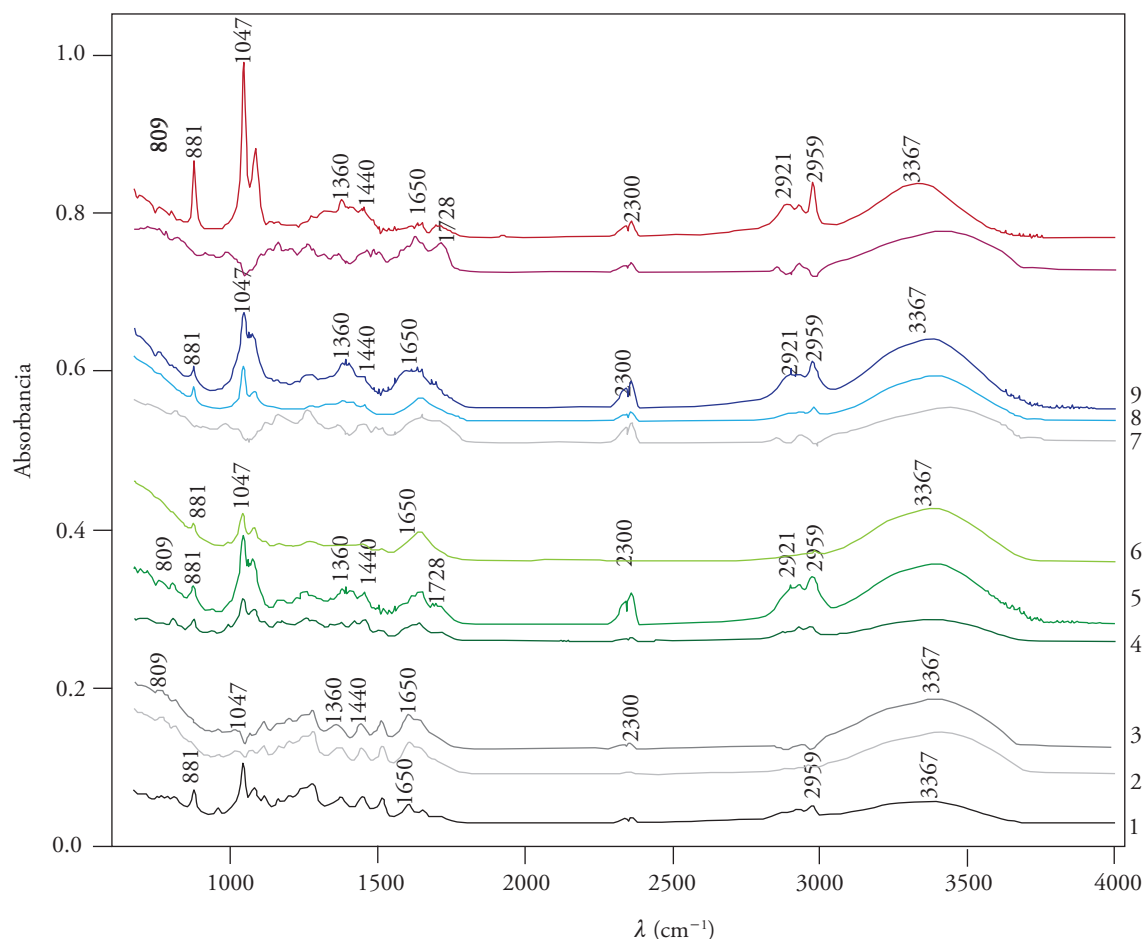


Figura 2. Espectros FTIR de extractos de *Larrea tridentata* (1, 2, 3), *Origanum vulgare* (4, 5, 6), *Artemisa ludoviciana* (7, 8, 9) y *Ruta graveolens* (10, 11).

Figure 2. FTIR spectra of extracts of *Larrea tridentata* (1, 2, 3), *Origanum vulgare* (4, 5, 6), *Artemisa ludoviciana* (7, 8, 9) and *Ruta graveolens* (10, 11).

extractos. La técnica de espectroscopía permite corroborar la composición química de extractos de plantas determinada con métodos químicos. Las frecuencias de CO-CH, de los espectros FTIR, fueron distintivas para cada extracto analizado. Esta técnica presenta ventajas porque es sencilla, confiable y exacta en comparación con las técnicas químicas convencionales.

LITERATURA CITADA

- Adinew, B. 2014. GC-MS and FT-IR analysis of constituents of essential oil from *Cinnamon bark* growing in South-west of Ethiopia. *Int. J. Herb. Med.* 1: 22-31.
- Albado P, E., G. Sáez F, y S. Grabiell A. 2001. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Rev. Med. Hered.* 12: 16-19.
- Aliotta, G., L. De Napoli, and G. Piccialli. 1989. Inhibition of seedling growth by *Anagallis arvensis* extracts. *Nuovo Giorn. Bot. Ital.* 123: 291-296.
- Anicuta, S. G., L. Dobre, M. Stroescu, and I. Jipa. 2010. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for characterization of antimicrobial films containing chitosan. *Analele Universităţii Nii din Oradea Fascicula: Ecotoxicologie, Zootehnie şi Tehnologii de Industrie Alimentară.* pp: 1234-1240.
- Avello, M, and M. Suwalsky. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Conceptión)* 494: 161-172.
- Bakkali, F, S. Averbeck, D. Averbeck, and M. Idaomar. 2008. Biological effects of essential oils a review. *Food Chem. Toxicol.* 46: 446-475.
- Baranska M., H. Schulz, H. Kruger, and R. Quilitzsch, 2005. Chemotaxonomy of aromatic plants of the genus *Origanum* via vibrational spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* 381: 1241-1247.

- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223–253.
- Cai Y., Q. Luo, M. Sun, and H. Corke. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* 74: 2157–2184.
- Cowan M. M. 1999: Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 564–582.
- De Feo, V., F. De Simone and F. Senatore. 2002. Potential allelic chemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry* 61: 573–578.
- Domínguez X., A. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa. México. 281 p.
- Dorman H. J., and S. G. Deans S. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88: 308–316.
- Dröge W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47–95.
- Garza A., O. López R., R. Vega, and E. Soto. 2010. The aminoglycosides modulate the acid-sensing ionic channel currents in dorsal root ganglion neurons from the rat. *J. Pharm. Exp. Ther.* 332: 489–499.
- Inouye S., T. Takizawa, and H. Yamaguchi. 2001. Antibacterial activity of essential oils and their mayor constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J. Antimicrob. Chemother.* 47: 565–573.
- Kordali S., R. Kotan, A. Mavi, and A. Cakir. 2005. Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish *Artemisia* species. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1408–1416.
- Koukoulitsa, C., A. Karioti, M. C. Bergonzi, G. Pescitelli, L. Di Bari, and H. Skaltsa. 2006. Polar constituents from the aerial parts of *Origanum vulgare* L. Ssp. *hirtum* growing in Greece. *J. Agric. Food Chem.* 54: 5388–5392.
- Lin, L. Z., S. Mukhopadhyay, R. J. Robbins, J. M. and Harnly. 2007. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *J. Food Comp. Anal.* 20: 361–369.
- López R., D., P. Rhenals M., M. A. Tangarife Z., K. Vega O., J. L. Rendon C., Y. Vélez S., y M. E. Ramírez C. 2014. Tratamiento de residuos de poliestireno expandido utilizando solventes verdes. *Rev. Investig. Apl.* 8: 1–9.
- Martins, S., N. Aguilar C., A. Teixeira J., and I. Mussatto S. 2012. Bioactive compounds (phytoestrogens) recovery from *Larrea tridentata* leaves by solvents extraction. *Sep. Purif. Technol.* 88: 163–167.
- Martins, S., A. Teixeira J., and I. Mussatto S. 2013. Solid-state fermentation as a strategy to improve the bioactive compounds recovery from *Larrea tridentata* leaves. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 171: 1227–1239.
- Nakamura, Y., C. Chang, C., T. Mori, K. Sato, K. Ohtsuki, B. L. Upham, and J. E. Trosko. 2005. Augmentation of differentiation and gap junction function by kaempferol in partially differentiated colon cancer cells. *Carcinogenesis* 26: 665–671.
- Pesewu, G., R. Cutler, and D. Humber. 2008. Antibacterial activity of plants used in traditional medicines of Ghana with particular reference to MRSA. *J. Ethnopharmacol.* 116: 102–111.
- Sharapin N., L. M. Rochas, E. S. Carvalho, E. V. M dos Santos, L. E. M. R. de Albuquerque, y J. M. L. Almeida. 2000. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Bogotá: Convenio Andrés Bello. 247 p.
- Skoog, D. A., J. Holler F., y A. Nieman T. 2001. Principios de Análisis Instrumental. Quinta ed. España: Mc Graw Hill. 997 p.
- Socaciu, C., F. Fetea, and F. Ranga. 2009a. IR and Raman spectroscopy advanced and versatile techniques for agrifood quality and authenticity assessment. *Bull. UASVM* 66: 459–464.
- Socaciu C., F. Ranga, F. Fetea, L. Leopold, F. Dulf, and R. Parlog. 2009b. Complementary advanced techniques applied for plant and food authentication. *Czech J. Food Sci.* 27: 70–75.
- Sorrentino S. and U. Landmesser. 2005. Nonlipid-lowering effects of statins. *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.* 7: 459–466.
- Tapas A. R., M. Sakarkar D. M., and B. Kakde R. B. 2008. Flavonoids as nutraceuticals: A review. *Trop. J. Pharm. Res.* 7: 1089–1099.
- Uedo N., M. Tatsuta, H. Lishi, M. Baba, N. Sakai, H. Yano, and T. Otani. 1999. Inhibition by D-limonene of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Cancer Lett.* 137: 131–136.
- Ultee A., E. P. Kets, M. Alberda, F. A. Hoekstra, and E. J. Smid. 2000. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch. Microbiol.* 174: 233–238.
- Vlachos, N., Y. Skopelitis, M. Psaroudaki, V. Konstantinidou, A. Chatzilazarou, and E. Tegou. 2006. Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils. *Anal. Chim. Acta.* 573–574: 459–465.
- Vokou, D. 1992. The allelopathic potential of aromatic shrubs in phrygane (East Mediterranean) ecosystems. *In*: Rizvi, S. J. H. and V. Rizvi (eds). Allelopathy. Basic and Applied Aspects. Chapman & Hall, London. 472 p.
- Wu, Y., Y. Luo, and Q. Wang. 2012. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. *LWT-Food Sci. Technol.* 48: 283–290.