

Los aceites esenciales y su actividad biológica

Una propuesta didáctica

Juan Antonio Llorens-Molina

Resumen: En este artículo se propone un modelo de actividad educativa basado en la investigación actual sobre la aplicación de los aceites esenciales como alternativa natural a productos obtenidos por síntesis química. Concretamente, se plantea y discute un experimento para la observación de las actividades antifúngica e inhibidora de la germinación, relacionadas con la investigación sobre aditivos alimentarios y herbicidas naturales alternativos. Su objetivo es contribuir al desarrollo de la sensibilidad medioambiental del alumnado a lo largo de las diferentes etapas del Sistema Educativo, así como de su valoración de la investigación científica.

Palabras clave: aceites esenciales, actividad antifúngica, germinación, sostenibilidad, educación medioambiental.

Abstract: A model of educational activity based on current research on the application of essential oils as a natural alternative to products obtained by chemical synthesis is proposed in this paper. Specifically, an experiment is proposed and discussed for the observation of antifungal and germination inhibitor activities, related to research on alternative food additives and natural herbicides. Its objective is to contribute to the development of students' environmental sensitivity over the different stages of the Educational System, as well as their contribution to the social appreciation of scientific research.

Keywords: essential oils, antifungal activity, germination, sustainability, environmental education.

INTRODUCCIÓN

El sistema educativo se enfrenta actualmente, entre otros, a dos importantes retos: promover una creciente sensibilidad medioambiental y contribuir a una mayor valoración social de la investigación científica. En cuanto al primero, es patente la existencia de una creciente concienciación sobre el respeto al medio ambiente y la necesidad de un desarrollo sostenible,^[1] que tiene su reflejo en los objetivos de la educación científica.^[2]

A pesar de las limitaciones que obstaculizan el desarrollo del trabajo experimental en los niveles educati-

vos no universitarios, no podemos renunciar a adoptar iniciativas para afrontar los citados retos. Para ello, un punto de partida puede ser el reconocimiento de las líneas de investigación que contribuyen a avanzar hacia un desarrollo sostenible. Un buen ejemplo puede ser la investigación sobre productos naturales como alternativa a los obtenidos por síntesis química.^[3] Esta línea de investigación ha sido impulsada además por la implantación de normativas cada vez más restrictivas por el carácter nocivo o tóxico de muchas de las sustancias empleadas y por la creciente aceptación por los consumidores de los productos procedentes de la agricultura y ganadería ecológicas. Esta alternativa está basada en los diversos tipos de actividad biológica que fundamentan su empleo como plaguicidas, herbicidas, aditivos alimentarios, etc.^[4] En este contexto cabe destacar la aplicación de los productos del metabolismo secundario de las plantas y concretamente de los aceites esenciales (AEs, en adelante).

Surge pues así una conexión entre enseñanza e investigación que contribuye a afrontar el segundo reto inicialmente planteado: promover la valoración social de la investigación científica. Pese a los esfuerzos realizados desde el sistema educativo para incorporar a los currícula aspectos básicos de la metodología científica,



J. A. Llorens-Molina

ETS de Ingeniería Agronómica y del Medio Rural
Universitat Politècnica de València
Camí de Vera, s/n, 46022, València
C-e: juallom2@qim.upv.es

Recibido: 06/03/2021. Aceptado: 11/054/2021.

cabe destacar un dato significativo: un 58,1% de la población española considera escaso el reconocimiento social de la profesión de investigador/a.^[5] El papel que el sistema educativo puede ejercer en este sentido puede ser notablemente relevante con la integración de pequeñas investigaciones en la docencia no universitaria. Es ésta una valiosa contribución en este sentido,^[6] que favorece además la alfabetización científica de sectores cada vez más amplios de la sociedad.^[7] Ahora bien, dicha integración exige la selección de contenidos susceptibles de una transposición didáctica accesible y adecuada a los diferentes niveles educativos.

¿POR QUÉ LOS AEs?

En este trabajo se proponen dos modelos de actividad basados en la actividad biológica de los AEs. El porqué de esta elección se basa en diferentes hechos que justifican su capacidad de transposición didáctica.^[8]

Una primera razón, de índole sociocultural, es que los AEs se obtienen principalmente de las plantas aromáticas. Desde un punto de vista etnobotánico, muchas de ellas se hallan vinculadas a nuestra vida cotidiana: desde el consumo de infusiones, al empleo de la albahaca o el clavo como repelentes de insectos, la lavanda y el laurel para preservar la ropa en los armarios, o la ajedrea y algunos tipos de tomillos para aderezar aceitunas de mesa, etc. Mención aparte merece la creciente popularidad de los AEs en aromaterapia.^[9]

Otra razón para su aplicación educativa, ésta de carácter práctico, es que son productos de elevada disponibilidad, tanto comercial como experimental, ya que existen métodos relativamente sencillos para su obtención. Asimismo, su caracterización química y el estudio de algunos aspectos de su bioactividad son susceptibles de un tratamiento experimental adaptable, en cuanto a metodología y recursos, a diferentes niveles educativos.^[10]

Por último, desde el punto de vista de su relación con los contenidos académicos, muchos de los compuestos mayoritarios de los AEs poseen una estructura molecular relativamente sencilla, con diversos grupos funcionales que son objeto de estudio en 4.º de la ESO, Bachillerato y primer curso de muchos grados universitarios.

¿QUÉ SON LOS AES?

Los AEs están constituidos por la fracción volátil y semivolátil de los productos del metabolismo secundario de las plantas. Estos compuestos pueden aislarse mediante numerosos métodos de extracción, dando lugar habitualmente a composiciones de elevada complejidad. No obstante, el concepto de aceite esencial se halla vinculado al uso concreto de determinados métodos de extracción, tal como se define a partir de la norma ISO 9235:2013(en), término 2.11, que define el aceite esencial como:

Producto obtenido a partir de una materia prima natural de origen vegetal, por destilación al vapor, por procesos mecánicos a partir del epicarpio de los cítricos, o por destilación en seco, después de la separación de la fase acuosa, en su caso, por procesos físicos.

En cuanto a su naturaleza química, los AEs contienen principalmente terpenos, moléculas formadas por unidades de isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno) y concretamente por monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos, constituidos por dos, tres o cuatro unidades de isopreno, respectivamente, así como por sus derivados oxigenados: alcoholes, aldehídos y cetonas, ésteres y epóxidos, denominándose en general “terpenoides”. También forman parte de los AEs otros tipos de compuestos como los fenilpropanoides, así como alcoholes, aldehídos y cetonas alifáticos, etc.

Es muy importante precisar que, para una misma categoría taxonómica de la planta de origen, la composición de un aceite esencial puede presentar una gran variabilidad.^[11] En primer lugar cabe referirse a la presencia de quimiotipos o “razas químicas”, de naturaleza genética, a veces vinculados a procedencias geográficas específicas, pero también presentes en una misma población. De hecho, los AEs comercializados de calidad se presentan “quimiotipados”, es decir, indicando a qué quimiotipo corresponden. En segundo lugar, factores abióticos, relacionados con la temperatura, precipitación, luz, naturaleza del suelo, pH, salinidad, etc., variables que afectan a la fisiología de la planta y cuya influencia suele ser más cuantitativa que cualitativa. En tercer lugar, factores relacionados con la propia evolución de la planta a lo largo de su ciclo vegetativo, así como con el órgano considerado. Puede haber, por ejemplo, cambios muy notorios entre la fase de crecimiento vegetativo y el período de floración, así como entre las hojas, inflorescencias y semillas. Cabe considerar por último el método de extracción utilizado. Entre ellos destaca la hidrodestilación, la cual consiste en someter la muestra a ebullición en agua. El vapor generado arrastra consigo el aceite esencial, que puede separarse por su inmiscibilidad con el agua tras la condensación. Este proceso puede adaptarse al material disponible en los laboratorios de Educación Secundaria.^[12] Cabe citar también los métodos mecánicos utilizados en la obtención de AEs de cítricos, basados en el prensado o raspado del epicarpio (parte exterior de la corteza), que contiene las glándulas con el aceite esencial, y otros procesos más recientes como la destilación asistida por microondas o la extracción con CO₂ supercrítico.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS AES

En las últimas décadas, los AEs han sido objeto de creciente atención, más allá de sus tradicionales aplicaciones en cosmética y aromaterapia, como consecuencia de su amplio espectro de actividades biológicas.^[13] Estas se hallan relacionadas principalmente con la medicina

y el sector agroalimentario, aunque también con aplicaciones tales como la protección de metales frente a la corrosión como en el caso del obtenido de la *Artemisia herba-alba* Asso, conocida popularmente como ontina.^[14] En cuanto a las aplicaciones agroalimentarias cabe destacar el empleo de numerosos AEs en la preservación y conservación de alimentos por su actividad antioxidante. De este modo, compuestos fenólicos como el timol o el carvacrol, pueden ser aplicados como alternativa al butilhidroxianisol (BHA, E-320) y al butilhidroxitolueno (BHT, E-321), aditivos con posibles efectos nocivos.^[15] Las actividades antibacteriana y antifúngica de numerosos AEs pueden ser también una alternativa a productos tales como el ácido benzoico (E-210) y el benzoato sódico (E-211) utilizado en refrescos, salsas, etc., o los nitratos y nitritos de sodio y potasio (E-251, E-252, E-250 y E-249, respectivamente), empleados en industrias cárnicas para prevenir el botulismo y estabilizar sabor, aroma y color.^[16]

Desde el punto de vista agronómico cabe citar también su aplicación como plaguicidas alternativos, representando en algunos casos la evolución de prácticas tradicionales.^[17] También puede citarse el carácter alelopático y fitotóxico de determinados AEs, que consiste en la capacidad de liberar compuestos químicos capaces de influir en la germinación, desarrollo o reproducción de otras plantas. Este es el fundamento de prometedoros ensayos en tratamientos de fitotoxicidad selectiva en malas hierbas, bien por su acción directa sobre las plántulas, bien por su capacidad para inhibir la germinación de sus semillas,^[18] constituyendo una alternativa a productos como el glifosato, de contrastado impacto medioambiental.^[19]

UNA PROPUESTA EDUCATIVA

El objetivo de este trabajo es proponer, mediante una adecuada transposición didáctica, un modelo de actividad inspirado en la investigación sobre la actividad biológica de los AEs en torno a dos problemas concretos: la conservación de los alimentos y el control de las denominadas “malas hierbas”. Su diseño parte de experimentos muy sencillos ampliamente utilizados a lo largo del sis-

tema educativo: la germinación de semillas y la observación del enmohecimiento del pan debido a hongos del género *Rhizopus*.^[20] Sobre esta base se plantea un proceso experimental que puede servir de base para proponer pequeñas investigaciones adaptadas a las distintas etapas educativas. Se han elegido estos dos tipos de actividad biológica porque sus efectos son claramente perceptibles en intervalos de tiempo apropiados para una actividad escolar y porque el material es accesible y de bajo coste. Además, no implican precauciones importantes de seguridad, salvo las inherentes al manejo de AEs y las propias de cualquier tarea experimental en química.

Desarrollo de la actividad. Materiales y método

Se han elegido los AEs de ontina (*Artemisia herba-alba* Asso.), salvia, (*Salvia officinalis* L.); orégano (*Origanum vulgare* L.) y alcaravea (*Carum carvi* L.). Estos se caracterizan por un amplio espectro de aplicaciones farmacológicas, antioxidantes, antifúngicas y antibacterianas, así como de inhibición de la germinación. Ejemplos significativos son la capacidad antioxidante del aceite de orégano, así como el empleo del aceite esencial de alcaravea, cuyo compuesto mayoritario, la *S*-carvona, inhibe la germinación de las patatas durante su almacenamiento.²¹

Material y método de trabajo

Se enumeran a continuación los recursos para el desarrollo del experimento descrito y el modo de utilizarlos:

- Muestras de AEs, adquiridas en comercios especializados. En el experimento descrito se han utilizados los siguientes: Alcaravea (semillas de *Carum carvi* L.) de Pranarôm®, *Salvia officinalis* L., Namasté® y aceites de orégano (*Origanum vulgare* L.) y ontina (*Artemisia herba-alba* Asso.): ambos de Terpenic lab®. La estructura de sus compuestos mayoritarios se muestra en la Figura 1.
- Tarrinas de uso alimentario de plástico (PET) y papel absorbente de cocina. Las tarrinas se preparan

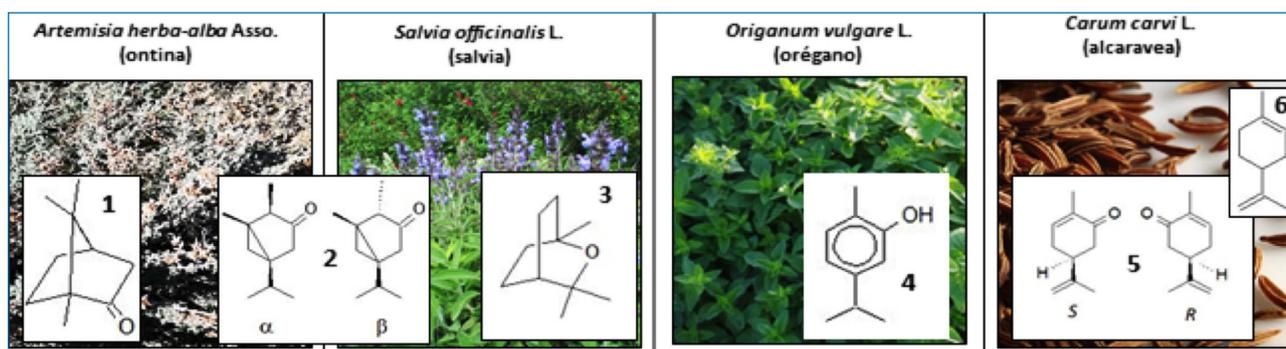


Figura 1. Aceites empleados y compuestos más representativos: 1. Alcanfor, 2. α y β -Tuyona, mayoritarios tanto en la ontina como en la salvia, 3. Eucaliptol, 4. Carvacrol, 5. Estereoisómeros S y R de la carvona (El S se halla en la alcaravea, el R en otras especies como en la *Mentha spicata* L), 6. Limoneno



Figura 2. Tarrina para el ensayo de germinación con la torunda envuelta en papel de aluminio y fijada a la tapa

del modo mostrado en la Figura 2, practicando dos pequeños orificios a unos 2 cm de altura sobre la base para asegurar una mínima circulación necesaria de aire. Sobre la base de la tarrina se disponen tres o cuatro capas de papel de cocina que, convenientemente humedecidas, mantendrán las condiciones adecuadas para el crecimiento de los hongos sobre una pequeña rebanada de pan integral y para la germinación de las lentejas.

- Difusores del aceite esencial preparados con torundas de algodón de las usadas en odontología, envueltas lateralmente en papel de aluminio con objeto de conseguir una difusión lenta y progresiva de los vapores del aceite esencial en el interior de la tarrina.

Se añade gota a gota 1 mL de aceite esencial en el difusor y se tapa la tarrina. En la experiencia descrita las muestras han permanecido en oscuridad durante 8 días a una temperatura estable de 20°C, aproximadamente. Las muestras en las que se ensaya un determinado aceite esencial y sobre todo las pruebas en blanco deben permanecer lo suficientemente alejadas entre sí por la volatilidad de los AEs.

ORIENTACIONES DIDÁCTICAS

Sobre la base de este experimento pueden introducirse variaciones que afecten a los procesos estudiados. Estas pueden adaptarse en cuanto a complejidad y conocimientos previos a diferentes etapas educativas, indicadas a continuación, a título orientativo.

Inicial (2.º ciclo de Educación Primaria). Consistiría en una versión muy simplificada del experimento, centrada en los aspectos sensoriales, reconociendo algunos AEs y relacionándolos con plantas de su entorno que podrían tener en el aula. Tomillo, romero, lavanda o salvia son muy accesibles, tanto las propias plantas como

sus AEs y en ellos pueden observarse las actividades biológicas estudiadas. Al mismo tiempo, actividades centradas en la expresión oral o plástica sobre el desarrollo y resultado del experimento podrían ser también muy sugestivas. También sería la oportunidad de dar a conocer a este alumnado el significado de la fecha de caducidad de los alimentos y de prevenirles sobre la presencia de moho en ellos.

Intermedio (primer ciclo de la ESO). El experimento podría realizarse con el diseño completo, poniendo el acento en la organización y representación de los datos mediante posters o en formato digital, según las habilidades informáticas y medios disponibles del alumnado. Entraría en juego la comparación cualitativa y el papel del experimento en blanco, como introducción al diseño experimental. Podría incluso plantearse una primera aproximación cuantitativa en el experimento de germinación mediante la medida a lo largo del tiempo de la longitud de los tallos y raíces de las lentejas germinadas. Asimismo, también puede ser de interés la experimentación y comparación con otras semillas que germinan con facilidad como el trigo, cebada o soja.

En una etapa posterior (2.º ciclo de la ESO y Bachillerato), se abordarían procesos característicos de la metodología científica como el control de variables. Podrían someterse a comparación factores tales como la influencia de la luz, que permitiría la fotosíntesis una vez germinadas las semillas, el aporte de oxígeno, necesario para asegurar la respiración celular y, por tanto, el desarrollo de los procesos estudiados, así como el efecto de la temperatura, que es el factor habitualmente utilizado en la vida cotidiana (refrigeración) para la conservación de los alimentos. Algunos aspectos del diseño experimental propuesto cobrarían entonces protagonismo: papel de los orificios practicados en la tarrina, necesarios para asegurar el aporte de oxígeno, el control de la iluminación y la temperatura, así como el uso de difusores para una liberación controlada de los vapores del aceite esencial. A partir de 4.º de la ESO se podrían comentar las propiedades de algunos compuestos representativos de los AEs, identificando sus grupos funcionales, así como ejemplos de la importancia de la isomería, como el ya citado acerca de la diferente acción de los isómeros ópticos de la carvona. La lectura y discusión de algún artículo de divulgación sobre problemas medioambientales o relacionados con la conservación de alimentos aportaría significado sociocultural al experimento.

RESULTADOS DEL EXPERIMENTO. COMENTARIOS

En la Figura 3 (germinación de lentejas) y la Figura 4 (enmohecimiento del pan) se muestran los resultados del experimento. Mientras la muestra en blanco muestra una vigorosa germinación alcanzando brotes de unos 10 cm y la aparición de pequeñas hojas al cabo de 8 días, las sometidas a los vapores de los AEs de alcara-

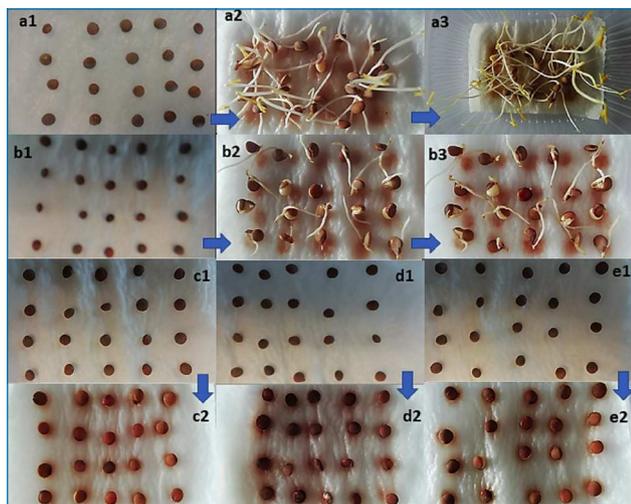


Figura 3. Germinación de las lentejas: Prueba en blanco (a1 -inicial-, a2 y a3 al cabo de 5 y 8 días respectivamente. AE de orégano: b1, b2 y b3, a los mismos intervalos de tiempo. AE de alcaravea: c1 – c2, ontina: d1-d2 y salvia: e1-e2. Se compara la muestra inicial y tras 8 días de ensayo

vea, ontina y salvia no han experimentado una germinación apreciable.

Al mismo tiempo, el AE de orégano ha mostrado un comportamiento diferente: en los 5 primeros días se observa una apreciable germinación (menor que en la muestra en blanco) que no progresa en los días restantes. Estos resultados muestran el poderoso efecto inhibitorio de la germinación de las cetonas monoterpénicas, compuestos mayoritarios en los tres AEs más activos, frente a un efecto mucho más débil del carvacrol, compuesto fenólico mayoritario en el AE de orégano.

La prueba en blanco muestra una evolución muy llamativa, por el desarrollo del hongo *Rizhopus stolonifer*. También se aprecia en la muestra sometida a los vapores del AE de orégano, aunque más lentamente. Al cabo de 5 días se aprecia una formación incipiente (zonas rodeadas con un círculo), para ser también muy notoria al cabo de 8 días. No se observa finalmente crecimiento del hongo en las muestras sometidas a los vapores de ontina y salvia, solo levemente en el caso de la alcaravea.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos han sido fácilmente observables y son coherentes, en líneas generales, con los estudios realizados sobre la actividad biológica de estos AEs. En ambos experimentos se observa la importante acción antifúngica y antigerminal de las cetonas monoterpénicas, compuestos comunes a los tres AEs más activos. El carvacrol (orégano) es activo en cuanto a su capacidad antioxidante, siendo un producto de referencia a la hora de evaluar la actividad antioxidante de otros AEs.

Obviamente, estas conclusiones deben valorarse desde enfoque cualitativo y sencillo propio de un experi-

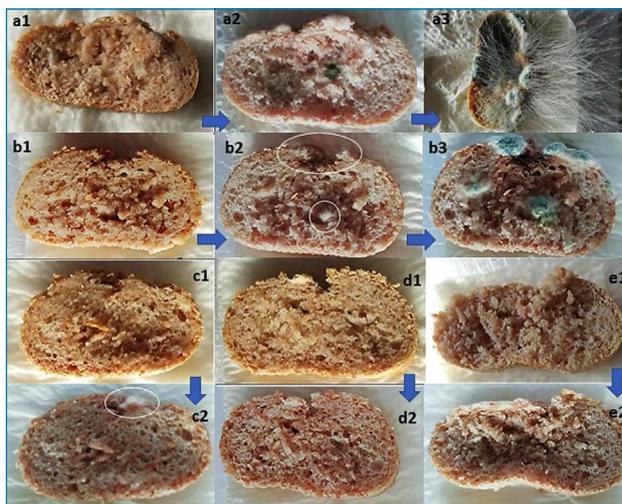


Figura 4. Enmohecimiento del pan. Prueba en blanco: a1 -inicial-, a2 y a3 al cabo de 5 y 8 días, respectivamente. AE de orégano: b1, b2 y b3, a los mismos intervalos de tiempo. AEs de alcaravea: c1-c2, ontina: d1-d2 y salvia: e1-e2. Se compara la muestra inicial y tras 8 días de ensayo

mento escolar; de hecho, también presentan cierta actividad otros compuestos importantes de estos aceites, aunque la actividad de las cetonas monoterpénicas está bien establecida en la bibliografía citada. En cualquier caso, estos resultados pueden constituir un punto de partida adecuado para los objetivos inicialmente propuestos: sensibilizar frente al uso alternativo de productos naturales y vincular una actividad escolar con una prometedora línea de investigación científica.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] a) A. V. Sáiz, M. A. Maldonado, R. V. García, *Ciudadanía y conciencia medioambiental en España*, 2010 (núm. 67), CIS; b) J. Sureda-Negre, A. Catalán-Fernández, O. Álvarez-García, R. Comas-Forgas. *Estudios pedagógicos (Valdivia)* **2013** 39(1), 253-267; c) A. Vilches, D. Gil Pérez, D. *Educación química* **2013** 24(2), 199-206.
- [2] M. L. García, J. M. R. Vergara, *Enseñanza de las ciencias: revista de investigación y experiencias didácticas*, 2000, 473-486.
- [3] a) C. R. Pye, M. J. Bertin, R. S. Lokey, W. H. Gerwick, R. G. Linington, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2017**, 114 (22), 5601-5606; b) G. D. Mogoşanu, A. M. Grumezescu, C. Bejenaru, L. E. Bejenaru, *In Food Preservation*, 2017, 365-411. Academic Press.
- [4] a) F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, *Food and Chemical Toxicology* **2008** 46(2), 446-475; b) B. Adorjan, G. Buchbauer, *Flavour and Fragrance Journal* **2010** 25(6), 407-426.
- [5] https://icono.fecyt.es/sites/default/files/filepublicaciones/20/epsct2018_informe.pdf (acceso: 4/3/2021).
- [6] https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/678992/EM_42_2.pdf?sequence=1 (acceso: 4/3/2021).
- [7] V. Dragoş, V. Mih, *Procedia-Social and Behavioral Sciences* **2015** 209, 167-172.

- [8] https://www.terras.edu.ar/biblioteca/11/11DID_Chevallard_Unidad_3.pdf
- [9] F. Carbonnel, Naturalmente esencial. Introducción a la aromaterapia. Martorell, Ed., 1998, Barcelona.
- [10] a) J. A. Llorens-Molina, M. Verdeguer Sancho, D. García Re-llán, *Enseñanza y Divulgación de la Química y de la Física*, 2012, 283-292; b) J. A. Llorens-Molina, M. P. Santamarina Siurana, M. M. Verdeguer Sancho, J. Rosello Caselles, S. Vacas González, V. Castell Zeising, V. Innodot/18. International Conference on Innovation, Documentation and Education, Editorial Universitat Politècnica de València, 2019, 671-681.
- [11] <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9235:ed-2:vi:en> (acceso: 4/3/2021).
- [12] A. C. Figueiredo, J. G. Barroso, L. G. Pedro, J. J. Scheffer, *Flavour and Fragrance Journal* **2008** 23(4), 213-226.
- [13] a) T. Tworowski, *Weed Science* **2002** 50(4), 425-431; b) S. Azirak, S. Karaman, *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science*, **2008** 58(1), 88-92; c) R. Amorati, M. C. Foti, L. Valgimigli, *J. Agric. Food Chem.* **2013** 61(46), 10835-10847; d) A. T. H. Mossa, *J. Environ. Sci. Technol.* **2016** 9(5), 354; e) S. Dwivedi, P. Prajapati, N. Vyas, S. Malviya, A. Kharia, *Asian J Pharma Pharmacol* **2017** 3(6), 193-199.
- [14] K. Boumhara, H. Harhar, M. Tabyaoui, A. Bellaouchou, A. Guenbour, A. Zarrouk, A. *Journal of Bio-and Tribo-Corrosion* **2019** 5(1), 1-9.
- [15] S. P. Anand, N. Sati, N. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2013** 4(7), 2496.
- [16] C. Rangan, D. G. Barceloux, *Disease-a-month* **2009** 55(5), 292-311.
- [17] a) J. J. Beck, J. R. Coats, S. O. Duke, M. E. Koivunen (eds.), *Pest management with natural products*. American Chemical Society, 2013; b) R. Pavela, G. Benelli, *Trends in Plant Sci.* **2016** 21(12), 1000-1007.
- [18] N. Dudai, A. Poljakoff-Mayber, A. M. Mayer, E. Putievsky, H. R. Lerner, *J. Chem. Ecol.* **1999** 25(5), 1079-1089.
- [19] A. H. C. Van Bruggen, M. M. He, K. Shin, V. Mai, K. C. Jeong, M. R. Finckh, J. G. Morris Jr. *Sci. Total Environ.* **2018** 616, 255-268.
- [20] <https://www.youngliving.com/blog/essential-oils-in-the-classroom/> (acceso: 4/3/2021).
<https://natubeata.blogspot.com/2015/02/laboratorio-germinacion-de-una-semilla.html> (acceso: 4/3/2021).
<https://espaciociencia.com/experimento-educativo-moho/> (acceso: 4/3/2021).
- [21] a) R. K. Johri, *Phcog Rev.* **2011** 5(9), 63; b) E. De Falco, E. Mancini, G. Roscigno, E. Minola, O. Tagliatela-Scafati, F. Senatore c) E. de Falco, E. Mancini, E., Roscigno, G., Mignola, F. Senatore, *Molecules*, **2013** 18(12), 14948-14960; d) S. Bouajaj, A. Benyamna, H. Bouamama, A. Romane, D. Falconieri, A. Piras, B. Marongiu, *Nat. Prod. Res.* **2013** 27(18), 1673-1676; e) M. Abdelkader, B. Ahcen, D. Rachid, H. Hakim, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering, *International Journal of Biological* **2014** 8(11), 1231-1235; f) A. E. H. Mohamed, M. El-Sayed, M. E., Hegazy, S. E. Helaly, A. M. Esmail, A. M., N. S. Mohamed, *Rec. Nat. Prod.* **2010** 4(1).
- [22] J. A. Llorens-Molina, *Aust. J. Educ. Chem* **2011** 71, 6-12.