



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
“Dr. Alfredo Nicolas Usubillaga del Hierro”



ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE TALLOS
DE LA PLANTA *Rosmarinus officinalis* (ROMERO)

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
Licenciadas en Bioanálisis

www.bdigital.ula.ve

Autores:

Sánchez Albornoz Carmen Yoleidy

C.I: V- 26.128.174

Montoya Sánchez Yarelis Yairi

C.I: V- 25.154.379

Tutor:

Prof. Julio César Rojas

Mérida, Enero de 2024

DEDICATORIA

Los sueños son anhelados, saber que uno de ellos es realidad y descubrir que las metas se pueden alcanzar llena de gran satisfacción. Por tal motivo, la siguiente dedicación:

Primeramente, a Dios nuestro Señor, guía espiritual, quien me iluminó el camino para seguir adelante, dándome fortaleza para continuar cuando en algún momento estuve a punto de caer y abandonar mi sueño.

También, a mis padres, quienes con su ejemplo, dedicación, confianza, apoyo y comprensión, me formaron con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me ayudó a buscar siempre el mejor camino.

Igualmente, a mi esposo y a mi hermana por su apoyo incondicional, quienes contribuyeron para poder culminar mis asignaturas, demostrándome su alegría y considerando un gran triunfo de superación mi dedicación dada a los estudios.

De igual forma, a mi hija por ser esa gran motivación para seguir adelante y luchar cada día por mis sueños y así poder darle lo mejor de mí y enseñarle a ser una gran persona.

Asimismo, a los profesores que me impartieron clases, por el tiempo dedicado y la sabiduría que me transmitieron durante toda mi formación académica, guiándome a ser una gran profesional en el área de la salud.

Por último, a mis compañeros de estudio que me brindaron de su apoyo en algunas ocasiones para continuar y culminar juntos la carrera universitaria.

Carmen

DEDICATORIA

Principalmente a Dios pues es quién guía mi camino, me ha dado la fortaleza suficiente para no abandonar mis metas y ha puesto en mis manos las herramientas necesarias para lograr lo que me propongo.

A mis padres, ya que a ellos les debo lo que soy hoy en día. Mi madre siempre brindando su amor sin límites, apoyándome en todo momento y elevando sus oraciones por mí. Mi padre, que desde el inicio de este camino creyó en mí, inclusive más de lo que yo lo hice, siempre me animó a perseguir mis sueños aún cuando él libraba sus propias batallas, fue mi inspiración y aún en su ausencia física sigue siendo una gran motivación.

A el segundo padre que me regaló la vida, mi hermano. Quién ha formado parte fundamental durante este proceso, apoyándome, estando atento a mis necesidades y presente en cada momento.

A mi hija, quién llegó a mi vida para darme una razón más por la cual seguir adelante, iluminando cada día y recargando mis fuerzas para no decaer.

A mi pareja, pues ha creído en mí, me ha brindado su apoyo y ha luchado también para hacer este sueño posible.

A los amigos que me regaló la vida, ya que han sido de gran ayuda cuando lo he necesitado, han estado allí incondicionalmente apoyando este proceso aún en la distancia.

Yarelis

AGRADECIMIENTOS

Primero y, antes que nada, damos gracias a Dios, por estar con nosotros en cada paso que damos, por fortalecer nuestros corazones e iluminar nuestras mentes, además por haber puesto en nuestros caminos a personas que han sido de gran soporte y compañía durante toda la carrera académica.

Del mismo modo, agradecemos a nuestros familiares, en especial a nuestros padres, por el esfuerzo realizado para darnos lo necesario en nuestros estudios e incentivarnos a seguir adelante y alcanzar el éxito.

De igual manera, un agradecimiento especial al Profesor Julio Rojas, nuestro tutor, por la ayuda, paciencia y apoyo brindado para la culminación de este trabajo y para mantener una buena formación académica, incluso a las Profesoras Clara Díaz e Ysbelia Obregón por su colaboración, enseñanzas, comprensión y consejos o sugerencias al ser nuestros jurados.

Por último, gracias a la Escuela de Bioanálisis, por ser un lugar en darnos la oportunidad de recibir una educación con la que cada día nos ha permitido formarnos como grandes personas en alcance de nuestras metas.

Carmen y Yarelis

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
RESUMEN.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA.....	4
Planteamiento del Problema.....	4
Justificación e Importancia de la Investigación.....	6
Objetivos de la Investigación.....	7
<i>Objetivo General.....</i>	<i>7</i>
<i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>7</i>
Alcances y Limitaciones de la Investigación.....	8
<i>Alcances de la Investigación.....</i>	<i>8</i>
<i>Limitaciones de la Investigación.....</i>	<i>8</i>
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	10
Trabajos Previos.....	10
Antecedentes Históricos o Epistemológicos.....	15
Bases Teóricas.....	19
<i>Familia Lamiaceae.....</i>	<i>19</i>
<i>Género y especie: R. officinalis (romero).....</i>	<i>26</i>
<i>Productos naturales.....</i>	<i>34</i>
<i>Extractos vegetales.....</i>	<i>36</i>
<i>Tamizaje fitoquímico.....</i>	<i>40</i>
<i>Bacterias y Actividad antibacteriana.....</i>	<i>48</i>
<i>Hongos y Actividad antifúngica.....</i>	<i>49</i>
<i>Técnicas utilizadas para determinar la actividad antimicrobiana.....</i>	<i>50</i>

TABLA DE CONTENIDO

(Continuación)

Definición operacional de términos.....	52
Operacionalización de las variables.....	55
Hipótesis.....	56
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO.....	57
Tipo de Investigación.....	57
Diseño de Investigación.....	57
Población y Muestra.....	58
<i>Unidad de investigación.....</i>	<i>58</i>
<i>Selección del tamaño de la muestra.....</i>	<i>58</i>
Sistema de Variables.....	58
Instrumentos de Recolección de Datos.....	58
Procedimientos de la Investigación.....	59
<i>Recolección de material vegetal.....</i>	<i>59</i>
<i>Tratamiento y purificación del material vegetal.....</i>	<i>59</i>
<i>Obtención de los extractos de tallos de R. officinalis.....</i>	<i>59</i>
<i>Procedimiento tamizaje fitoquímico.....</i>	<i>62</i>
<i>Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos por el</i>	
<i>Método de Difusión en disco (Kirby-Bauer)</i>	<i>64</i>
<i>Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos por el</i>	
<i>Método de Difusión en disco.....</i>	<i>68</i>
Diseño de análisis.....	70
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	71
Resultados.....	71
Discusiones.....	78
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	82

TABLA DE CONTENIDO
(Continuación)

Conclusiones.....	82
Recomendaciones.....	83
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS.....	84
ANEXOS.....	92

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

N°		Pág.
1	Familia Lamiaceae (Labiatae).....	21
2	Especies nativas de la familia Lamiaceae.....	22
3	Especies exóticas de la familia Lamiaceae.....	23
4	Estructura química de los flavonoides.....	24
5	Planta de <i>R. officinalis</i>	28
6	Estructura química de los compuestos fenólicos.....	30
7	Estructura química de los terpenos.....	31
8	Obtención de los extracto de tallos de <i>R. officinalis</i> . Método de reflujo y filtración.....	61
9	Producto del filtrado del extracto de hexano y etanol.....	61

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

N°		Pág.
1	Operacionalización de variables. Variable dependiente.....	55
2	Operacionalización de variables. Variable independiente.....	55
3	Cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Americano (ATCC).....	65
4	Antibióticos empleados como control positivo para el estudio de la actividad antibacteriana.....	67
5	Características físicas de los extractos.....	71
6	Resultados del Screening fitoquímico de los extractos de hexano y etanol de los tallos de <i>R. officinalis</i>	72
7	Resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos de tallos de <i>R. officinalis</i>	75
8	Resultados de la actividad antifúngica del extracto de etanol de <i>R. officinalis</i>	76
9	Resultados de controles positivos para la actividad antibacteriana...	76
10	Resultados de los controles para la actividad antifúngica.....	77



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES



“Dr. Alfredo Nicolas Usubillaga del Hierro”

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE TALLOS
DE LA PLANTA *Rosmarinus officinalis* (ROMERO)**

Autores:

Montoya Sánchez Yarelis Yairi

Sánchez Albornoz Carmen Yoleidy

RESUMEN

Los extractos de plantas entre ellas el *Rosmarinus officinalis* (romero) se han convertido en una fuente ampliamente utilizada en la medicina natural teniendo aplicaciones industriales, lo cual se debe a la actividad antimicrobiana que le confiere su composición química. El objetivo de esta investigación fue analizar la composición química y la actividad antimicrobiana de los extractos de los tallos de *R. officinalis* (romero). La metodología empleada, se basó en la obtención de extractos de hexano y etanol a partir de los tallos de romero mediante la técnica de reflujo en caliente. En este sentido, la investigación comprendió una búsqueda de información de estudios anteriores y la identificación de los compuestos químicos presentes en los tallos de romero mediante el tamizaje fitoquímico para así determinar el efecto antibacteriano y antifúngico del extracto en cultivos de diferentes microorganismos. Por lo tanto, para evaluar la actividad antimicrobiana se utilizaron cepas de bacterias como *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y hongos como *C. albicans* y *C. krusei* empleando el método de difusión en disco (Kirby-Bauer) a una concentración comprendida de 10.000 ppm y realizando las mediciones respectivas de halos de inhibición expresadas en milímetros. Finalmente, se obtuvo como resultado la presencia de metabolitos secundarios como triterpenos, lactonas sesquiterpénicas, flavonoides, compuestos fenólicos y glicósidos cardiotónicos en los extractos hexano-etanol; además se evidenció actividad antibacteriana con el extracto de hexano para las cepas *S. aureus*, *E. coli* y *K. pneumoniae* mostrando un halo de inhibición de 7mm, mientras que frente a *E. faecalis* y *P. aeruginosa* no hubo inhibición, para el extracto de etanol frente a *S. aureus* hubo un halo de inhibición de 8mm para *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* de 7mm, sin embargo para *E. faecalis* no hubo inhibición; la actividad antifúngica fue nula.

Palabras claves: Actividad antimicrobiana, efecto antibacteriano, efecto antifúngico, *R. officinalis*, inhibición, extracto, composición química.

INTRODUCCIÓN

Dentro de la familia Lamiaceae, el romero (*Rosmarinus officinalis*) conocido también con los sinónimos de *Salvia rosmarinus* y *Rosmarinus angustifolius*, se considera una de las plantas de más trascendencia. Esto se debe a que sus aplicaciones en la industria son: medicinales, cosméticas, farmacéuticas, alimenticias, fragancias, entre otras. Por ende, la presente investigación trata de establecer la efectividad de los extractos de tallos del romero como agente antimicrobiano en base a su composición química; de manera tal, que se pueda resaltar su uso y abarcar un aporte de conocimiento en cuanto a información sobre sus propiedades funcionales, medicinales y/o toxicológicas (Flores, Sáenz, Castañeda y Narro, 2020).

Cabe destacar, que la especie *R. officinalis* (romero), es una planta que crece de forma positiva en una variedad de climas, siendo altamente reconocida. Además, en los últimos años se ha estudiado ampliamente su uso sobre los efectos que tiene en la salud, por los posibles compuestos bioactivos o moléculas volátiles biológicamente activas presentes en dicha planta. De este modo, es posible utilizarse como alternativa en la cura de diversas enfermedades e incluso aplicarse en la aromaterapia, medicina clásica y actualizada como fuente de medicina terapéutica y profiláctica (Flores y cols., 2020).

En este sentido, la planta de romero, es utilizada sobre todo por sus propiedades expectorante, antifúngica y antibacteriana. Además, ha sido identificada por sus múltiples aplicaciones en el ámbito farmacológico que integran actividades antioxidantes, antipiréticas, diuréticas, antiinflamatorias, antidiabéticas, antiespasmódicas y antidepresivas; siendo generalmente, su forma de uso por inhalación e infusión, lo cual influye en la mejoría del estado de la salud de las personas. Esto afirma que se puede obtener actividad antimicrobiana de los extractos de tallos de romero, lo cual se deba

a la presencia de metabolitos secundarios, como compuestos fenólicos, entre otros (Purca, 2013).

Además según estudios, se ha destacado que el extracto obtenido a partir de la planta de romero, muestra altas características o propiedades para ser aprovechado por sus beneficios como antimicrobiano natural e inhibidor microbiano en la industria alimenticia contra microorganismos patógenos y responsables del deterioro en alimentos (Purca, 2013).

Es por ello, que la planta de romero como un antimicrobiano natural es totalmente positivo en el procedimiento de patologías y, simultáneamente disminuye los efectos colaterales asociados a los antimicrobianos. Es así que, por lo antes expuesto en esta investigación se busca determinar la actividad antimicrobiana y conocer la composición química de *R. officinalis* (romero), mediante métodos que impliquen procedimientos que permitan evaluar la actividad del extracto de su tallo frente a bacterias u hongos (Serranillos y Ruiz, 2018).

En relación a lo anterior, esta investigación tiene como importancia, la aplicación de técnicas que permitan conocer los metabolitos secundarios presentes en la planta de romero para así poder analizar la composición química y la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos a partir de sus tallos, con el fin de saber si se genera cierta actividad frente a diferentes cepas de hongos y bacterias.

Por lo tanto, este trabajo sistematizado siguiendo las Normas de Asociación Americana de Psicología (APA) comprende: *Capítulo I* denominado El Problema que abarca el planteamiento del problema, justificación de la investigación, objetivo general y objetivos específicos, así como los alcances y limitaciones de la misma. Seguidamente, el *Capítulo II* denominado Marco Teórico donde se presentan los trabajos previos, antecedentes históricos y bases teóricas que corresponden con las variables del estudio. El *Capítulo III* denominado Marco Metodológico en el cual se

plantea el tipo y diseño de investigación, sistema de variables, instrumento de recolección de datos y el procedimiento de la investigación. Para el *Capítulo IV* se plasmaron los resultados y las discusiones. Finalmente, en el Capítulo V, se hace referencia a las conclusiones, a algunas recomendaciones para nuevas investigaciones y a su vez a las referencias bibliohemerográficas.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

En la actualidad, entre las causas mortales en muchos países, se destacan los problemas de salud derivados de diferentes patógenos o microorganismos, incluyendo entre estos, diversas bacterias, como: cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y los pertenecientes al reino fungí, tales como: *Candida albicans* y *Candida krusei*. Además, se ha mostrado que los antimicrobianos ya existentes han sido desplazados por la resistencia bacteriana y fúngica, sumándose a esto, el desconocimiento y uso no adecuado de antibióticos por parte de la población, lo cual con el pasar de los años ha conllevado a que la cepas sean resistentes a varios tratamientos con antimicrobianos, convirtiéndose en un peligro para la salud humana (Paganini, 2008).

Por ende, la población que sufre infecciones por diversas bacterias u hongos presentan una variedad de manifestaciones y enfermedades, siendo las edades más vulnerables los niños y la tercera edad, ya que estos microorganismos crecen fácilmente en casi todos los medios microbiológicos. El desarrollo de estas enfermedades pueden causar daños en la piel, diarrea, vómito, entre otra sintomatología provocada en el transcurso de su evolución; situación que se agravará si no se toman alternativas de solución (Washington, 2007).

En tal sentido, la opción para el tratamiento de lo antes mencionado, es incluir nuevos antimicrobianos que sean eficaces y puedan mostrar un

efecto positivo frente a dichas bacterias y hongos, evitando a su vez los costos altos y reacciones adversas marcadas. Es por esto, que desde tiempos remotos, el ser humano ha utilizado varios de los recursos naturales para la cura de algunas enfermedades, malestares o dolencias. Por consiguiente, la organización mundial de la salud (OMS), ha definido la medicina tradicional como un conjunto de prácticas, aptitudes y conocimientos basados en teorías, creencias y experiencias de las diferentes culturas, que incorporan medicinas con plantas, animales y/o minerales para mantener el bienestar y además, para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades mentales y físicas (Bustos, 2009).

Es por ello, que entre las variedades de recursos naturales, el romero o *Rosmarinus officinalis*, conocido así por su nombre científico, es considerado una especie con grandes investigaciones científicas en su aplicación contra cepas tipificadas, obteniéndose resultados alentadores y satisfactorios que posibilitan el uso de este recurso natural como una gran alternativa de tratamiento (Bustos, 2009).

Por ello, gracias a diversas investigaciones que han tratado de demostrar que el uso de *R. officinalis* puede ayudar a disminuir problemas de salud, esta planta es considerada un elemento importante a partir del cual es posible aprovechar sus propiedades medicinales, evaluando mediante su composición química y actividad antimicrobiana la determinación de su capacidad antibacterial o antifúngica frente a ciertos microorganismos (Reyes, Palau y López, 2019).

Por lo tanto, la presente investigación se realiza con la finalidad de dar una visión mayor en cuanto al uso de productos naturales para el desarrollo de alternativas a los antibióticos. Así como también para determinar la actividad antimicrobiana y la composición química del romero garantizando que los extractos obtenidos a partir de tallos de dicha planta, se conviertan en una fuente ampliamente utilizada, puesto a que se pueden encontrar

múltiples propiedades, ya sean antioxidantes, antimicrobianas, antimetabólicas, antiinflamatorias u otras.

En tal sentido, estableciendo la formulación del problema principal, para que dicho estudio pueda ser evaluado, se sustenta en la siguiente pregunta ¿Existe relación entre la composición química y la actividad antimicrobiana de los extractos de hexano y etanol obtenidos de los tallos de *Rosmarinus officinalis*?

Justificación e Importancia de la Investigación

En el transcurrir del tiempo, las investigaciones en plantas han arrojado resultados que han cambiado considerablemente el campo medicinal e industrial, siendo la mayor parte de los estudios enfocados en los extractos o aceites esenciales obtenidos de algunas plantas que poseen características antimicrobianas (Mestanza, 2018).

Es así que, el manejo de las enfermedades infecciosas ha tenido muchas investigaciones de interés en el campo farmacéutico y, a lo largo de los años se han considerado diferentes alternativas terapéuticas para tratarlas, siendo el uso de antimicrobianos de primera generación, macrólidos, cefalosporinas, entre otras clasificaciones de antimicrobianos los que han mejorado la eficacia y efectividad farmacológica (Bustos, 2009).

Por esta razón, estudiar la efectividad del romero (*R. officinalis*) como tratamiento antibacteriano o antifúngico, sirve de base para contribuir a investigaciones futuras, ya que por sus principios activos naturales puede ser un beneficio al campo farmacéutico.

Es por esto, que en la presente investigación se corroborará la técnica de extracción a partir de tallos de romero para obtener extractos y determinar su actividad antimicrobiana y su composición química, buscando que sea una fuente natural con un gran papel en la industria farmacéutica en base a

sus principios activos naturales. Asimismo, se amplía esta investigación haciendo relevancia a estudios científicos que han demostrado que el extracto de romero tiene amplia propiedad terapéutica destacando su acción antimicrobiana, debido a que sus metabolitos principales son el ácido rosmarinus y carnósico, lo que lo convierten en un buen inhibidor de microorganismos (Mestanza, 2018). De manera tal que este estudio sea tomado en cuenta en cualquier parte del mundo como un recurso vegetal biodegradable que preserve el medio ambiente.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Analizar la composición química y la actividad antimicrobiana de los extractos de los tallos de *Rosmarinus officinalis* (romero)

Objetivos Específicos

- Obtener los extractos de los tallos *Rosmarinus officinalis*, utilizando el método de reflujo y empleando como solventes hexano y etanol.
- Identificar los compuestos químicos presentes en los extractos de tallos de *Rosmarinus officinalis* mediante el tamizaje fitoquímico.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de tallos de *Rosmarinus officinalis* con cepas de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, mediante el Método de Kirby- Bauer.

- Realizar la actividad antifúngica de los extractos de tallos de *Rosmarinus officinalis* con cepas de referencia *Candida albicans* CDC 385 y *Candida krusei* ATCC 6258.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

El alcance de una investigación está representado por la amplitud y la profundidad del conocimiento que se quiere aprender. Por tal motivo, abarca o comprende el máximo conocimiento que se ha de adquirir durante este proceso, ya que el mismo se refiere a la profundidad del estudio a desarrollar (Arias, 2006). Por esta razón, el alcance de la investigación es confirmar tanto la actividad antibacteriana y antifúngica presentes en los extractos de los tallos de la planta de romero, y a su vez determinar la composición química de la misma mediante un estudio experimental llevando a cabo un tamizaje fitoquímico.

De manera tal, que el presente estudio resulte viable en cuanto al uso de romero como un recurso natural que aporte beneficios a las personas que necesiten algún tratamiento terapéutico, con la ventaja de que es una planta que se da todo el año, incluso se puede recolectar en cualquier época y, casi en cualquier parte.

Limitaciones de la Investigación

En base a la investigación y considerando las teorías que la sustentan, existen algunas limitaciones, entre ellas: la falta de solventes de extracción para llevar a cabo la obtención de los extractos necesarios para la

determinación de la composición química y la actividad antimicrobiana de la planta de romero, el tiempo disponible para el desarrollo de ejecución de la tesis, la falta de electricidad en parte del día y la información limitada en cuanto a trabajos previos sobre el estudio de tallos de romero.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

En base al tema de estudio se hizo una revisión de la literatura, encontrando trabajos de investigación realizados en los últimos años.

El trabajo de investigación de Pardo y cols (2022), titulado: Elaboración de nanopartículas de plata sintetizadas a partir de extracto de hojas de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) tuvo como objetivo extraer y sintetizar nanopartículas de plata (NPs-Ag) a partir del extracto de las hojas de romero y evaluar su actividad antimicrobiana en una fruta para su conservación. Por ello, en la metodología empleada se usaron extractos etéreo, alcohólico y acuoso de las hojas de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) para la síntesis de NPs-Ag, los cuales se caracterizaron cualitativa y cuantitativamente mediante análisis fitoquímicos y espectroscopia UV-Vis. Además, se empleó la microscopía electrónica de barrido para determinar la forma esférica de 10nm de diámetro de las NPs-Ag. La efectividad antimicrobiana de las NPs-Ag se midió utilizando discos de antibiograma frente a las bacterias gramnegativa *E. coli* y grampositiva *S. aureus*; para esto, en las placas de Petri con medio de cultivo Mueller-Hinton se sembró una concentración celular de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL y antes de ser inoculadas, se dividieron en tres cuadrantes con el extracto puro, la solución de nitrato de plata y las nanopartículas sintetizadas en cada uno de ellos; luego, se colocaron los discos de antibiogramas, las placas se incubaron a 37°C por 24 horas y se midieron los halos de inhibición. Para evaluar la actividad antimicrobiana se utilizó el método de difusión en disco (Kirby-Bauer) a una

concentración comprendida de 10 ppm. Posteriormente, se usaron las NPs-Ag en manzanas para determinar su uso como conservante siendo la cera de abeja el control untado en la superficie de las frutas. Entre los resultados se pudo determinar mediante el tamizaje fitoquímico que los extractos contenían grupos funcionales como compuestos fenólicos y terpenoides, además azúcares reductores, flavonoides y alcaloides, considerados los compuestos químicos con propiedades reductoras y, no se evidenció la presencia de saponinas ni resinas. Asimismo, para la bacteria *E. coli* se obtuvo un halo con un diámetro de 2,88 mm para el extracto, para el cuadrante cuyo contenido era AgNO_3 un halo de 1,55 mm de diámetro y para las NPs-Ag el diámetro de halo fue de 3,21 mm. Para la bacteria *S. aureus* se obtuvo un halo de 2,12 mm; 1,30 mm y 2,18 mm para el extracto, solución de AgNO_3 y NPs-Ag, respectivamente; la bacteria *E. coli* presentó halos con diámetros mayores en comparación con la bacteria *S. aureus*, observándose una mayor eficacia antibacteriana frente a este microorganismo. Además, se observó que las nanopartículas sintetizadas alargaron el tiempo de maduración de la frutas. En conclusión, se logró demostrar que las NPs-Ag sintetizadas de la hoja de romero se pueden usar como conservantes de frutas ya que retardan el proceso de maduración, manteniendo el peso inicial impidiendo la contaminación microbiana y descomposición durante 30 días.

También en un estudio realizado por Duarte y Floréz (2020), titulado: evaluación de la actividad antibacteriana de extractos y microencapsulados de *R. officinalis* para su aplicación en bioempaques, hace referencia que el romero es una hierba perenne que pertenece a la familia Lamiaceae, utilizado como agente aromatizante de alimentos y medicinalmente. Por ende, dadas las propiedades antimicrobianas que presentan los aceites esenciales y los extractos de romero, la propuesta de la investigación tuvo como objetivo establecer una metodología para obtener y microencapsular dichos extractos y así ser aplicados en la fabricación de empaques para la

conservación de alimentos. En base a esto, la metodología se basó en un diseño experimental que consistió en tres etapas: la obtención de los extractos de *R. officinalis* a partir de sus hojas; la obtención de una formulación mediante la cual se pudo microencapsular y estabilizar los diferentes extractos; y la evaluación de la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos, realizándose finalmente el conteo de unidades formadoras de colonias de bacterias y posteriormente, las pruebas de tinción para identificar de manera general las familias de algunos microorganismos. En este sentido, se hicieron extracciones empleando destilación a presión reducida y se obtuvieron los extractos empleando metanol. Por otra parte, se llevó a cabo una caracterización cualitativa de los diferentes extractos obtenidos para identificar el número de componentes de los diferentes extractos antes y después de encapsulados en las diferentes formulaciones de microencapsulación (técnica de coacervación). Para el desarrollo experimental, se empleó el método de bioautografía, donde se prepararon placas de cromatografía en capa fina, las cuales se sembraron con los diferentes extractos y se realizaron corridos empleando metanol. Posteriormente, se revelaron las placas y se comparó el número de manchas con la actividad antibacteriana que se comprobó mediante pruebas microbiológicas posteriores. El encapsulamiento de los extractos se realizó empleando la técnica de coacervación, la cual es un procedimiento de microencapsulación que se basa en la inducción de la solvatación de un polímero que se deposita en forma de gotículas de coacervado alrededor de la sustancia que se va a encapsular. En tal sentido, se obtuvo como resultado la correlación existente entre las técnicas de extracción y las propiedades antibacterianas de los extractos de romero, considerando que las extracciones por destilación con metanol es apropiada, ya que dicho solvente permite obtener extractos con la actividad antimicrobiana de interés; asimismo, en los medios de cultivo microbiológico con extractos de romero

(*Rosmarinus officinalis*) y microencapsulados de romero hubo inhibición de un gran número de unidades formadoras de colonias de diferentes microorganismos siendo indicativo de una buena actividad antimicrobiana de los extractos y encapsulados respectivamente. Así, se concluyó que el romero es una planta con propiedades biológicas muy importantes dentro de las cuales se destaca su capacidad antibacteriana, ya que puede ser aprovechada para la generación de bioempaques que permitan la conservación de alimentos. Por lo que, dentro de las técnicas de microencapsulación se puede mencionar la técnica de coacervación, la cual es una metodología prometedora para tal fin (conservar las propiedades biológicas de extractos de romero). Es por esto que se consideró que para poder aplicar las propiedades antibacterianas del romero en bioempaques es necesario extraer los componentes activos y evitar su degradación por exposición a la luz y al ambiente.

Por otro lado, en una publicación realizada por Olivera y cols. (2017), titulada: actividades biológicas del extracto de *R. officinalis* L. (romero) analizadas en microorganismos y células, tuvo como objetivo evaluar algunas actividades biológicas del extracto glicólico de *R. officinalis* L., así como la actividad antimicrobiana contra *C. albicans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* y *P. aeruginosa* en cultivos planctónicos y biofilms mono y polimicrobianos de los mismos, de manera que se pudiera conocer la actividad citotóxica, antiinflamatoria y genotóxica en las líneas celulares estudiadas. En cuanto a la metodología, se utilizó el extracto de la planta *R. officinalis* L. a partir de sus hojas y las cepas microbianas con el método de microdilución en caldo para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima microbicida (CMM) del extracto. En primer lugar, las bacterias se cultivaron en agar BHI y *C. albicans* en agar Dextrosa Sabouraud; luego las suspensiones microbianas se prepararon en solución salina estéril (0,9% NaCl) y la turbidez de las suspensiones se

ajustó a 10^6 UFC/mL en espectrofotómetro. El medio de cultivo utilizado para el crecimiento bacteriano fue caldo Müeller Hinton y para *C. albicans* el caldo RPMI 1640 con glutamina, sin bicarbonato e indicador rojo fenol. Posteriormente, su efecto citotóxico se examinó en macrófagos murinos, fibroblastos gingivales humanos, células de carcinoma de mama humano y células de carcinoma de cuello uterino; la actividad antiinflamatoria se evaluó en macrófagos RAW 264,7 de ratones no estimulado y estimulado por lipopolisacáridos (LPS) de *Escherichia coli*; y la genotoxicidad se verificó por la frecuencia de micronúcleos. Por lo tanto, en cuanto a los resultados y discusiones, se observaron reducciones significativas en las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) en todas las biopelículas de bacterias y hongo en estudio, lo que hizo que el extracto de romero proporcionara una viabilidad en cuanto a la actividad antimicrobiana. Los cultivos planctónicos de *C. albicans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* y *P. aeruginosa* tuvieron inhibición del crecimiento en concentraciones de 50 mg/ml. Sin embargo, *C. albicans* (3,13 mg/ml) y *P. aeruginosa* (6,25 mg/mL) mostraron eliminación, es decir, hubo una disminución significativa de UFC/ml en monomicrobianos de biopelículas de *C. albicans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* y *P. aeruginosa* después del tratamiento con extracto de *R. officinalis* L. empleando una concentración de 200 mg/mL durante 5 min, siendo reducciones significativas, más notablemente en *C. albicans* y *P. aeruginosa*, que mostraron la eliminación completa del biofilm. En conclusión, se demostró que el extracto de *R. officinalis* L. fue efectivo en biopelículas mono y polimicrobianas; también proporcionó una viabilidad y mostró un efecto antiinflamatorio y no fue genotóxico.

Por todo lo anterior, se considera que estos estudios basados en el romero, representan un avance en la generación y aplicación de conocimiento, que puede ser de gran utilidad para problemáticas tanto a nivel de la salud humana como de la seguridad alimentaria.

Antecedentes Históricos o Epistemológicos

Desde el punto de vista histórico, el ser humano ha estado ligado al uso de diversos recursos naturales para su supervivencia, pues el hombre utilizaba ciertas plantas y hongos con propiedades alimenticias, terapéuticas, relajantes e inclusive alucinógenas (Delgado, 2001).

Así, por años y por distintas regiones se fueron plasmando en la historia, los diversos usos de los productos naturales, debido a que ha surgido el interés científico por parte de los químicos, en saber cuál o cuáles eran los compuestos responsables de la actividad terapéutica o psicotrópica de ciertas plantas. Con base en esto, se desarrollaron diversos estudios, dando énfasis a la Química de Productos Naturales, la cual es una ciencia que comprende el estudio de los metabolitos secundarios (compuestos orgánicos) aislados de fuentes naturales de origen vegetal, animal, marino, fúngico y bacteriano para la obtención de compuestos con diversidad estructural y actividad biológica (Delgado, 2001).

En las últimas décadas el auge en este tipo de investigaciones ha ido en incremento, pues se han encontrado un sinnúmero de estructuras químicas (Productos Naturales), las cuales han sido un importante factor para el descubrimiento de potentes fármacos, así como también, en diversas aplicaciones en la agricultura, como es el desarrollo de insecticidas o herbicidas de origen natural (Delgado, 2001).

En este sentido, la relación entre las estructuras moleculares de los metabolitos secundarios y la taxonomía de los productos naturales estudiados, ha sido buscada desde las propuestas del célebre taxónomo sueco Linneo (1707-1778) en el siglo XVIII, por lo que el conocimiento acumulado por siglos sobre la composición química de ciertas fuentes naturales ha permitido que la *quimiotaxonomía*, es decir, la relación entre la

composición química y la clasificación taxonómica, sea una herramienta de gran importancia actual (Delgado, 2001).

Por lo tanto, en todas las culturas del mundo existe una venerable tradición en el uso de ciertas fuentes naturales para diversos propósitos, entre los cuales se mencionan los usos medicinales, aromáticos, cosméticos, agronómicos o tóxicos, entre otros (Simental y Avila, 1999).

Actualmente, se conocen las estructuras moleculares de los principios activos de diversas plantas, siendo algunos metabolitos secundarios aislados como los terpenoides, compuestos aromáticos, alcaloides o acetogeninas. Sin embargo, para buscar orden en cuanto a la diversidad estructural, se toman en cuenta las rutas biosintéticas mediante las cuales los organismos fabrican estos productos naturales, abarcando interés en el uso médico tradicional (Shahidi, Janitha, y Wanasundara, 1992).

Por tal razón, la medicina natural surgió desde tiempos inmemoriales y se ha ido transmitiendo a través de varias generaciones hasta nuestros días, destacando que para algunos, la medicina natural está constituida por un conjunto de práctica y medicamentos, utilizados para prevenir, diagnosticar y eliminar los desequilibrios físicos, mentales o sociales y que se basan exclusivamente en la experiencia y la observación práctica transmitida de generación en generación (Shahidi y cols., 1992).

Así, la intención de mantener la salud, es tan antigua y tan inherente a los seres vivos, que las plantas tienen sus propios mecanismos para ser utilizadas de manera natural. Por lo tanto, un hito de la medicina natural del pasado lo marcó *Hipócrates*, el denominado Padre de la Medicina, nacido en el año 40 a.C., donde uno de sus mayores aciertos consistió en afirmar y propagar que las enfermedades y los fenómenos fisiológicos no eran producto de la actividad y el capricho de los dioses, sino que estaban sometidos a leyes naturales y permanentes, por lo que la práctica más conocida para la población en cuanto a medicina natural y tradicional fue el

uso de plantas medicinales (las yerbas), por lo que su aplicación ha hecho necesario el estudio profundo y minucioso de ellas (Simental y Avila, 1999).

De este modo, en las últimas décadas la medicina natural tiene como objetivo prevenir y tratar las enfermedades a través de los recursos biológicos naturales. Por ello, desde la antigüedad se extendió el uso mayoritario de algunas familias vegetales, entre ellas la Lamiceae, la cual se destaca por sus propiedades aromáticas, culinarias y, principalmente en el tratamiento y prevención de variedad de enfermedades y malestares, siendo el romero una de las plantas más estudiadas y usadas por el ser humano prácticamente desde sus albores (Simental y Avila, 1999).

Se destaca, que el romero tiene sus orígenes y descubrimientos por parte de los antiguos egipcios, ya que lo utilizaban en sus ritos para embalsamar las momias de los faraones. Asimismo, Dioscórides, médico, farmacólogo y botánico de la antigua Grecia, en su libro III de plantas y remedios medicinales, asegura que la planta tiene virtud calorífica, apta para curar la ictericia si se cuece en agua y se daba a beber al enfermo antes de realizar ejercicios (Oluwatuyi, Kaatz y Gibbons, 1994).

Entre los griegos y romanos de la época clásica, el romero adquirió ya cierta importancia, hasta tal punto que fue considerada una hierba sagrada. La utilizaban como incienso o como amuleto, principalmente en las bodas y para alejar el mal de ojo. Posteriormente, en la edad media, fue usado como sahumo, que no era otra cosa que quemar el romero para que el humo purificara las estancias. Se sahumaban sobre todo los dormitorios de personas enfermas. También, en aquellos tiempos, en Francia, comenzaban a usarla como bactericida en los hospitales públicos, pues ya conocían sus propiedades para prevenir las sepsis, la combinaban con enebro e incineraban la mezcla (Oluwatuyi y cols., 1994).

Una anécdota curiosa, corresponde en el año 1.235 cuando la Reina Izabella de Hungría padeció una enfermedad paralizante de etiología

desconocida y ante la cual los médicos de la realeza se mostraban ineficaces. Cuenta la historia que un ermitaño llegó a la corte con una preparación de romero empapada en vino (un extracto aromático obtenido destilando la flor del *Rosmarinus* con aguardiente), para intentar sanar a la reina. Y consiguió su objetivo ante el asombro de propios y extraños. Desde entonces, esta combinación conocida como Agua de la Reina de Hungría, ha sido utilizada para tratar la gota y la calvicie (Oluwatuyi y cols., 1994).

Fue durante aquellos años cuando comenzaron a gestarse una serie de rumores o leyendas que conferían al romero ciertas virtudes “mágicas”. Se creía que era una hierba con propiedades para potenciar la memoria. Como ejemplo, los estudiantes de la Grecia clásica se colocaban romero en el pelo para estimular la memoria antes de presentar sus exámenes. Otras leyendas lo asocian con la Virgen María, ya que era una de las hierbas que se encontraban en el pesebre del Niño Jesús (Oluwatuyi y cols., 1994).

Pero fue hasta el siglo XIX que se llevó a América como planta medicinal. En este sentido, se ha hecho énfasis en que el romero (*R. officinalis* L.) es una de las plantas con grandes propiedades químicas para aplicaciones medicinales e industriales, esto por su capacidad antioxidante, efectos terapéuticos y uso de sus extractos con efectos toxicológicos o antimicrobianos sobre diversos microorganismos, lo cual se debe a un alto contenido de ingredientes activos como flavonoides, ácidos fenólicos y principios amargos, los cuales generan una acción tónica y estimulante sobre el organismo (Ávila y cols., 2011).

Bases Teóricas

Familia: Lamiaceae

Aspectos botánicos

La familia es conocida botánicamente con los nombres latinos de Labiatae (por la presencia de labios en sus flores) o Lamiaceae (por el nombre del género tipo de la familia, *Lamium*). La familia Lamiaceae, es considerada como una de las más grandes. Son una familia de plantas aromáticas constituida principalmente por hierbas o arbustos (rara vez árboles). Los tallos son frecuentemente cuadrangulares. Las hojas son generalmente simples y opuestas; las inflorescencias son terminales o laterales, de aspecto racemoso (espigas o panículas), comprendidas por agrupaciones de flores de tipo cimoso (verticilastros), que se ubican en cada par de brácteas (Figura 1). A menudo toda la planta está cubierta por pelos y glándulas que emiten fragancias aromáticas (Fernández y Riveras, 1998).

En cuanto a sus flores presentan cáliz bilabiado o regular de cinco piezas parcialmente soldadas, que a veces crece rodeando el fruto, y la corola tiene los pétalos unidos, simetría dorsiventral, con una parte cilíndrica (tubo) y otra rasgada que consta de cinco lóbulos parcialmente soldados y orientados formando dos labios; el superior frecuentemente recto y en forma de casco (gálea) que suele proteger a los estambres y el inferior trilobado y más extendido que sirve como plataforma a los insectos en el proceso de polinización (Fernández y Riveras, 1998).

Asimismo, presenta estambres que son siempre menos de cinco, generalmente cuatro (dos pares) o a veces sólo dos. El ovario, es súpero y de dos carpelos, desarrolla un nuevo tabique transversal asociado a la presencia de un estilo ginobásico (que se conecta al ovario por su base), dando lugar a un fruto característico de cuatro nueces libres (tetranúcula).

Este es uno de los caracteres más distintivos de esta familia, que la diferencia de otras cercanas, como las verbenáceas, acantáceas o escrofulariáceas (Fernández y Riveras, 1998).

Distribución geográfica

Las labiadas pertenecen a una familia cosmopolita que crece en todo tipo de hábitat, por ende, tienen una amplia distribución en el territorio, pero en general en lugares abiertos, siendo la cuenca del Mediterráneo y el suroeste de Asia las regiones de mayor concentración (Stevens y Heywood, 2001). De igual forma, algunas especies son propias de la región cordillerana, o están asociadas preferentemente a las franjas de bosque altoandino o subandino, encontrándose principalmente en ambientes de subpáramo y páramo (Fernández y Riveras, 1998).

Por lo tanto, se destaca que las especies pertenecientes a esta familia son especialmente importantes en algunos ambientes particulares, como el piedemonte cordillerano y las sabanas llaneras. Por último, otro grupo importante de especies se encuentran asociados a los bordes de bosques y quebradas en las cordilleras. Aunque muchas de estas labiadas de la franja altoandina se encuentran presentes en ambientes perturbados, es decir, están representadas por poblaciones reducidas y sujetas a amenaza, debido a la presencia de especies exóticas invasoras y más agresivas, propias de estos ambientes (Fernández y Riveras, 1998).

Clasificación taxonómica

La familia Lamiaceae se divide en 236 géneros con 6.900 a 7.200 especies aproximadamente repartidas en todo el mundo. De esta manera, se destacan especies nativas (Figura 2) y exóticas (Figura 3) de mayor importancia pertenecientes a esta familia (Stevens y Heywood, 2001).

(Flores y cols., 2020).



Tomado de Köhler's Medicinal Plants

E. *Minthostachys mollis* (peperina)

- F. *Salvia guaranitica* (coralito)
- G. *Salvia splendens* (salvia)
- H. *Clinopodium gilliesii* = *Satureja parvifolia* (muña-muña)
- I. *Teucrium vesicarium*

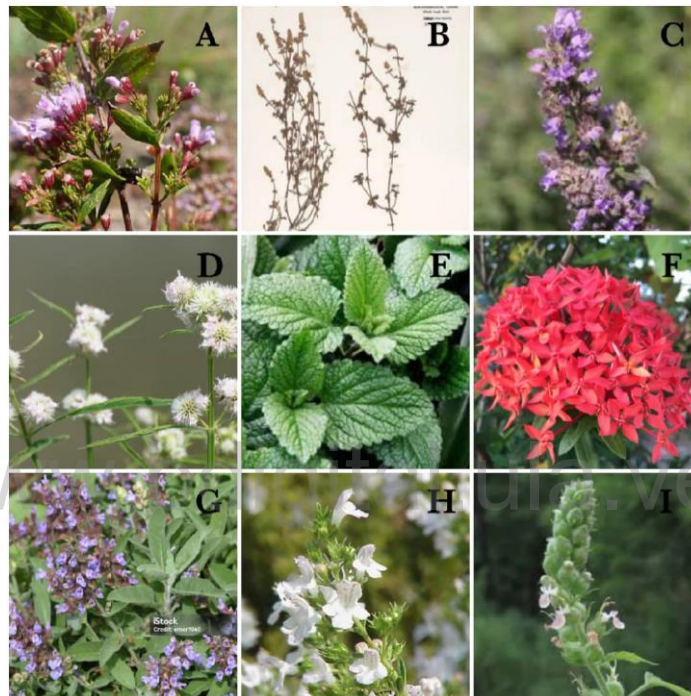


Figura 2. Especies nativas de la familia Lamiaceae
Tomado y modificado de Botanical Sciences

Especies exóticas

- A. *Lavandula officinalis* (lavanda)
- B. *Melissa officinalis* (melisa, toronjil)
- C. *Mentha aquatica* (menta)
- D. *Mentha x rotundifolia* (yerba buena)
- E. *Ocimum basilicum* (albahaca)
- F. *Origanum vulgare* (orégano)
- G. *Pogostemon cablin* (pachuli)

H. *Rosmarinus officinalis* (romero)

I. *Solenostemon scutellarioides*

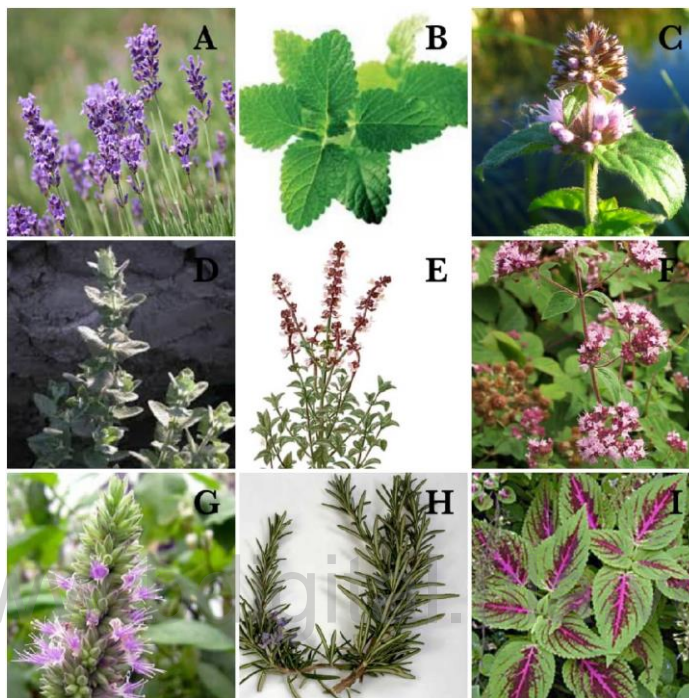


Figura 3. Especies exóticas de la familia Lamiaceae
Tomado y modificado de Botanical Sciences

Compuestos químicos o metabolitos secundarios aislados

La familia Lamiaceae es abundante en géneros y especies, encontrándose principalmente el orégano, la menta, la salvia, el tomillo y el romero, de donde se aíslan los principales flavonoides que influyen en la actividad antioxidante de estos compuestos. Las diversas especies de esta familia muestran un alto contenido de fenoles como los polifenoles, cumarinas, quinonas, diterpenoides, triterpenoides, iridoides, saponinas y en algunos casos alcaloides pirrolidínicos y piridínicos (Ruiz y Moreira, 2017).

Sin embargo, en muchas especies de la familia Lamiaceae, se aíslan principalmente los flavonoides (**Figura 4**): 5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H–

1-benzopiran-4-ona o apigenina **(1)** y 2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-4-cromenona o luteolina **(2)**, que juntos con otros compuestos fenólicos, son los que más contribuyen a la actividad antioxidante. Por ende, la bibliografía demuestra que los flavonoides son los principales metabolitos secundarios presentes en plantas medicinales pertenecientes a esta familia, los cuales en muchas ocasiones son los responsables de la actividad antioxidante y actividad biológica que contribuye a un mejor tratamiento de los problemas gastrointestinales (Ruiz y Moreira, 2017).

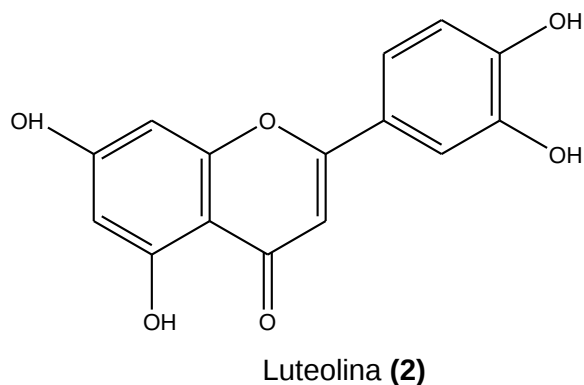
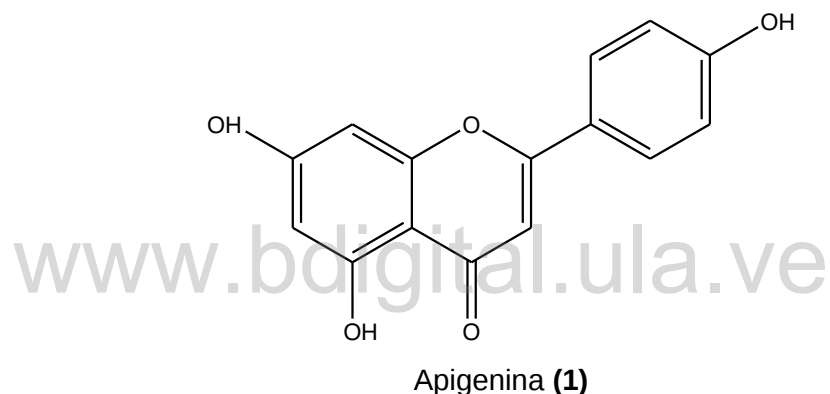


Figura 4. Estructura química de los flavonoides

Elaborado por Sánchez, Montoya y Rojas, 2023

Usos etnobotánicos

La familia Lamiaceae tiene importancia en todos los continentes y culturas, ya que el hombre ha utilizado sus numerosas especies, bien como medicina, condimento o, más raramente, como alimento. También han sido usadas en numerosos casos como plantas ornamentales muy apreciadas por su aroma o por sus flores. Entre las Labiadas más comúnmente usadas en la cocina o en el jardín medicinal son: la albahaca (*Ocimum*), alegrías (*Scutellaria*), marrubio (*Marrubium*), hierbabuena, menta y poleo clásico (*Mentha*), orégano clásico y mejorana (*Origanum*), orégano orejón (*Plectranthus*), orégano andino (*Mintostachys*), ajedrea y poleo americano (*Satureja*), salvia (*Salvia* y *Lepechinia*), mastranto (especies de *Hyptis* y *Salvia*), tomillo (*Satureja*, *Thymus*), toronjil (*Melissa*) y romero (*Rosmarinus*) (Fernández y Riveras, 1998).

Por otra parte, algunas Labiadas también han sido tradicionalmente utilizadas en los ritos religiosos de algunas comunidades, como es el caso de varias especies de los géneros *Scutellaria* y *Ocimum*, principalmente en las comunidades afrocolombianas e indígenas del litoral pacífico. Son también frecuentes en los parques y jardines algunas especies ornamentales (Fernández y Riveras, 1998).

Actividad farmacológica y/o biológica

En la familia Lamiaceae, se destacan especies con un importante valor por sus propiedades biológicas y por las aplicaciones de sus metabolitos secundarios en extractos, ya que éstas han mostrado una gran variedad de actividades biológicas benéficas, lo que las hace indispensables para la industria medicinal, alimenticia, cosmética y farmacéutica y agricultura (García, Romero, Llanderal, Cermeño, Lao, y Segura, 2019).

Esta familia se considera medicinal, porque su uso es muy activo en la fitoterapia. Además, la presencia en sus extractos y aceites esenciales de

moléculas volátiles biológicamente activas, ha permitido su aplicación en la aromaterapia y le aporta elevadas propiedades antioxidantes y antimicrobianas, siendo esta última aprovechada en la industria alimenticia contra microorganismos patógenos y causantes del deterioro en alimentos (García y cols., 2019).

La importancia medicinal de la familia Lamiaceae se debe principalmente a la presencia de sustancias bioactivas en la mayoría de las especies, lo cual brinda beneficios en el tratamiento de enfermedades gástricas, respiratorias y nerviosas, así como en la prevención de la diabetes. Asimismo, en la medicina tradicional también ha sido usada como tratamiento para el asma, depresión, estrés, dolor de cabeza y Alzheimer, incluso, algunos estudios evidencian un posible efecto preventivo o terapéutico en enfermedades cardiovasculares, problemas de obesidad, desórdenes neurodegenerativos y cáncer (Sik, Hanczné, Kapcsándi, y Ajtony, 2020).

Por ende, en la medicina tradicional y moderna, las aplicaciones de las plantas de la familia Lamiaceae son muy variadas, debido a la presencia de diversos metabolitos o componentes principales que poseen propiedades antifúngicas, antiinflamatorias, antimicrobianas, antivirales, antioxidantes, antibacterianas, antialérgicas, anticarcinogénicas, hepatoprotectoras, antitumorales, insecticidas y acaricidas (García y cols., 2019).

Género y especie: *Rosmarinus officinalis* (romero)

El *R. officinalis* (romero), es una planta que procede del griego “rhops y myrinos” que significa “arbusto marino” y, del latín “ros” y “marinus” que significa “rocío del mar” o “rocío marino” esto se debe a que su desarrollo está muy cerca de las costas. Es una planta mediterránea y tiene una

variedad de usos en las oficinas farmacéuticas, terapéuticas o medicinales (Amaral, Mizdal, Stefanello, Mendez, Puntel, Soares y Fachinetto, 2017).

Es importante destacar, que el romero desde épocas del antiguo Egipto ya se conocía por ser un arbusto o planta. Según la historia, faraones egipcios utilizaban para sepultar a sus difuntos en sus tumbas pequeños ramos de romero para perfumar el viaje hacia dónde van los muertos. Mucho después sus usos medicinales ya fueron reconocidos por Dioscórides en su Libro III, en el que habla del romero. Por primera vez en el año 1330, por Ramón Llull, su aceite esencial fue adquirido y desde ese momento, se da ese uso en la perfumería. En el siglo XVI la reina Isabel utilizó el aceite de romero para tratar el reumatismo que adolecía en ese momento, convirtiéndose en «el agua de la reina de Hungría». Por otro lado, los boticarios utilizaban el romero en gran número de preparados y, en la actualidad el aceite esencial y el extracto están incluidos en el estudio con cepas (Amaral y cols., 2017).

Aspectos botánicos

El romero es una planta o arbusto leñoso aromático de hojas perennes con muchas ramificaciones que puede medir 2 metros de altura. Se encuentra de color verde todo el año, con tallos jóvenes borrosos y tallos añosos de color rojizo con la corteza resquebrajada. Las hojas son alargadas, pequeñas y muy abundantes, de forma lineal, son opuestas, enteras, sésiles y con los bordes hacia abajo, de color verde oscuro, y por debajo de la hoja presenta un color blanquecino y están cubiertas de una vellosidad que las ayuda a protegerse de insectos y plagas (Figura 5). En la zona de unión de la hoja con el tallo nacen los denominados ramilletes floríferos (Flores y cols., 2020).

Además, las flores se presentan de unos 5 mm de largo y tienen la corola bilabiada de una sola pieza, son de color azul violeta pálido, rosa o

blanco, con un cáliz verde o algo rojizo, también bilabiado y acampanado (Figura 5). Suelen ser flores axilares aromáticas a simple contacto o acercamiento, presenta una corola bilabiada de una sola pieza con dos estambres encorvados soldados a ella y con un pequeño diente. Florece empezando la primavera, aunque pueden encontrarse flores durante todo el año que continua. El fruto está encerrado en el fondo del cáliz y está formado por cuatro pequeñas nuececitas de aproximadamente 1,5-3 por 1-2 mm, son de forma ovoides, de color castaño claro con una mancha clara en la zona de inserción (Figura 5) (Flores y cols., 2020).



Figura 5. Planta de *R. officinalis*
Tomado de Köhler's Medicinal Plants

Distribución geográfica

El *R. officinalis*, es una planta vegetal nativa de la región mediterránea, común en la península Ibérica. Se desarrolla en cualquier parte del mundo y se distribuye desde la región mediterránea, sur de Europa, norte de África, incluso se encuentra en Asia Menor y Sudamérica, en España y en el Perú. Por lo general, ésta crece de manera silvestre, tanto en la costa como en la sierra y selva, en regiones rocosas y arenosas muy cercanas al océano (Flores y cols., 2020).

Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Rosmarinus*

Especie: *Rosmarinus officinalis*

Nombre científico: *Rosmarinus officinalis*

Nombre común: Romero

Tomado y modificado de (Flores y cols., 2020).

Compuestos químicos o metabolitos secundarios aislados

Según ciertas investigaciones, se ha demostrado que en la planta de romero se identifica la presencia de α -pineno, β -pineno, canfeno, ésteres terpénicos como el 1,8-cineol, alcanfor, linalol, verbinol, terpineol, carnosol, rosmanol, isorosmanol, 3-octanona, isobanilacetato y β -carioileno; los ácidos vanílico, caféico, clorogénico, rosmarínico, carnósico, ursólico, oleanólico, butilínico, betulínico, betulina, α -amirina, β -amirina, borneol, y acetato de bornilo (Ruiz, 2000).

Es por ello, que los diferentes compuestos químicos encontrados en la planta, son agrupados de forma general por diferentes autores en ácidos fenólicos, flavonoides, terpenoides y derivados hidroxicinámicos. Además, es importante destacar, que distintos trabajos investigativos aseguran que influyen en la planta las condiciones donde ésta crezca, como el clima, suelo y la elevación sobre el grado del océano que producen diferentes cambios (Caribe y Campos, 1991).

Cabe destacar que, dentro de los metabolitos secundarios presentes en los extractos y aceite esencial del romero, la fuerte actividad

antimicrobiana está atribuida principalmente por el carnosol **(3)**, ácido carnosínico **(4)**, y ácido rosmárico **(5)**, los cuales son componentes fenólicos **(Figura 6)** que demuestran una fuerte capacidad de inhibir bacterias grampositivas y gramnegativas. Asimismo, las propiedades y actividad biológica del romero se deben especialmente a la presencia de metabolitos como terpenos **(Figura 7)** entre ellos el α -pineno **(6)**, el alcanfor **(7)**, el acetato de bornilo **(8)**, y el 1,8-cineol (Caribe y Campos,1991).

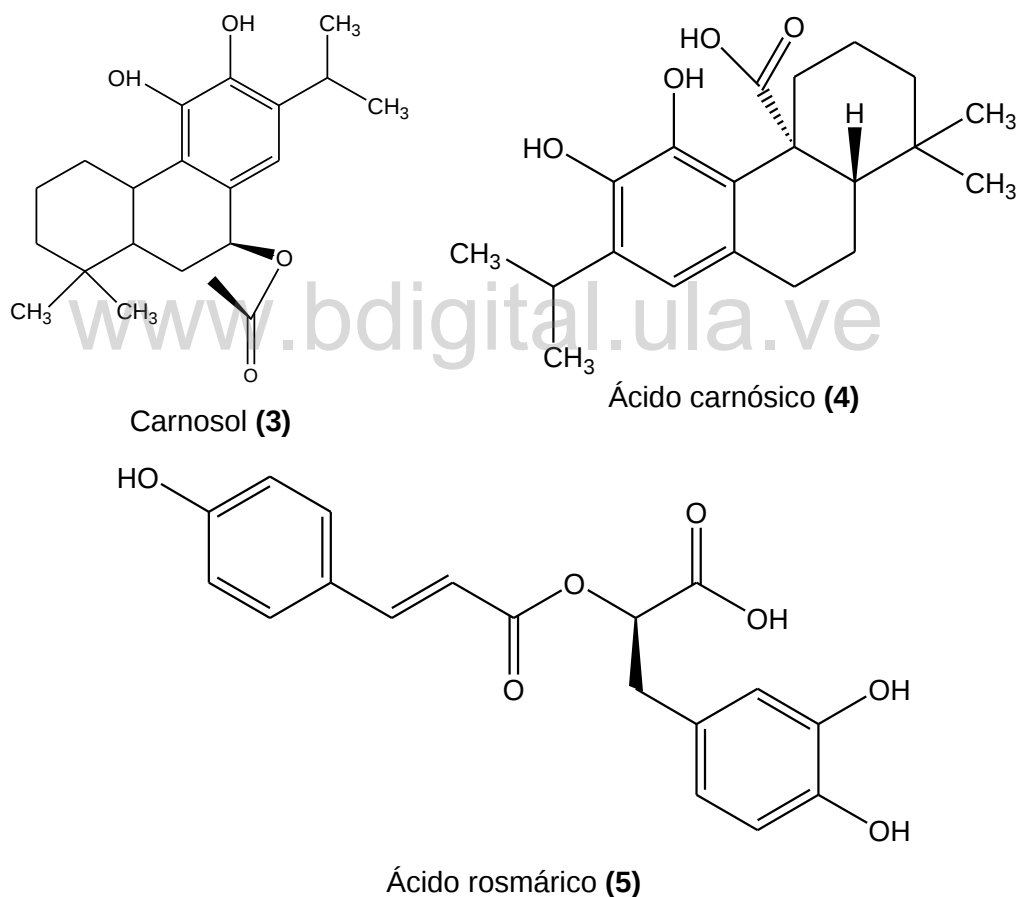


Figura 6. Estructura química de los compuestos fenólicos

Elaborado por Sánchez, Montoya y Rojas, 2023.

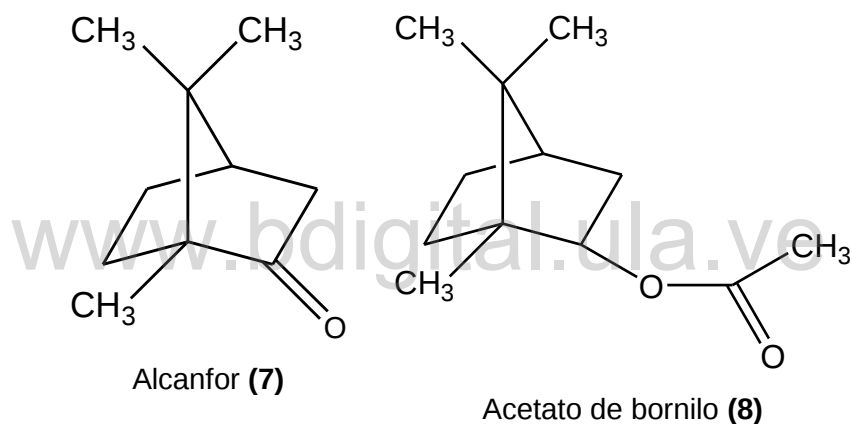
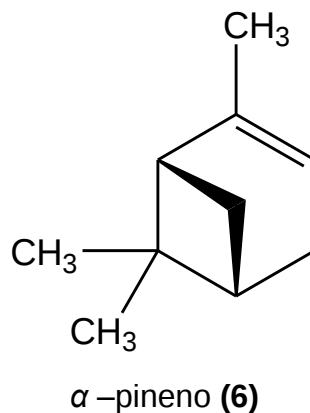


Figura 7. Estructura química de los terpenos
Elaborado por Sánchez, Montoya y Rojas, 2023.

Usos etnobotánicos

Los principales usos del romero son en cosméticos, saborizantes de comida, mejoradores de alimentos, estimulantes del crecimiento del cabello, aditivo para shampoo, crema y jabón, como aroma en la preparación de perfumes y fragancias y en colorantes naturales de lociones y enjuagues bucales (Basheer, 2018).

De igual forma, en la medicina tradicional se ha usado para el tratamiento del asma bronquial, la epilepsia, el dolor de cabeza, malestares

gastrointestinales, cólicos biliares y renales, la diabetes mellitus, en el control de alergias y caspa, pérdida del apetito, anomalías circulatorias, dismenorrea, desórdenes respiratorios, dolor de garganta y de estómago, desórdenes de la piel, enfermedades cardiovasculares, lesiones orales, y alergias cutáneas. Asimismo, como complemento en el tratamiento del dolor muscular, de articulaciones y en inflamaciones. También como antiespasmódico, carminativo, diurético, antirreumático, antidepresivo, ansiolítico, atenuante de cataratas, expectorante, tónico en el tratamiento de las flatulencias y tensión nerviosa y potenciador de la fertilidad humana, la memoria, la cognición y de la circulación sanguínea (Trupti y Gadekar, 2018).

Actividad farmacológica y/o biológica

El aceite esencial y los extractos de *R. officinalis* son antimicrobianos con propiedades antioxidantes, anti-nefrotóxicos, herbicidas, insecticidas, antiinflamatorios, antitumorales, anti-hepatotóxicos, antifúngicos, citotóxicos antihelmínticos, anticancerígenos, antidiabéticos, antimutagénicos, anti-toxigénicos, analgésicos, hipoglucémicos, hipolipemiantes, antiartríticos, antidepresivos, antiobesidad, neuroprotectores, antivirales, antidiarreicos antihiper glucémicos, antihiperlipidémicos, e inhibidores de la germinación de semillas, efecto inhibidor contra el VIH, vasorrelajantes, antitrombóticos, hipouricémicos, anti-infecciosos, espasmolíticos, entre otros más (Hamidpour y Elias, 2017).

Por ello, una gran cantidad de investigaciones se centran hoy en día, en el estudio del romero, destacando aquellas que han demostrado los efectos farmacológicos de sus moléculas fenólicas contra procesos inflamatorios, cardiopatías isquémicas, aterosclerosis, úlceras gástricas, deficiencias respiratorias y algunos tipos de cáncer, incluso se ha encontrado también que mejora la producción del factor de crecimiento nervioso (Amaral y cols., 2017).

En tanto, los componentes como el ácido carnósico, carnosol y ácido rosmarínico son los que le dan sus propiedades medicinales y actividades biológicas más importantes, siendo responsables de la fuerte actividad antioxidante, aprovechada en la preservación de alimentos y en la terapéutica de mecanismos anticáncer y antidiabetes, convirtiendo al romero en una planta de gran interés en las industrias médica y de alimentos (Amaral y cols., 2017).

De otro modo, los extractos acuosos en *R. officinalis* como principios bioactivos tiene la posibilidad de exponer la capacidad antifúngica que presenta. Por lo tanto, con el método de extracción expone un enorme potencial biológico al exhibir una eficiencia antifúngica en diferentes dosis. Así, sustraer sus compuestos es de ayuda en las industrias farmacéuticas, ya que ésta representa una opción terapéutica frente a infecciones oportunistas, para lo cual, pueden presentarse por medio de pastas dentales, enjuagues bucales, irrigación de canales radiculares, ungüentos, entre otros, controlando varias infecciones fúngicas (Pérez, 2019).

Además, se ha podido demostrar mediante estudios *in vivo* y paralelamente *in vitro* que la presencia del ácido carnósico en el romero ha establecido un impacto en el crecimiento de la apoptosis de las células del cáncer hepático, la inhibición del glioma inducido por el factor de necrosis tumoral y la protección frente al tumor cutáneo y mamario inducido en ratones (Alcívar y cols., 2021).

Por lo tanto, en múltiples investigaciones se ha demostrado que la planta presenta propiedades bioactivas tanto en sus hojas, flores, tallo y frutos, las cuales fueron atribuidas en la antigüedad ya que se usaba como remedio para curar aquellos males que aquejaban a las personas de esa época (Alcívar y cols., 2021).

Productos Naturales

Los productos naturales son sustancias derivadas del metabolismo secundario de los organismos vivos que generalmente participan directamente en los mecanismos de defensa y supervivencia. Estas sustancias no están involucradas en el metabolismo basal o primario (Delgado y cols., 2001).

Se estima que hay varios, cientos de miles de productos naturales y biomoléculas que han sido aisladas y caracterizados a partir de plantas, hongos, organismos marinos y líquenes, entre otros. Pero, sólo a partir de plantas se han aislado y caracterizado más de 110.000 metabolitos secundarios (Delgado y cols., 2001).

Se denominan también metabolitos secundarios, aquellos que se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos y que presentan propiedades biológicas. Muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes, colorantes y otros (García y Pérez, 2009).

Clasificación

La diversidad estructural de los metabolitos secundarios puede categorizarse en una serie de grupos, denominados genéricamente compuestos terpenoides, flavonoides y alcaloides, compuestos fenólicos, entre otros. Los compuestos flavonoides, son derivados oxigenados de la estructura de un anillo aromático. Son pigmentos de la planta que hacen que los insectos se sientan atraídos; son sintetizados por las plantas en respuesta a infecciones bacterianas, forman un complejo con las proteínas solubles y extracelulares en la pared de la célula, impidiendo el desarrollo de las células bacterianas (Delgado y cols., 2001).

Asimismo, los alcaloides tienen un anillo de indol, es decir, un compuesto orgánico heterocíclico, con estructura bicíclica que consiste en un anillo de seis miembros (benceno) unido a otro de cinco miembros (pirrol), que a su vez comparten átomos de nitrógeno. Pueden agruparse según el género de su fuente vegetal (la morfina y la codeína), por sus efectos fisiológicos (antimicrobianos, antibióticos, analgésicos), o por similitudes en la ruta por la que son sintetizados por el organismo (biosíntesis); por ello, están dentro de un grupo heterogéneo de bases nitrogenadas y tiene efecto antimicrobiano (Lazcano, 2001).

De igual forma, los terpenoides, los cuales forman parte de extractos de algunas plantas, ya que son metabolitos que tienen elementos adicionales, como oxígeno y se especula que produce ruptura de la membrana celular por los compuestos lipofílicos; pueden ser los triterpenos (ácidos oleanólico y ursólico, y sus 3-acetil-ésteres) (Lazcano, 2001).

Por otro lado, los compuestos fenólicos y polifenoles, son sustancias que en su compuesto tienen el anillo fenol. Entre estos se encuentran el ácido rosmarínico, ácido clorogénico, ácido cafeico y ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico. Los sitios y números de grupo hidroxilo en el grupo fenol se cree que tienen que ver con la toxicidad contra los microorganismos, virus, bacterias y hongos y con una inhibición enzimática o una interacción no específica con las proteínas (Lazcano, 2001).

Biosíntesis

En los procesos de biosíntesis que siguen los productos naturales, se identifican un número definido de métodos o rutas de fabricación. La biosíntesis de las sustancias naturales es un proceso de importancia central, y los organismos vivos pueden considerarse verdaderos laboratorios de síntesis química de sustancias, ya que se trata de la transformación de las

sustancias prebiológicas muy simples para formar sustancias más complejas (Delgado y cols., 2001).

En las plantas, los productos naturales destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos. Cabe destacar, que las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono (García y Pérez, 2009).

Extractos vegetales

Los extractos vegetales son preparados que se obtienen de la extracción de diferentes sustancias vegetales a partir de diversos procesos, como: maceración, fermentación, infusión, decocción y esencias. En otras palabras, los extractos vegetales son el resultado de macerar una planta en un disolvente (alcohol, alcohol + agua, aceite, glicerina y otros). En dichos extractos se pueden encontrar los principios activos presentes en cada planta, los cuales son complejos fitoquímicos (metabolitos secundarios) en gran variedad y diferentes concentraciones, por lo que sus beneficios son variados (Gillet, 2011).

Por ello, los compuestos activos presentes en los extractos, pueden servir para combatir plagas y enfermedades, así como estimulantes en el desarrollo vegetativo e inductores de resistencia ante factores abióticos (sequía, granizo, heladas, entre otros). En tanto, la eficacia de los extractos vegetales depende de diversos factores, entre los que destacan: especie e inclusive variedad vegetal, metodología de extracción, la calidad de las plantas utilizadas, concentración utilizada, entre otros. En la actualidad, los

extractos de plantas son ampliamente utilizados en alimentos, medicinas, productos para el cuidado de la salud y cosméticos (Gillet, 2011).

Clasificación

Los extractos vegetales pueden ser clasificados por su consistencia y también por el disolvente utilizado o medio en el que están macerados, según Iribarrien (2012). En tanto, los tipos de extractos son:

Según su consistencia

- **Extractos fluidos o tinturas (líquidos):** Se encuentran en diferentes diluciones, es decir, una parte de la planta seca equivale a 5 partes de disolvente, o lo que es lo mismo, que 1 gr de la planta equivale a 5 gr de extracto. La dilución 1:1 se llama tintura madre.
- **Extractos blandos o densos (semisólidos):** Suelen ser extractos concentrados, en donde se evapora parte del disolvente.
- **Extractos secos (sólidos):** El disolvente ha sido completamente evaporado. Se suelen vender como capsulas que contienen dentro el extracto en polvo. Son los más utilizados en la medicina natural, ya que contienen muchos principios activos en poco volumen.

Según el disolvente utilizado

- **Extractos hidroalcohólicos o tinturas:** macerados en alcohol etílico de diferentes graduaciones según el principio activo a extraer. El alcohol es el disolvente más eficaz; por eso, este extracto es comúnmente utilizado en perfumería y en la industria farmacéutica, resaltando su olor y color al ser bastante fuertes y poco agradables.
- **Oleosos:** son macerados en un aceite vegetal, sin embargo, hay principios activos que no pasarán al aceite, por lo que en algunos

casos, estos extractos son menos efectivos, pero su aroma y textura son increíbles. Tienen efectos terapéuticos.

- **Extractos glicerizados o hidrosolubles:** son macerados en glicerina y agua. No pueden ingerirse. Se utilizan mucho en cosmética, ya que se evita el problema de las irritaciones por el alcohol y, además, suelen ser menos oscuras que las tinturas.
- **Extractos glicólicos:** macerados principalmente en propilenglicol, el cual es un alcohol muy utilizado en la cosmética convencional, ya que este alcohol potencia la absorción cutánea, facilitando el ingreso de estos tóxicos al organismo.

Métodos de obtención

Existen diversas tecnologías y procesos para la elaboración de los extractos. A continuación se expresan los métodos más utilizados y fáciles de aplicar en el proceso y fabricación de extractos, según Gillet (2011).

- **Maceración:** consiste en el contacto de la planta vegetal con el líquido extractor, por un período de tiempo determinado. Esta maceración puede ser estática (parada), dinámica (con movimiento) o con agitación (movimiento en reactor) de ambas, manteniendo intactas las características sensoriales de la planta. Es indicado para fabricación de extractos sensibles a degradación térmica, cuando se desea mantener intactas las características sensoriales de la planta y no agotar la extracción de los principios activos.
- **Infusión:** consiste en colocar la planta en agua hirviendo u otro líquido extractor apropiado para obtener su extracto de forma similar a cuando se prepara un té casero. Es un método utilizado para plantas sensibles a la degradación térmica.

- **Decocción o reflujo:** en este método, el líquido extractor entra en ebullición (hervor) junto con la planta. Es indicado para extracción de principios activos no termosensibles y para extraer las propiedades de las partes más rígidas de las plantas como tallos, raíces y semillas.
- **Digestión:** es un método en el que se mantiene el contacto entre la planta y sustancia extractora a una temperatura de 40°C a 60°C para obtener extractos vegetales y frutales.
- **Percolación:** es un proceso de extracción por medio del paso de fluidos a través de materiales porosos conocidos como percoladores con control de flujo. Se utiliza para extraer principios activos no termosensibles. Por este método, en muchos casos, es posible extraer en torno del 95% de los activos contenidos en el material vegetal.
- **Destilación:** consiste en la eliminación parcial o total del líquido extractor. Esta destilación puede ser simple o fraccionada (dividida). Es el método más común para obtener aceites esenciales de plantas aromáticas, semillas, flores, bayas, frutos o maderas.
- **Secado:** es un proceso en el que el extracto líquido se remueve por procesos de evaporación u otros tipos de secado como spray dryer.
- **Extracción por solventes:** la forma de extracción más habitual es a través de solventes ya que permite obtener productos vegetales con una composición más compleja.
- **Extracción por incisiones:** es un método que se usa para obtener gomas, resinas y mieles.
- **Extracción con CO₂ Supercrítico:** se utiliza fluido supercrítico CO₂ para modular la extracción, también pueden ser utilizados solventes como etanol. Esta tecnología aún no está muy difundida en la industria, debido a su alto costo y bajo rendimiento. Es usada para extracción de aceites esenciales.

- **Extracción Asistida por Microondas (ESAM):** es una técnica de extracción emergente, en la que se utiliza la energía de microondas y posibilita la extracción con menos líquido extractor. Es utilizada para extracción de compuestos más polares, como aceites y grasas.
- **Extracción Asistida por Ultrasonido:** otra técnica emergente que posibilita la obtención de elevadas tasas de extracción en tiempos menores. La cavitación (fenómeno de vaporización de un líquido por la reducción de la presión, durante su movimiento) generada por el ultrasonido produce diversos efectos en la matriz vegetal, tales como: la circulación del líquido (agitación del líquido extractor) en el sistema y generación de turbulencia; esto evita daños térmicos al extracto y minimiza pérdidas de principios activos.

Tamizaje fitoquímico

El tamiz fitoquímico es una herramienta en la investigación del potencial biológico y farmacológico que poseen las plantas a partir de la identificación de los grupos químicos o estructuras para cada molécula bioactiva de interés biológico. En general, comprende el estudio de metabolitos secundarios presentes en especies vegetales, los cuales pueden ser fenoles y polifenoles, quinonas, flavonas y flavonoides, taninos, cumarinas, terpenoides y aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos, glucósidos y saponinas y esteroides (Castillo, Zavala y Carrillo, 2020).

Pruebas químicas preliminares

Una prueba química es típicamente una reacción rápida que da una pista visual, ya sea a través de un cambio de color, precipitado o formación de gas, como evidencia de una reacción química. Estas pruebas son

realizadas para identificar la presencia de los tipos de metabolitos secundarios que presentan las plantas. Así, basado en la teoría plasmada por García y cols. (2019) se desglosan las siguientes pruebas:

Pruebas para la detección de alcaloides

Los alcaloides son compuestos básicos nitrogenados heterocíclicos, constituidos por uno o más átomos de carbono que poseen un mecanismo de acción mediante la interacción entre la pared celular y el ADN del microorganismo (Aricapa, 2009).

En este caso, el extracto seco que contiene dichos compuestos, es retomado con HCl al 10%, se mezcla y se filtra y, la fase acuosa es tratada por separado con los reactivos de Meyer, Dragendorff y Wagner. Los resultados son registrados como abundante (+++), moderado (++) , escaso (+), negativo (-) (Dominguez, 1973).

Por tanto, el análisis fitoquímico se basa en la capacidad que poseen los alcaloides de precipitar en estado ácido al estar en contacto con soluciones que contengan yodo y metales pesados, ya que los átomos de nitrógeno se unen a dichos metales pesados formando sólidos insolubles en agua acidificada (Martínez, 2020).

- **Prueba de Dragendorff:** se adicionan gotas del reactivo de Dragendorff (yoduro de bismuto) a cada una de las soluciones elaboradas con los extractos acuosos, la presencia de alcaloides es positiva al haber turbidez o un precipitado rojo (García y cols., 2019).
- **Prueba de Wagner:** se agregan gotas de una solución de yoduro de potasio- yodo (reactivo de Wagner) a los extractos. Esta prueba de alcaloides es positiva al virar la solución a un color marrón rojizo o cuando hay turbidez (García y cols., 2019).

- **Prueba de Mayer:** a los extractos acuosos se les añade gotas del reactivo de Mayer (yoduro de potasio- mercurio). La formación de turbidez o precipitado amarillo indica la presencia de alcaloides. Cuando la cantidad de alcaloides es menor en el extracto puede sólo generarse turbidez con este reactivo (García y cols., 2019).

Prueba para la detección de fenoles

Los compuestos fenólicos son sustancias químicas que poseen un anillo aromático (un anillo benceno) con uno o más grupos hidróxidos. Estos están presentes en las plantas conjugados con uno a más residuos de azúcar. Por ello, la forma común de encontrarlos es en forma de glúcidos, siendo estos solubles en agua y solventes orgánicos (Martínez y cols., 2000).

- **Prueba de cloruro férrico (FeCl_3):** al agregar gotas de solución de FeCl_3 al 1% a las soluciones de los extractos acuosos se observa una transición colorimétrica o precipitado verde oscuro, azul- violeta, negro o rojo, lo cual indica la presencia de oxidrilos fenólicos (García y cols., 2019).

Pruebas para la detección de saponinas

Su nombre se debe a sus propiedades jabonosas. Son estructuras formadas por una parte glucosídica y una parte no glucosídica (aglicón) (Carrion y García, 2010).

- **Prueba de espuma:** se diluyen los extractos acuosos en agua y las saponinas disminuyen la tensión superficial de ésta, por lo que, al agitarse y dejarse reposar ocurre la aparición de espuma y la prueba se considera positiva. Una altura de espuma <5 mm indica que la

prueba es negativa (-), si es de 5-10 mm (+) el contenido es moderado; una altura >15 mm (+++) indica un alto contenido de saponinas (García y cols., 2019).

- **Prueba de emulsión:** los extractos se disuelven en agua destilada. Las soluciones se calientan en un baño de agua en ebullición y se filtran. Posteriormente, se mezclan las soluciones filtradas con agua destilada y se agitan para la formación de espuma. La espuma de cada uno de los extractos se mezcla con gotas de aceite de oliva y se vuelve a agitar para la formación de una emulsión, una característica de las saponinas (García y cols., 2019).

Pruebas para la detección de quinonas

Las quinonas, son compuestos aromáticos con dos grupos cetona insaturadas (dicetonas) que por un proceso de reducción cambian a polifenoles. Gozan de una alta reactividad, formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de la proteína, en su mayoría, inactiva la proteína logrando anular su función. Por otro lado, las antraquinonas son una clase de metabolitos secundarios con una funcionalidad p-quinoides en un núcleo antracénico (Aricapa, 2009).

- **Prueba de quinonas:** se disuelven los extractos en agua destilada y metanol y se le adiciona ácido sulfúrico concentrado. Al observar color rojo o púrpura indica la presencia de quinonas (García y cols., 2019).
- **Prueba de antraquinonas:** el extracto seco es tratado con KOH al 0.5 N, se filtra, se acidifica y se mezcla con benceno. La capa orgánica se alcaliniza con hidróxido de amonio y debe aparecer una coloración roja si hay antraquinonas presentes (Albornoz, 2001).

Prueba para la detección de cumarinas

Son una amplia familia que actúan como agentes antimicrobianos y como inhibidores de germinación. Son derivados de la benzo-a-pirona, muchas de ellas son fenólicas, por lo que se incluyen dentro de los compuestos fenólicos (Carrion y García, 2010).

- **Prueba de fluorescencia:** en general, las cumarinas tienen fluorescencia azul cuando se les expone a luz ultravioleta, sólo aquellas que tienen el oxígeno en la posición 7, presentan una fluorescencia verde hasta con luz visibles, especialmente cuando son tratados con hidróxido de amonio concentrado (NH_4OH). Las cumarinas que tiene hidroxilo fenólico pueden copularse con las sales de diozonio derivadas del ácido sulfanílico o la p-nitronilina dando compuestos coloridos (Dominguez, 1973).

Pruebas para la detección de flavonoides

Los flavonoides constituyen parte del grupo de los compuestos polifenólicos, variando en su estructura que contiene dos anillos bencenos unidos a un anillo pirona o pirán heterocíclico. Son responsables del pigmento vegetal (Martínez y cols., 2000).

- **Prueba de Shinoda:** consiste en desengrasar el extracto con éter de petróleo. Para ello, la disolución alcohólica o acuosa es tratada con trozos de magnesio y seguidamente con ácido clorhídrico concentrado, lo que hace que los flavonoides al poseer un núcleo benzopirona generen cambios de coloración a naranja o rojo, siendo la prueba positiva (García y cols., 2019).
- **Prueba alcalina con NaOH al 10%:** las soluciones de los extractos

acuoso se trata con solución de NaOH al 10%, generándose una hidrólisis alcalina ya que el núcleo del flavonoide se rompe por el anillo central liberando sustancias de menor peso molecular, lo que produce un fuerte color amarillo o naranja café (Martínez y cols., 2000).

- **Prueba de acetato de plomo:** se adiciona solución de acetato de plomo al 2% a las soluciones de los extractos acuoso. Un color amarillo indica la presencia de flavonoides (García y cols., 2019).

Prueba para la detección diterpenos

Los terpenos son compuestos aromáticos volátiles constituidos por la unión de unidades de un hidrocarburo de 5 átomos de carbono llamado isopreno (Montenegro y Pineda, 2019).

- **Prueba de acetato de cobre:** a las soluciones de los extractos acuoso se les agregan gotas de una solución de acetato de cobre al 10%. Un cambio de coloración a un color verde esmeralda indica la presencia de diterpenos (García y cols., 2019).

Pruebas para la detección de esteroides y triterpenos

- **Prueba Lieberman-Bouchard:** se disuelven los extractos en cloroformo y a una alícuota de esta solución se le adiciona anhídrido acético más gotas de ácido sulfúrico concentrado al 98%, formándose diferentes colores como verde, violeta, rojo o azul que indica la presencia de fitoesteroides o terpenos. Por lo general, el color verde indica la presencia de fitoesteroides, mientras que el violeta o rojo indica la presencia de terpenos y triterpenos (García y cols., 2019).
- **Prueba de Salkowski:** se disuelven las soluciones de los extractos

acuoso en cloroformo, las soluciones se filtran y se les agrega gotas de ácido sulfúrico concentrado al 98%; las soluciones se agitan y se mantienen en reposo. La presencia de triterpenos es positiva por el viraje de la solución a amarillo, mientras que los fitoesteroides se denotan por un cambio de coloración a rojo en la capa inferior del tubo de ensayo (García y cols., 2019).

Prueba para la detección de taninos

- **Prueba de precipitación con gelatina:** utiliza el reactivo gelatina- sal. Para esta prueba, se disuelven los extractos acuoso en una solución de gelatina al 1% y cloruro de sodio al 10 %. De esta forma, los taninos e incluso los pseudotaninos a altas concentraciones se unen a las proteínas y generan un precipitado blanco (García y cols., 2019).

Prueba para la detección de lactonas sesquiterpénicas

Las sesquiterpenlactonas poseen un esqueleto de 15 átomos de carbono, que deriva de la unión de tres fragmentos de isopreno (2-metilbutadieno-1,3) y un anillo de metilbutenólido, incluyendo algunos productos de transposición (Dominguez, 1973).

- **Prueba de lactonas:** Para el análisis fitoquímico se emplea una mezcla de extracto con NaOH al 10 % que toma una coloración amarillo naranja, la cual desaparece al adicionar una solución ácida como el ácido clorhídrico concentrado (Dominguez, 1973).

Prueba para la detección glucósidos cardiotónicos

Estos metabolitos secundarios se hidrolizan en soluciones ácidas liberando la sapogenina y los carbohidratos ligados (Dominguez, 1973).

- **Prueba Keller-Kilani:** se disuelven los extractos acuosos en agua destilada, se agrega ácido clorhídrico y ácido acético glacial y posteriormente se adicionan algunas gotas de cloruro férrico al 5%. Las soluciones se vierten en ácido sulfúrico concentrado. La formación de un anillo marrón en la interfaz indica la presencia de glucósidos cardiotónicos. Sin embargo, un anillo verdoso también puede formarse gradualmente, indicando la presencia de estos compuestos (García y cols., 2019).

Pruebas para la detección de azúcares reductores

- **Prueba de Fehling:** se agregan gotas del reactivo de Fehling a las soluciones de los extractos acuosos. Un color rojo indica la presencia de azúcares reductores (García y cols., 2019).
- **Prueba de Benedict:** se agregan gotas de la solución de Benedict a las soluciones de los extractos acuosos. La presencia de azúcares reductores se confirma por la aparición de un color rojo ladrillo (García y cols., 2019).

Prueba para la detección de proteínas

- **Prueba de Biuret:** a las soluciones de los extractos dentro de un tubo de ensayo se agregan gotas de sulfato cúprico diluido; después se le agrega solución de hidróxido de sodio al 40%. La formación de una coloración violeta o rosa indica la presencia de proteínas dentro del extracto (García y cols., 2019).

Prueba para la detección de lípidos

- **Prueba de la mancha:** se presiona una pequeña cantidad de cada

uno de los extractos acuosos entre los pliegues del papel de filtro. En caso de la presencia de lípidos se puede observar una mancha aceitosa translúcida sobre la superficie del papel filtro (García y cols., 2019).

Actividad antimicrobiana

Las plantas son la base principal para la obtención de extractos y aceites esenciales, los cuales presentan propiedades que son aprovechadas por las industrias farmacéutica y alimenticia. Se debe tener en cuenta que la obtención de los extractos, ya sean acuosos o alcohólicos, juega un papel fundamental para la efectividad, resaltando propiedades antioxidante, antiinflamatoria, parasitaria, antimicrobiana, entre otras (Flores y cols., 2020).

Por ende, la actividad antimicrobiana (Tabla 1) que se presenta en los extractos se fundamenta con la composición química de las plantas, especialmente de los compuestos fitoquímicos que actúan como efectivos agentes antibacterianos o antifúngicos, siendo importante recordar que un agente antimicrobiano es un compuesto capaz de ejercer actividad inhibidora frente a un agente patógeno o microorganismo (Torrenegra, Miladys y Méndez, 2017).

Cabe destacar, que se ha podido evidenciar que la mayor cantidad de compuestos fitoquímicos (Tabla 2) que ejercen una actividad antimicrobiana son los terpenos al formar parte del 80% de la planta y estar presentes en la composición química, ejerciendo actividad inhibidora frente a bacterias grampositivas y gramnegativas, u hongos (Vignola, Serra y Andreatta, 2020).

Bacterias y Actividad antibacteriana

Las bacterias son microorganismos procariotas, es decir, organismos unicelulares de pocos micrómetros de tamaño. Poseen una membrana

plasmática, compuesta de lípidos y proteínas que encierra y protege la célula y una pared celular que constituye la barrera física y mecánica que da forma a la bacteria. Según su forma se pueden distinguir diferentes tipos de bacterias (cocos, bacilos, vibrios o vibriones, espirilos y espiroquetas). En función de la tinción de Gram podemos clasificarlas en bacterias Grampositivas y Gramnegativas. Solo una pequeña parte son patógenas para los seres humanos, sin embargo, son una de las principales causas de enfermedades relacionadas con la producción de alimentos, el sector agrícola, contacto con animales o productos de origen animal, trabajos de asistencia sanitaria, actividades en unidades de eliminación de residuos y trabajos en instalaciones depuradoras de aguas residuales (Ramírez y Castaño, 2009).

La actividad antibacteriana consiste en eliminar la bacteria o impedir su crecimiento. Se basa en determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos, permitiendo que los resultados sean influenciados por algún método seleccionado, los microorganismos usados y el grado de solubilidad de cada compuesto evaluado. De esta manera, los métodos para evaluar la actividad antibacteriana están clasificados en tres grupos principales: métodos de difusión, métodos de dilución y bioautografía, siendo un cuarto método el análisis conductimétrico, el cual detecta el crecimiento microbiano como un cambio en la conductividad eléctrica del medio de cultivo (Ramírez y Castaño, 2009).

Hongos y Actividad antifúngica

Los hongos constituyen un numeroso grupo de organismos, que incluye a los mohos, las setas y las levaduras. Un extenso número de hongos son parásitos de plantas, causando enfermedades con relevancia económica en plantíos cultivados, incluyendo algunos que son responsables de enfermedades en animales y en el hombre. Por ello, hoy en día se

consideran que las fuentes naturales son estéricamente complejas y poseen una diversidad de sistemas de anillos para que faciliten la síntesis de productos naturales que permitan una actividad antimicrobiana (García y Rivas, 2016).

La actividad antifúngica se basa en el uso de agentes antifúngicos o antimicóticos que engloban cualquier sustancia capaz de producir una alteración de las estructuras de una célula fúngica y que de esta manera consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, sea directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped (García y Rivas, 2016).

Técnicas utilizadas para determinar la actividad antimicrobiana

La metodología con la cual se puede determinar la actividad antimicrobiana de los extractos se fundamenta en técnicas que se han venido practicando para determinar qué tan eficaces son los extractos. Todo comienza con la extracción y la obtención de la muestra en la que se presente algún caso de sospecha de crecimiento bacteriano o fúngico, en donde se utilizan agares para determinar el crecimiento. Por ende, los métodos más utilizados y fáciles de aplicar con los cuales se procede a determinar la actividad antimicrobiana se describirán a continuación (Ramírez y Castaño, 2009).

Método de difusión de disco

Las técnicas de difusión han sido ampliamente usadas para evaluar extractos de plantas con actividad antimicrobiana. Por ende, el método de difusión o también conocido como Kirby Bauer, consiste en inocular el microorganismo de interés a evaluar en una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del extracto o

antibiótico, se deja incubar de 16–48h a 37 °C, para posteriormente medir la resistencia o determinar la actividad antimicrobiana por un halo de inhibición realizado dentro del agar. La lectura de los resultados representa la actividad *in vitro* de la sustancia (Ramírez y Castaño, 2009). La ventaja sobre los métodos de difusión radica en un aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, lo cual es importante cuando se trabaja con productos naturales (Ramírez y Castaño, 2009).

Métodos de dilución

También conocido como el método de dilución en agar o en caldo se basa en un test de susceptibilidad microbiana, utilizado para determinar la concentración mínima bactericida (CMB) y la concentración mínima inhibitoria (CIM), la cual es definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas (Ramírez y Castaño, 2009).

En la técnica de dilución en caldo, son utilizados tubos o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal y el organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la CIM es determinada después de la incubación. En el método de dilución en agar, las cajas se siembran por profundidad con una determinada concentración de extracto vegetal, luego se inoculan con el microorganismo en estudio y se incuban por 24 horas, después de ésta, se examina si el microorganismo crece o no en cada una de las cajas (Ramírez y Castaño, 2009).

Método Epsilométrico (Etest)

El Etest es una técnica cuantitativa para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) de antibióticos y antifúngicos mediante un gradiente de concentración del antimicrobiano sobre una tira. Es

una alternativa sencilla y rápida a las determinaciones convencionales de CIM. El medio que se usa es Müeller-Hinton. La lectura de CIM se realiza en el punto de intersección de la elipse de inhibición con la tira (Ramírez y Castaño, 2009).

Bioautografía

Este ensayo puede representar una herramienta útil para la purificación de sustancias antibacterianas o como una técnica de tamizaje fitoquímico preliminar, realizando el ensayo a través de cromatogramas que permitan la localización de los compuestos activos, incluso en matrices complejas como los derivados de productos naturales. Se puede definir como una variación de los métodos de difusión en agar, donde el analito es absorbido dentro de una placa de cromatografía fina CCF (Ramírez y Castaño, 2009).

El método consiste en colocar las muestras a evaluar en placas de CCF, seleccionar la fase móvil de mejor separación, posteriormente esta placa es llevada y colocada en forma invertida sobre una caja de petri previamente inoculada con el microorganismo a evaluar, se deja de 8 a 12 horas en la nevera para facilitar la difusión de los extractos en el medio, luego se retira la placa y se lleva la caja a incubación según los requerimientos del microorganismo; luego se observa el halo de inhibición donde está el compuesto activo (Ramírez y Castaño, 2009).

Definición Operacional de Términos

Microorganismos

Organismos que solo pueden verse bajo un microscopio. Los microorganismos incluyen las bacterias, los protozoos, las algas y los

hongos. Aunque los virus no se consideran organismos vivos, a veces se clasifican como microorganismos (Mora, 2012).

Cepas

En microbiología, las cepas hacen referencia a un grupo de organismos que pertenecen a la misma especie, pero que comparten ciertas características genéticas que no se encuentran en otros miembros de dicha especie. Los microorganismos, como virus, bacterias y hongos, presentan muchas cepas dentro de una misma especie. En este sentido, las cepas ATCC son microorganismos certificados utilizados en diferentes disciplinas, para el control de calidad en microbiología (Mora, 2012).

Extractos

Los extractos tienen olores característicos y se obtienen a partir de la materia prima del material vegetal desecado, es decir, los extractos son preparados concentrados de consistencia sólida, líquida o intermedia, que se pueden obtener al evaporar parcial o totalmente el disolvente en los líquidos extractivos de origen vegetal. Los extractos presentan abundantes metabolitos secundarios con múltiples propiedades antimicrobianas que permiten brindar otras propiedades bioactivas (Flores y cols., 2020).

Extracción por reflujo caliente

Es una técnica que permite extraer y preservar compuestos de especies vegetales, donde se utiliza un condensador que permite retener los compuestos que son volátiles (Canales, Carazo y Centeno, 2011).

Microorganismos de interés inhibitorio: Bacterias gramnegativas y grampositivas

Se denomina así a la clasificación de los microorganismos patógenos

según su morfología, mediante un método de tinción dado por el bacteriólogo Hans Christian Gram (1853-1938), con el cual ayudó a diferenciar las cepas y clasificarlas de acuerdo a su coloración en Gram positivas, siendo éstas las que a través del microscopio se observan de color morado, mientras que las Gram negativas se visualizan de color rosa (Mora, 2012).

Resistencia bacteriana

Se conoce como resistencia bacteriana a la capacidad de adaptación que poseen los microorganismos frente a los antibióticos. Este fenómeno se da de manera natural o por adquisición, generalmente por modificaciones genéticas dentro de la bacteria. Esto resulta ser una problemática, ya que las personas pueden morir a causa de la resistencia bacteriana. Se destaca que las bacterias han desarrollado múltiples mecanismos de defensa frente a la actividad que ejercen los antibióticos para inhibir algunas de las toxinas que causan infecciones en los huéspedes contagiados por dichos microorganismos (Chávez, 2020).

Patogenia microbiana

Se refiere a la capacidad que tiene un microorganismo para producir una enfermedad dependiendo del grado de patogenicidad, de la facilidad y el medio con que consigue hallar un huésped sensible y obtener acceso a un tejido diana adecuado. En general, se basa en la capacidad de un microorganismo para producir efectos nocivos en un huésped. La patogenia de los microbios depende de múltiples factores que pueden resultar modificados por influencias genéticas y ambientales (Chávez, 2020).

Operacionalización de las Variables

Tabla 1. Operacionalización de variables. Variable dependiente

Variable	Tipo de Variable	Definición Conceptual ¿Qué es?
Actividad antimicrobiana de los extractos de tallos de <i>Rosmarinus officinalis</i>	Dependiente	Se basa en la acción inhibitoria que presenta una sustancia frente a determinados microorganismos, y se evalúa mediante métodos de análisis microbiológicos (Ramírez y Castaño, 2009).
Definición operacional ¿Cómo se mide?	Dimensiones	Indicador
Método de difusión del disco, método de siembra en agares o método de microdilución (Ramírez y Castaño, 2009).	Presente o ausente.	Medición del halo de inhibición en mm.

Fuente: Sánchez, Montoya y Rojas, 2023.

Tabla 2. Operacionalización de variables. Variable independiente

Variable	Tipo de Variable	Definición Conceptual ¿Qué es?
Composición química de tallos de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	Independiente	Se refiere a los principales constituyentes activos o principios activos del romero que confieren ciertas propiedades farmacológicas u otras (Flores y cols., 2020).
Definición operacional ¿Cómo se mide?	Dimensiones	Indicador
Tamizaje fitoquímico.	Metabolitos secundarios: alcaloides, fenoles, flavonoides u otros. Presentes o ausentes.	Identificación de compuestos químicos por medio de precipitados, cambios de color, fluorescencia, entre otros.

Fuente: Sánchez, Montoya y Rojas, 2023.

Hipótesis

Existen trabajos previos que afirman que los metabolitos secundarios presentes en los extractos de tallos de *R. officinalis* presentan actividad antimicrobiana al ser evaluados en cultivos de cepas de bacterias como *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y hongos como *C. albicans* y *C. krusei*, por lo tanto es de esperar que en la presente investigación se evidencie inhibición del crecimiento de los microorganismos evaluados al ser expuestos frente a los extractos obtenidos de los tallos de dicha planta.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

Esta investigación es de tipo confirmatoria, ya que se plantea una hipótesis la cual requiere ser verificada a través de la experimentación. Por otra parte establece una relación entre la actividad antimicrobiana y composición química de los extractos de tallos de *R. officinalis* frente a diferentes cepas estudiadas.

Este tipo de investigación utiliza el método experimental que integra el planteamiento del problema, la hipótesis, definición de variables hasta finalmente llegar a una conclusión, donde las suposiciones del investigador deben ser puestas a prueba (Hurtado, 1998).

Diseño de Investigación

Un diseño de investigación es el conjunto de métodos y procedimientos utilizados para analizar las variables especificadas en la investigación del problema, es decir, es un marco creado para encontrar respuestas a las preguntas de investigación (Hernández, Fernández, y Baptista, 2014).

Por ello, el diseño de la investigación del presente trabajo corresponde al diseño experimental que, según Hernández y cols., (2014), se define como aquel que se utiliza para establecer una relación entre la causa y el efecto de una situación. Es un diseño de investigación donde se observa el efecto causado por la variable independiente sobre la variable dependiente.

En atención a lo expuesto, el trabajo en estudio consiste en un diseño de investigación experimental contemporáneo y transeccional, ya que la información se recolectó en el presente y una sola vez en cada unidad de investigación, llevándose a cabo diversos procedimientos en el Laboratorio del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” de la Universidad de Los Andes, con el fin de conseguir los extractos del material vegetal para conocer los metabolitos de interés presentes y posteriormente evaluar la actividad antimicrobiana.

Población y Muestra

Unidad de Investigación: *R. officinalis* (romero)

Selección del tamaño de la muestra: para esta investigación se utilizaron los tallos de la especie en estudio.

Sistema de variables

Variable dependiente: Actividad antimicrobiana de los extractos de tallos de *Rosmarinus officinalis*.

Variable independiente: Composición química de tallos de romero.

Instrumentos de Recolección de Datos

Un instrumento de recolección de datos consiste en una herramienta indispensable que el investigador utiliza para obtener y plasmar información de manera sistemática y organizada que le permita desarrollar un proyecto

de investigación, con el fin de extraer datos de primera mano sobre la población o fenómenos que se desean conocer (Hernández y cols., 2014).

En este sentido, durante esta investigación se utilizaron como instrumentos para la recolección de datos las tablas e imágenes en las que se pueden plasmar y visualizar las diversas reacciones, procedimientos y resultados obtenidos sobre la composición química y la actividad antimicrobiana de los extractos. De igual forma, como otro instrumento para este estudio se puede mencionar la observación directa mediante la participación en la actividad experimental.

Procedimiento de la Investigación

Recolección de material vegetal

La recolección de la especie en estudio se realizó cerca de la Escuela Técnica Agropecuaria, Sector El Paramito, carretera Mérida – Azulita, Municipio Campo Elías Mérida.

Tratamiento y purificación del material vegetal

El material recolectado fue seleccionado, tomando los tallos más pequeños y delgados, además se realizó el corte de los mismos en pequeños trozos. Posteriormente, se llevaron a la estufa a 37°C durante 2 semanas aproximadamente para finalmente ser triturados en un mortero.

Obtención de los extractos de tallos de *Rosmarinus officinalis*

Extracto de hexano de tallos de *R. officinalis*

Para llevar a cabo esta extracción se empleó como solvente el hexano, se utilizó 78,45 g de tallos secos triturados y 500mL del solvente. Estos elementos fueron procesados en un sistema de reflujo que consistía en

un balón de 3 bocas con capacidad de 1000mL dispuesto sobre una manta térmica, este balón se conectó a un termómetro para controlar la temperatura y un refrigerante de bolas para evitar la evaporación del solvente.

Este proceso de reflujo se ejecutó durante 1 hora a una temperatura de 50°C, culminada la hora se dejó reposar para posteriormente ser filtrado (Figura 8) y llevar a cabo la recuperación del solvente y así obtener el extracto. Finalmente, este producto se dejó reposar hasta evaporarse por completo el solvente obteniendo como resultado 0,90 g de extracto puro (Figura 9).

Extracto de etanol de tallos de *R. officinalis*

En este procedimiento fue empleado el mismo material vegetal del extracto de hexano, utilizando como solvente 500mL de etanol. Se realizó la extracción por reflujo durante 1 hora a una temperatura de 65°C y luego se repitió el proceso con 500mL más de etanol durante 1 hora adicional para garantizar una mejor extracción. A continuación se procedió a filtrar (Figura 8), recuperar el solvente y se dejó en reposo el extracto inicial hasta la evaporación del solvente, obteniéndose 3,63 g de extracto puro (Figura 9).

La obtención de los extractos fue realizada en el Laboratorio de Investigación de Toxicología Analítica de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis bajo la asesoría del Dr. Julio Rojas.

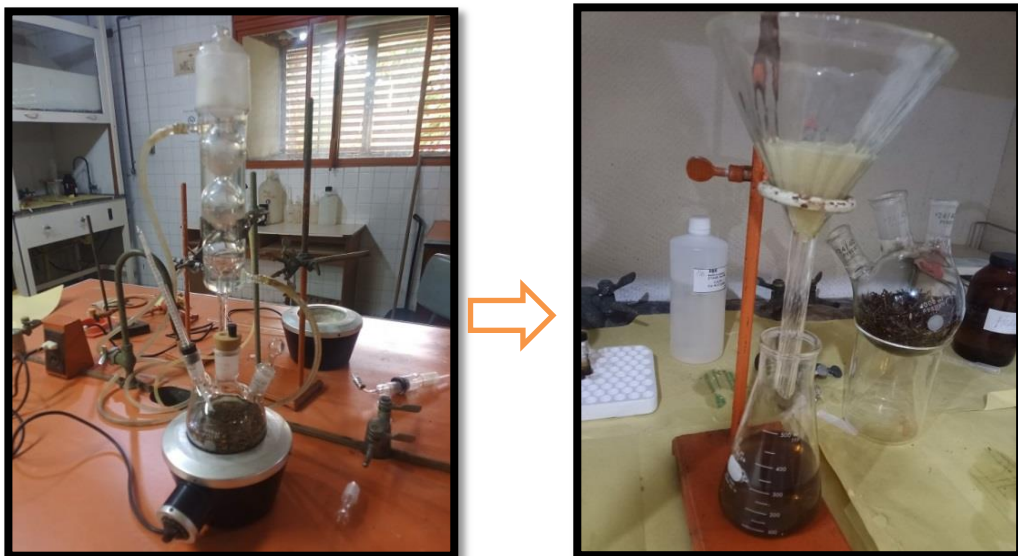


Figura 8: Obtención de los extractos de tallos de *R. officinalis*. Método de reflujo y filtración.

Fuente: Sánchez, Montoya y Rojas, 2023.



Figura 9: Producto del filtrado del extracto de hexano y etanol.

Fuente: Sánchez, Montoya y Rojas, 2023.

Procedimiento tamizaje fitoquímico

Los extractos conseguidos fueron analizados en el Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”, mediante una serie de pruebas cualitativas correspondientes al tamizaje fitoquímico, con el fin de conocer algunos metabolitos secundarios que los componen. Utilizando para este estudio los métodos Marcano y Hasegawa (2018).

Identificación de alcaloides

Para esta prueba se identificaron 2 tubos, uno para el extracto de hexano y otro para el extracto de etanol de *R. officinalis*. En cada uno de ellos se agregó una pequeña cantidad del extracto correspondiente y 5mL de HCl al 10%, esta mezcla fue llevada a baño de María durante 2 horas aproximadamente. Transcurrido este tiempo se llevó la preparación al ultrasonic y luego se filtró para posteriormente dividir el producto de este filtrado en 3 tubos para cada extracto. Por último, a cada tubo se les agregó de 3 a 4 gotas de reactivo de Dragendorff, Wagner y Meyer respectivamente. Todo este proceso fue realizado bajo la campana de extracción.

Identificación de saponinas

Una porción de cada extracto en correspondiente tubo fue mezclado con 1mL de agua destilada y se agitó vigorosamente durante 1 minuto.

Reconocimiento de compuestos fenólicos

Una pequeña porción de extracto de etanol fue disuelto con 1mL de etanol y otra porción en 1mL de agua destilada, luego se le adicionó una gota de tricloruro férrico a cada tubo.

Reconocimiento de cumarinas y antraquinonas

Se agregó 1mL de etanol en 2 tubos, uno para cada extracto y se disolvió, luego se le agregaron dos gotas de hidróxido de amonio concentrado a cada tubo para observar la reacción e identificar antraquinonas, posteriormente los mismos tubos se expusieron en la lámpara de luz ultravioleta para observar fluorescencia e identificar cumarinas.

Reconocimiento de triterpenos y/o esteroides

Cada extracto se disolvió en 1mL de acetona, luego bajo campana de extracción se agregó 0,5mL de anhídrido acético y unas gotas de ácido sulfúrico concentrado lentamente por las paredes del tubo.

Identificación de quinonas

Se dividió una cápsula de porcelana en dos partes con un marcador, luego se colocó una porción del extracto de cada lado y se le adicionó una gota de ácido sulfúrico concentrado.

Reconocimiento de flavonoides y lactonas sesquiterpénicas

- **Reacción de Shinoda:** Con una pequeña cantidad de extracto en cada tubo, se hizo una dilución con 1mL de acetona, luego bajo campana de extracción se le adicionó virutas de magnesio metálico más 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado y se observó la coloración.
- **Reacción de hidróxido de sodio al 10%:** Se le adicionó 0,5mL de NaOH a cada extracto disuelto en acetona y se observó la aparición de una coloración. Luego para determinar lactonas se le agregaron unas gotas de HCl concentrado.

Reconocimiento de taninos

El extracto de etanol fue disuelto en 1mL de agua destilada. A esta solución acuosa se le agregaron dos gotas de reactivo de gelatina previamente preparado.

Identificación de glicósidos cardiotónicos

En un tubo se preparó el extracto de etanol en solución acuosa. En otro tubo se realizó una mezcla de 0,5mL de HCl concentrado, 2mL de ácido acético glacial y 1 gota de tricloruro férrico, esta mezcla se adicionó al tubo con el extracto disuelto en agua y se observó la interfase de las mezclas.

Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos por el Método de Difusión en disco (Kirby-Bauer)

Cepas a evaluar

Para este estudio se seleccionaron cinco especies de bacterias: dos especies pertenecen a las bacterias Gram-positivas y tres pertenecientes a las bacterias Gram-negativas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC), estas bacterias fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes a cargo de la Licenciada María Eugenia Nieves (Tabla 3).

Tabla 3. Cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC).

Bacterias Gram positivas (ATCC)	Bacterias Gram negativas (ATCC)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853

Tomado y modificado de CLSI, 2020.

Metodología

La evaluación de la actividad antibacteriana se llevó a cabo mediante el método originalmente descrito por Bauer y cols., (método de Kirby-Bauer), el cual consiste en la difusión de un antimicrobiano (extracto de romero en este caso) impregnado en un disco de papel, sobre la superficie de una placa de agar que ha sido previamente inoculada con el microorganismo en estudio.

Si el microorganismo es sensible al antimicrobiano, ocurre una inhibición de su crecimiento alrededor del disco lo cual forma lo que se conoce como un halo de inhibición que es visible luego de 18h de incubación. El diámetro de la zona de inhibición determina si hay sensibilidad o resistencia al antimicrobiano.

La prueba se llevó a cabo en el Laboratorio de Actinomicetos del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (ULA), bajo la asesoría de las Profesoras Yndra Cordero e Ysbelia Obregón.

Procedimiento

- 1) Preparación de placas:** En las placas de Petri se preparó el medio de cultivo colocándose aproximadamente 20-25 mL de Agar Müller Hinton (Merck ®) estéril y dejándolo solidificar a temperatura ambiente.
- 2) Preparación de pre-inóculos bacterianos:** Las cepas a ensayar se sembraron en agar Tripticasa soya a 37 °C por 16 a 18 horas antes de hacer el ensayo microbiano, ya que es en ese tiempo donde las bacterias adquieren los nutrientes necesarios para su crecimiento, específicamente cuando alcanzan su fase exponencial o de multiplicación en la curva de crecimiento bacteriano.
- 3) Preparación de los inóculos bacterianos:** Una vez que se obtuvieron las cepas bacterianas frescas y purificadas, se preparó el inóculo bacteriano con la ayuda de un asa estéril, tomándose de esta manera una pequeña cantidad de colonias para luego ser suspendidas en tubos 13x100 previamente estéril que contenían 5mL de solución salina fisiológica hasta que alcanzó una turbidez equivalente al patrón $0,5 \times 10^6$ UFC/mL de Mac Farland.
- 4) Inoculación de las placas:** Una vez preparada las placas, se inocularon en forma homogénea en la superficie de cada una de ellas con cada uno de los inóculos bacterianos previamente preparados en solución salina fisiológica (bacterias en estudio), utilizando para ello un hisopo de algodón estéril.
- 5) Preparación de los discos:** Se utilizaron discos de papel filtro Whatmann N° 1 de 6 mm de diámetro para realizar la actividad antibacteriana, los cuales se esterilizaron con luz ultravioleta (LUV),

durante toda una noche. Previo a la preparación del inóculo se impregnaron los discos de papel con 10 µL de la muestra en estudio a una concentración comprendida 10.000 ppm.

También se utilizaron discos de antibióticos comerciales como control positivo con el fin de medir la sensibilidad de los microorganismos a estudiar (Tabla 4) y como control negativo discos impregnados con 10 µL del solvente dimetil sulfóxido (DMSO).

Tabla 4. Antibióticos empleados como control positivo para el estudio de la actividad antibacteriana.

Bacterias (ATCC).	Antibióticos comerciales		
	E (15 µg)	AMP (10 µg)	PIP (100 µg)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	32 mm	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	32 mm	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	27 mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	-	-	27 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	27 mm

Leyenda: E: Eritromicina ®. AMP: Ampicilina ®. PIP: Piperacilina ®.mm: milímetros
Tomado y modificado de CLSI, 2020.

- 6) Colocación de los discos impregnados:** En las placas de Petri con Agar Müeller Hinton previamente inóculados con cada cepa estudio, se colocaron los discos impregnados con 10 µL de cada uno de los

extractos de la muestra a ensayar y se colocaron los discos de antibióticos comerciales como control positivo (Tabla 4) correspondiente a cada una de las cepas en estudio, además del control negativo; usando una pinza metálica previamente esterilizada.

- 7) Pre-incubación e incubación de las placas:** Después de haber colocado los discos en las placas con Agar Müeller Hinton previamente inóculados, éstas se dejaron en la nevera a temperatura de 4 °C aproximadamente durante 30 min (pre-incubación), con la finalidad de que los discos impregnados con sus diferentes muestras difundieran a través del Agar, para luego llevarlas a la estufa durante 24 h a temperatura de 37 °C en posición invertida en atmósfera aeróbica (incubación).

- 8) Lectura de las placas:** Luego de ser incubadas cada una de las placas por un lapso de tiempo de 24 h, éstas fueron revisadas para realizar la lectura de las mismas con una regla milimétrica. Donde se consideró un resultado positivo o sensible (presencia de actividad antibacteriana) cuando se observó un halo de inhibición alrededor del disco, y se tomó como resultado negativo o resistente (sin actividad antibacteriana) la ausencia de dicho halo. El diámetro de la zona de inhibición producto de la actividad antibacteriana de las muestras en estudio se expresó en milímetros (mm).

Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos por el Método de Difusión en disco

Cepas a evaluar

Candida albicans CDC 385

Candida krusei ATCC 6258

Tomado y modificado de CLSI, 2020.

Materiales a utilizar

- Extractos de etanol de *R. officinalis* (romero)
- Discos de papel de filtro (6 mm)
- Discos de Fluconazol de 25 ug (Control positivo)
- Discos de Voriconazol de 25 ug (Control positivo)
- DMSO (Control negativo)
- Medio de cultivo Agar Müeller Hinton modificado

Metodología

- 1) Preparación de los discos:** Los discos de papel de filtro se impregnaron con 20 µL del extracto dentro de una placa de Petri, y luego se llevaron a esterilizar 1 hora en luz ultravioleta, 24 horas antes del ensayo.
- 2) Preparación del inóculo:** A partir de las cepas frescas (24 horas), se preparó una suspensión ajustada al patrón 1 Mac Farland (3×10^8 UFC/mL) en Solución salina fisiológica estéril.
- 3) Medio de cultivo:** El agar Müeller Hinton modificado (HIMEDIA®) se suplementó con 2% de glucosa y azul de metileno (NCLS, 2004). A cada placa se le agregaron 20 mL del medio de cultivo y el inóculo preparado de cada cepa; se mezcló y se dejó solidificar. Luego se colocaron los discos impregnados con las muestras, con los solventes y el control positivo. Para *C. albicans* se utilizó como control (+) el Fluconazol y para *C. krusei* el Voriconazol.

4) Incubación: Una vez colocados los discos, se dejaron las placas a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego se llevó a 4° C por 4 horas para permitir la difusión de los extractos. Luego se incubaron a 37° C por 24 horas.

5) Lectura del ensayo: Transcurrido el tiempo de incubación, se observó la presencia o no de halos de inhibición alrededor del disco, lo cual indica Sensibilidad o Resistencia respectivamente y se mide en milímetros (mm).

Nota: El estudio se realiza por duplicado.

Diseño de Análisis

El diseño de análisis de la investigación es una manera de responder a la pregunta o hipótesis de investigación, generalmente son clasificados a través de variables cualitativas pudiendo ser ordinal o nominal o cuantitativas discretas o continuas. Sin embargo, es muy común que se combinen o mezclen diseños múltiples cuantitativos y/o cualitativos dentro de un mismo estudio (Hernández y cols., 2014).

Teniendo esto en cuenta, la investigación que se llevó a cabo a partir de la población de estudio como lo fue la especie *R. officinalis* y la muestra representativa constituida por los tallos de dicha especie, corresponde a un diseño de tipo cuantitativo y cualitativo, ya que para los datos recolectados durante la fase interactiva de la investigación se necesitó la medición de halos de inhibición para poder llevar a cabo una interpretación que permitiera distinguir si ocurrió un efecto antimicrobiano positivo o no y de igual forma, se emplearon pruebas que comprendían la observación de colores o precipitados.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Resultados

Se obtuvieron los extractos de hexano y etanol (Tabla 5) de los tallos de romero con las siguientes características macroscópicas:

Tabla 5. Características físicas de los extractos

CARACTERÍSTICA	EXTRACTO DE HEXANO	EXTRACTO DE ETANÓL
Color	Ocre	Marrón
Aspecto	Homogéneo	Heterogéneo
Consistencia	Viscoso	Pastoso
Olor	Característico	Característico
Peso del material seco	78,45 g	78,45 g
Peso del extracto	0,90 g	3,63 g
% de rendimiento	1,149%	4,624%

Fuente: Sánchez, Montoya y Rojas, 2023.

Screening o Tamizaje Fitoquímico

Se efectuaron una serie de pruebas cualitativas a los extractos de hexano y etanol de tallos de romero, obteniendo como resultado la presencia de triterpenos, lactonas sesquiterpénicas y flavonoides para ambos extractos. Además, se logró percibir que el extracto de etanol también presenta compuestos fenólicos y glicósidos cardiotónicos.

Tabla 6. Resultados del Screening fitoquímico de los extractos de hexano y etanol de los tallos de *R. officinalis*

Tipo de metabolito	Prueba realizada	Extracto de hexano	Extracto de etanol
Alcaloides	Dragendorff	-	-
	Mayer	-	-
	Wagner	-	-
Triterpenos/Esteroles	Reacción de Liebermann-Burchard	+ (Verde) + (Rojo)	+ (Rojo)
Compuestos fenólicos	Reacción con FeCl ₃ al 1%	N.D	+++ (Verde/Negro)
Saponinas	Prueba de altura y estabilidad de espuma	-	-
Taninos	Reacción con Gelatina	N.D	-
Flavonoides	Reacción de Shinoda	-	+ (Ligero naranja/Rojo)
	Reacción con NaOH 10%	++	++ (Naranja/Café)
Cumarinas	Reacción con Hidróxido de amonio concentrado	-	-
Antraquinonas	Reacción con Hidróxido de amonio concentrado	-	-
Quinonas	Reacción con H ₂ SO ₄ concentrado en cápsulas	-	-
Lactonas sesquiterpénicas	Reacción de Baljet	+	+
Glicósidos cardiotónicos	Keller – Killiani	N.D	+ (Anillo marrón)

Leyenda: (N.D): No determinado. (+++): Muy abundante. (++) : Abundante. (+): Positivo. (-): Ausente.

Fuente: Sánchez, Montoya y Rojas, 2023.

Alcaloides: Al agregar los reactivos de Dragendorff, Mayer y Wagner a los extractos de hexano y etanol de tallos respectivamente en los tubos destinados para cada prueba, no se observó turbidez, lo cual indica una reacción negativa (-) para estos compuestos.

Triterpenos/ Esteroles: Al dejar caer cuidadosamente ácido sulfúrico concentrado por las paredes del tubo contentivo de extracto de hexano, se observa la formación de dos anillos: uno de color verde y otro de color rojo. Por otra parte, en el tubo con extracto de etanol ocurre la formación de un anillo color rojo como se aprecia en el Anexo N°1.

Compuestos fenólicos: Al adicionar cloruro férrico al extracto de etanol, se obtuvo una coloración de verde a negro (Anexo N°2), lo que refiere la presencia de compuestos derivados del ácido gálico y del catecol.

Saponinas: Lugo de agitar vigorosamente el extracto de etanol no se observó formación de espuma, lo que indica que no hay presencia de estos metabolitos (Anexo N°3).

Taninos: Al colocar el reactivo de gelatina en el tubo con extracto de etanol, no se visualizó la formación de un precipitado blanco (Anexo N°4), lo cual indica que no hay presencia de estos metabolitos.

Flavonoides:

- **Reacción de Shinoda:** Esta prueba resultó negativa para el extracto de hexano, ya que no se observó la aparición de coloración naranja, rojo o magenta (Anexo N°5). Por el contrario, para el extracto de etanol ocurrió la aparición de una coloración naranja a rojo al agregar ácido clorhídrico concentrado, lo que es indicativo de la presencia de flavonas, lo cual puede apreciarse en el Anexo N° 5.
- **Reacción de Hidróxido de Sodio al 10%:** Al adicionar el hidróxido de sodio a ambos extractos, se formó una coloración de naranja a café lo que indica la presencia de flavonoles tanto en el extracto de hexano

como en el de etanol (Anexo N° 6).

Cumarinas: Luego de agregar el hidróxido de amonio concentrado a los extractos, estos fueron expuestos a luz ultravioleta y no se observó fluorescencia, como se puede apreciar en el Anexo N° 7, lo cual indica que no se encuentran presentes estos metabolitos.

Antraquinonas: Al hacer reaccionar los extractos con el hidróxido de amonio concentrado, no hubo la aparición inmediata de color rojo (Anexo N°8), por lo que es indicativo de una reacción negativa (-).

Quinonas: Al colocar porciones de los extractos de hexano y etanol en una cápsula y adicionar ácido sulfúrico concentrado, no hubo coloración roja como se ve en el Anexo N° 9, por lo que no hay presencia de quinonas.

Lactonas sesquiterpénicas: Al someter los extractos mezclados con hidróxido de sodio al 10% frente a unas gotas de ácido clorhídrico concentrado, se observó que la coloración naranja desaparece, indicando la presencia de sesquiterpenlactonas para ambos extractos (Anexo N° 10).

Glicósidos cardiotónicos: El extracto de etanol fue disuelto en agua y tratado con ácido clorhídrico y ácido acético glacial, a esta mezcla se le adicionó una gota de tricloruro férrico observándose la formación de un anillo de color marrón en la interfase de estas mezclas (Anexo N°11), confirmando la presencia de glicósidos cardiotónicos.

Actividad antibacteriana

Los extractos obtenidos con hexano y etanol de los tallos de *R. officinalis* fueron utilizados para impregnar discos de papel filtro de 6 mm de diámetro a una concentración de 10.000ppm. Con los cuales se evaluó mediante el método de Kirby-Bauer su actividad antibacteriana sobre cepas de bacterias grampositivas como *S. aureus* y *E. faecalis* y bacterias gramnegativas como *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. Se evidenció actividad inhibitoria para el extracto de hexano frente a las cepas *S. aureus*, *E. coli* y *K. pneumoniae*, mientras que para *P. aeruginosa* no hubo inhibición. El extracto de etanol mostró inhibición frente a todas las cepas mencionadas inclusive *P. aeruginosa*. Por otra parte la cepa *E. faecalis* fue resistente para ambos extractos, por lo que no hubo halo de inhibición (Anexos N° 12, 13, 14,15 y 16).

Tabla 7. Resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos de tallos de *R. officinalis*.

		Extracto de hexano	Extracto de etanol
Cepas		Halo (mm)	Halo (mm)
Grampositivas	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	7	8
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-	-
Gramnegativas	<i>E. coli</i> ATCC 25922	7	7
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 23357	7	7
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	7

Fuente: Sánchez, Montoya y Rojas, 2023.

Actividad antifúngica

El extracto de etanol obtenido de los tallos de *R. officinalis* fue evaluado mediante la técnica de difusión en agar al igual que en la actividad antibacteriana. En este caso, para determinar la actividad antifúngica en cepas como *C. krusei* y *C. albicans*, no hubo halo de inhibición como se puede observar en los Anexos N° 17 y N° 18, por lo que se evidencia resistencia frente al extracto.

Tabla 8. Resultados de la actividad antifúngica del extracto de etanol de *R. officinalis*.

Cepas	Halo (mm)	Susceptibilidad
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	-	Resistente
<i>C. albicans</i> CDC 385	-	Resistente

Fuente: Sánchez, Montoya y Rojas, 2023.

Tabla 9. Resultados de los controles positivos para la actividad antibacteriana.

Cepas		Antibiótico	Halo de inhibición (mm)
Grampositivas	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	E (15 µg)	32
	<i>E.faecalis</i> ATCC 29212	AMP (10 µg)	32
Gramnegativas	<i>E.coli</i> ATCC 25922	PIP (100 µg)	27
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 23357	PIP (100 µg)	27
	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	PIP (100 µg)	27

Leyenda: E: Eritromicina. AMP: Ampicilina. PIP: Piperacilina. mm: milímetros

Fuente: Sánchez, Montoya y Rojas, 2023

Tabla 10. Resultados de los controles para la actividad antifúngica.

Cepas	Control positivo	Halo de inhibición (mm)	Control negativo	Halo de inhibición (mm)
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	VOR (25 µg)	20	DMSO	0
<i>C. albicans</i> CDC 385	FLO (25 µg)	21	DMSO	0

Leyenda: **VOR:** Voriconazol. **FLO:** Fluconazol. **DMSO:** Dimetilsulfóxido.

mm: milímetros

Fuente: Sánchez, Montoya y Rojas, 2023.

www.bdigital.ula.ve

Discusiones

La composición química de las plantas, en especial la presencia de sus metabolitos secundarios ha sido un punto de enfoque para diversos estudios, ya que se ha demostrado que gran parte de ellos tienen fuerte acción antimicrobiana y muchos de estos compuestos están relacionados con el fenol y sus derivados (Domingo y López, 2003).

En tanto, el presente estudio reveló en los resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de hexano de tallos de romero la presencia de triterpenos, lactonas y flavonoides más específicamente flavonoles, mientras que el extracto de etanol mostró una variedad más amplia de metabolitos tales como compuestos fenólicos, lactonas, triterpenos, glicósidos cardiotónicos, flavonas y flavonoles (ver Tabla 6).

Por lo que, estos resultados se asemejan a lo descrito por Caribe y Campos (1991) donde indican que los diferentes compuestos químicos encontrados en esta planta, son agrupados de forma general en ácidos fenólicos, flavonoides, terpenoides y derivados hidroxicinámicos. Del mismo modo, se reafirma con la investigación realizada por Pardo y cols (2022) al determinarse mediante el tamizaje fitoquímico que los extractos de romero contenían compuestos fenólicos y terpenoides, además azúcares reductores, flavonoides y alcaloides, considerados los compuestos químicos con propiedades reductoras, sin observarse la presencia de saponinas ni resinas.

Asimismo, es importante destacar que existen grupos de metabolitos presentes en las plantas que por su estructura química se reconoce que poseen un mecanismo de acción capaz de inhibir el crecimiento de diversos microorganismos siendo considerados potentes antimicrobianos; entre estos compuestos que le confieren dicha propiedad se destacan los compuestos fenólicos simples, quinonas, taninos, cumarinas, flavonas y alcaloides (Domingo y López, 2003).

Al respecto, en este estudio en cuanto a la actividad antibacteriana el extracto de hexano de tallos de *R. officinalis* a una concentración de 10.000 ppm logró inhibir las cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *K. pneumoniae*, mostrando una zona de inhibición de 7mm para cada cepa, pero frente a las cepas de *E. faecalis* y *P. aeruginosa* no mostró actividad antibacteriana (ver Tabla 7). Asimismo, para el extracto de etanol también hubo actividad antibacteriana para cepas de *S. aureus* con un halo de inhibición de 8mm, *E. coli*, *K. pneumoniae* e incluso *P. aeruginosa* mostrando una zona de inhibición de 7mm, pero *E. faecalis* no tuvo inhibición (ver Tabla 7).

Estos resultados son comparables con los hallados por los investigadores Olivera y cols (2017), quienes encontraron reducciones significativas del crecimiento de cepas como *S. aureus*, *S. mutans* y *P. aeruginosa* frente a extractos de *R. officinalis*, sin embargo, difiere en la inhibición con respecto a *E. faecalis*, lo cual puede deberse a que en su investigación utilizaron las hojas de romero para la obtención de los extractos y no los tallos. Del mismo modo, ambos resultados de actividad antibacteriana presentan coincidencia con lo establecido por Pardo y cols (2022), estudio en el que hubo inhibición bacteriana frente a las bacterias grampositiva *S. aureus*, y gramnegativa *E. coli*, siendo en esta investigación utilizadas las hojas de romero para la obtención de extractos, además de nanopartículas de plata.

En este sentido, se puede decir que los compuestos polares son los que en su mayoría confieren actividad antibacteriana a las plantas, siendo en este caso los fenoles y los flavonoides. Esto se debe a que los compuestos fenólicos al poseer grupos hidroxilos en el anillo se relacionan directamente con la toxicidad del microorganismo, de forma que un aumento en la hidroxilación está ligado a una mayor toxicidad, siendo su mecanismo de acción relacionado con la inhibición enzimática por los compuestos oxidados, posiblemente mediante reacciones de grupos sulfhidrilos o por la interacción

con proteínas. En otro aspecto, las flavonas son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo y su actividad frente a los microorganismos probablemente se debe a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con células de la pared bacteriana (Domingo y López, 2003).

Así, para evaluar los extractos de las plantas con actividad antimicrobiana y poder estudiar los compuestos polares presentes en los mismos, se utilizan generalmente los métodos de difusión (en papel o en pozo), mientras que los métodos de dilución son propuestos para sustancias polares y no polares. Por ello, la técnica en el método Kirby-Bauer fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS de Estados Unidos para realizar el análisis de extractos. Sin embargo, esta técnica con discos presenta la desventaja de que la composición del papel filtro Whatman se compone de celulosa (uniones β -(1-4) de monómeros de glucosa) por lo que muchos grupos hidroxilos libres están presentes en cada glucosa, haciendo que la superficie del disco sea hidrofílica, interviniendo directamente con algunos compuestos catiónicos de los productos naturales absorbiéndolos en la superficie del disco e impidiendo la difusión de estos en el agar. Es por esto, que los compuestos apolares pueden no ser influenciados por dichos grupos hidroxilos y difundir fácilmente en el agar, lo que puede explicar en parte la más alta sensibilidad detectada cuando el método se utiliza directamente en pozo (Ramírez y Castaño, 2009).

Por otro lado, la actividad antifúngica para el extracto de etanol frente a cepas de *C. krusei* y *C. albicans* fue nula (ver Tabla 8), por lo que de igual forma se diferencia con lo investigado por Olivera y cols. (2017) quienes afirman tener una inhibición significativa del crecimiento de *C. albicans* al ser expuesto frente a extractos de *R. officinalis*, lo cual también se debe al material utilizado que fueron las hojas de romero.

En tanto, el romero hoy en día es aprovechado en la industria alimenticia, farmacéutica, cosmética entre otras, siendo los subproductos más importantes del romero sus extractos y aceites esenciales. Además, se expresa que los extractos obtenidos principalmente de las hojas del romero poseen compuestos que proporcionan propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Pardo y cols., 2022). Por ende, la propiedad antimicrobiana de *R. officinalis* la confiere en su mayoría las hojas y no los tallos, haciendo énfasis al estudio de Duarte y Floréz (2020), quienes destacan que el romero es una planta con capacidad antibacteriana y las extracciones por destilación con metanol son apropiadas, pues dicho solvente permite obtener extractos con actividad antimicrobiana.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Para esta investigación de estudio a partir de los 78,45 g de tallos secos de *R. officinalis* se obtuvieron los extractos de hexano con un peso neto de 0,90 g y de etanol con un peso neto 3,63 g.

De esta manera, el estudio fitoquímico de los extractos de hexano y etanol de tallos de *R. officinalis* (romero), permitió reconocer la presencia de diversos metabolitos a los cuales se les atribuye actividad antimicrobiana, en donde los triterpenos, lactonas sesquiterpénicas y flavonoides, son los componentes mayoritarios por ser identificados en ambos extractos.

En el presente estudio el extracto de hexano de tallos de *R. officinalis* mostró actividad antibacteriana solamente frente a las cepas de ATCC de *S. aureus*, *E. coli* y *K. pneumoniae*. Mientras que, el extracto de etanol logró una actividad antibacteriana frente a las cepas de ATCC de *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y también *P. aeruginosa*. Ninguno de los extractos mostró actividad antibacteriana para *E. faecalis*, es decir, no tuvo inhibición.

Por otro lado, la actividad de los compuestos presentes en el extracto de etanol de tallos de *R. officinalis* frente a diferentes cepas de hongos fue nula, ya que no mostró ningún tipo de actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Candida krusei*.

En síntesis, con esta investigación se puede expresar que en los tallos la concentración de metabolitos secundarios es menor que en las hojas, y es por esto que existe una limitada actividad antimicrobiana.

Recomendaciones

1. Evaluar otros tipos de actividades de los metabolitos identificados, tal como actividad antiinflamatoria, antioxidante, antihelmíntica, entre otras.
2. Realizar por duplicado la extracción por reflujo con hexano con el fin de garantizar la obtención de mayor cantidad de extracto puro.
3. Determinar la actividad antibacteriana de los extractos en otras bacterias que no sean las cepas empleadas en este estudio.
4. Evaluar la actividad antifúngica en hongos diferentes a las cepas ya estudiadas y con los extractos de hojas de romero.
5. Evaluar la actividad antifúngica en los extractos de hexano obtenidos de los tallos de romero.
6. Dar a conocer los resultados del trabajo de investigación a las autoridades de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, para que implementen estrategias de actualización y capacitación hacia los estudiantes de pregrado.
7. A los estudiantes de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (ULA), considerar el presente trabajo de investigación para reforzar el conocimiento, potenciando la calidad educativa e investigativa como futuro profesional.
8. Al personal docente de la Escuela de Bioanálisis, motivar a los estudiantes desde inicios de la carrera a realizar estudios sobre la actividad antimicrobiana de las plantas, ampliando sus habilidades teóricas y prácticas.
9. Al departamento de investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA, tomar en cuenta los resultados del presente trabajo de estudio como aporte a otras investigaciones piloto.

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

- Albornoz, A. (2001). Medicina tradicional herbaria. (Cuarta edición). Caracas-Venezuela: Editorial Latino S.A. Pág. 48-49.
- Alcívar, M., Vargas, P., Cuenca, G., y Talledo, M. (2021). Determinación de propiedades antimicrobianas y termofísicas en un producto cárnico con adición del hidrolato de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y tomillo (*Thymus vulgaris*). *Revista científico-profesional*, 1(4), 5-36.
- Amaral, G., Mizdal, C., Stefanello S., Mendez, A., Puntel, R., Soares, F. y Fachinetto, R. (2017). Efecto antibacterial y antioxidante de *Rosmarinus officinalis* L. Extractos y fracciones. *Medicina complementaria original y tradicional*, 9, 2, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.10.006>
- Arias, F. (2006). *El proyecto de investigación. Introducción a la metodología científica* (6ª ed.). Caracas, Venezuela: Editorial Episteme. Pág. 56-60.
- Aricapa, D. (2009). *Actividad antimicrobiana de plantas sobre microorganismos cariogénicos* (Trabajo de Grado). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá Colombia.
- Ávila, R., Navarro, A., Vera O., Dávila, R., Melgoza, N., y Meza R. (2011). Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios. *Ciencia y Mar*, 15 (43), 23-36.
- Basheer, A. (2018). Efectos del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis*. Antagonista de tipos de enterobacteriaceae. Artículo original de ciencia pura, 23, 18-21. DOI: <http://dx.doi.org/10.25130/tjps.23.2018.104>.
- Bustos, C. (2009). Detección en paralelo de bacterias de importancia clínica, implementación de un sistema de identificación de elementos de

- resistencia y patogenicidad por medio de microarreglos. *Revista Especial de Quimioterapia*, 4 (12), 34-39.
- Canales, D., Carazo, L., y Centeno, J. (2011). *Determinación de los metabolitos secundarios de la hoja seca de la especie vegetal Cordia Inermis mediante tamizaje fitoquímico*. [Tesis para optar a licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.
- Caribe, J. y Campos, J. (1991). Plantas que ayudan guía práctica para la época actual. Cultura/ Pensamiento, São Paulo, 356 pp.
- Carrion, A., y García, C. (2010). Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia metódica (Tesis previa a la obtención del título de Bioquímica y Farmacéutica). Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Químicas Escuela de Bioquímica y Farmacia. Ecuador.
- Castillo, G., Zavala, D., y Carrillo, M. (2020). *Análisis Fitoquímico: Una Herramienta Para Develar El Potencial Biológico Y Farmacológico De Las Plantas* (Trabajo de Investigación). Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Chávez, V. (2020). *Resistencia bacteriana a antimicrobianos: Un problema de salud pública sin ESKAPE*. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Vol. 2. Pág. 3 y 4. [Artículo en línea, PDF]. Disponible: <http://milenaria.umich.mx/ojs/index.php/milenaria/article/view/84/40> [Consulta: 2023, marzo 16]
- Delgado, G. (2001). Los productos naturales orgánicos: su diversidad estructural y origen químico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1 (64), 861-864.
- Domingo, D., y López, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Especial de Quimioterapia*, 4 (16), 385-393.
- Dominguez, X. (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica. (1era edición). México: Editorial Limusa.

- Duarte, J., y Flórez, J. (2020). Propuesta de investigación: evaluación de la actividad antibacteriana de extractos y microencapsulados de romero (*Rosmarinus officinalis*) para su aplicación en bioempaques. *Revista tecnoacademia SENA*. 1 (4) 86-88.
- Fernández, J., y Riveras., O. (1998). Las Labiadas (familia Labiatae) en el Instituto de Ciencias Naturales. Artículo de revisión disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/36044482.pdf>
- Flores, E., Sáenz, A., Castañeda, O., y Narro R. (2020). Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): su origen, importancia y generalidades de sus metabolitos secundarios. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 1 (23), 1-13.
- García, A. y Pérez, E. (2009) Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2 (3), 119-145
- García, D. y Rivas, C. (2016). Actividad antifúngica. Investigación en plantas de importancia médica. Barcelona, España. *OmniaScience*, 1(1), 101-128.
- García, R., Cruz, F., Alarcón, F., Nieto, A., y Gallegos, M. (2019). Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos acuosos de *Thalassia testudinum* Banks ex Köning et Sims de la localidad de Champotón, Campeche, México, durante el ciclo anual 2016-2017, 48(1), 12-48.
- García, P., Romero, M., Llanderal, A., Cermeño, P., Lao, M. y Segura, M. (2019). Efectos del estrés por sequía en biomasa, contenido de aceites esenciales, parámetros nutricionales, y costos de producción en seis especies de Lamiaceae. 11, 1-12. DOI: 10.3390/w11030573
- Gillet, E. (2011). Manuales prácticos para la elaboración de bioinsumos. Elaboración de Extractos Vegetales. *Revista LEISA*, 211 (1), 2-8.
- Hamidpour, S. y Elias G. (2017). *Rosmarinus officinalis* (Romero): un Nuevo agente terapéutico, antioxidante, antimicrobiano, anticancerígeno, antidiabético, antidepresivo, neuroprotector, anti-inflamatorio y anti-

- obesidad. *Revista Biomédica de investigación científica y técnica*, 1, 1-6. DOI: 10.26717/BJSTR.2017.01.000371
- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, M. (2014). *Metodología de la investigación*. (6ª ed.). Ciudad de México, México: McGraw-Hill
- Hurtado, J. (1998). El proyecto de investigación, comprensión holística de la metodología y la Investigación. Bogotá-caracas: Ediciones Quirón.
- Iribarrien, N. (2012). Tipos de Extractos Vegetales en la Cosmética Natural. [Artículo en línea]. Disponible: <https://kalimielcursos.com/tipos-de-extractos-vegetales-en-la-cosmetica-natural/?v=a99877f71bd9>
- Köhler's Medicinal Plants. (1887). Guía medicinal alemana.
- Lazcano, A. (2001). El origen de la vida. Evolución química y evolución biológica. *Revista Social Química. Méx.*, 45, 189-194.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2018). *Fitoquímica Orgánica* (Libro) Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Universidad Central de Venezuela.
- Martínez, A. (2020). Química de Productos Naturales. Colombia: Universidad de Antioquia. Colombia.
- Martínez, I., Periago, M., y Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50 (1), 5-18.
- Mestanza, M. (2018). *Caracterización fisicoquímica del aceite esencial de romero (Rosmarinus officinalis) de la Región Amazonas* (Tesis de Grado). Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.
- Montenegro, M., y Pineda, D. (2019). Aislamiento e identificación de terpenos presentes en extractos de hojas maduras de *Myrospermum frutescens*. *Scientia, Revista de Investigación de la Universidad de Panamá*, 29 (1), 32-45.

- Mora, X. (2012). *Bacterias Gram+ y Gram--*. *Selecciones avícolas*. Disponible: <https://seleccionesavicolas.com/pdf/files/2012/2/6536-diferenciando-bacterias-gran-y-gram.pdf> [Consulta: 2023, marzo 16]
- Olivera, J., Daiane, J., Figuera, L., Olivera, F., Pacheco, C., Camargo, S., Olavo, A., y Olivera, L. (2017). Actividades biológicas del extracto de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) analizadas en microorganismos y células. *Rev. Experimental Biology and Medicine*. 1(242) 625-2634.
- Oluwatuyi, M., Kaatz, W., y Gibbons, S. (1994). Actividad antibacteriana y modificadora de la resistencia de *Rosmarinus officinalis*. *Fitoquímica*, 65(5): 3249-3254.
- Paganini, H. (2008). Estudio multicéntrico sobre las infecciones pediátricas por *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente provenientes de la comunidad en la Argentina. *Revista Pediatra Arco Argenta*, 106 (5), 397-403.
- Pardo, L., Arias, J., y Molleda, P. (2022). Elaboración de nanopartículas de plata sintetizadas a partir de extracto de hojas de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y su uso como conservante. *Revista de Ciencias de la Vida*. 35(1):45-58.
- Pérez, O. (2019). Actividad antifúngica *in vitro* del extracto crudo acuoso de *Rosmarinus officinalis* contra *Candida albicans*. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 1(10) 45-61.
- Purca, T. (2013). *Efectividad antibacteriana "in vitro" del extracto etanólico de Rosmarinus officinalis.L (Romero) sobre flora salival* (Trabajo de Investigación). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.
- Ramírez, L., y Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Revista Científica y Tecnológica*, 42 (15), 38-45.

- Reyes, F., Palau, E., y López, A. (2019). *Vapores de aceites esenciales: alternativa de antimicrobianos naturales* (Trabajo de Investigación). Universidad Libre, Seccional Barranquilla Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Maestría en Biotecnología. Colombia.
- Ruiz, O. (2000). Tratado de Botánica, 3a. ed., Porrúa, México D.F., 1256 pp.
- Ruiz, E., y Moreira, J. (2017). Metabolitos secundarios en plantas medicinales usadas para problemas gastrointestinales. Una revisión sobre medicina ancestral ecuatoriana. *Publicación Cuatrimestral*, 3 (2), 1-16.
- Serranillos, M., y Ruiz, O. (2018). *Estudio analítico y de la actividad antioxidante de "Rosmarinus officinalis" L. de la Península Ibérica*. (Trabajo de Investigación). Universidad Complutense de Madrid Facultad de Farmacia. España.
- Shahidi, F., Janitha, P. y Wanasundara, D. (1992). Antioxidantes fenólicos. Revisiones críticas en ciencia de los alimentos y nutrición, 32(1): 67-103.
- Sik, B., Hanczné, E., Kapcsándi, V. y Ajtony, Z. (2020). Técnicas de extracción convencionales y no convencionales para procesos de extracción óptima de romero perteneciente a la familia Lamiaceae. Análisis biomédico y farmacéutico. 184, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113173>
- Simental, J., y Avila, O. (1999). Caracterización del extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) obtenidos con CO₂ supercrítico, partiendo de la determinación teórica de la extracción por etapas. Diario de la química agrícola y alimentaria, 47(2): 103-113.
- Stevens, H., y Heywood, T. (2001). *Asterideas-Euasterídeas I: Lamiales: Lamiaceae*. (Trabajo de Investigación). Diversidad Vegetal Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (UNNE).

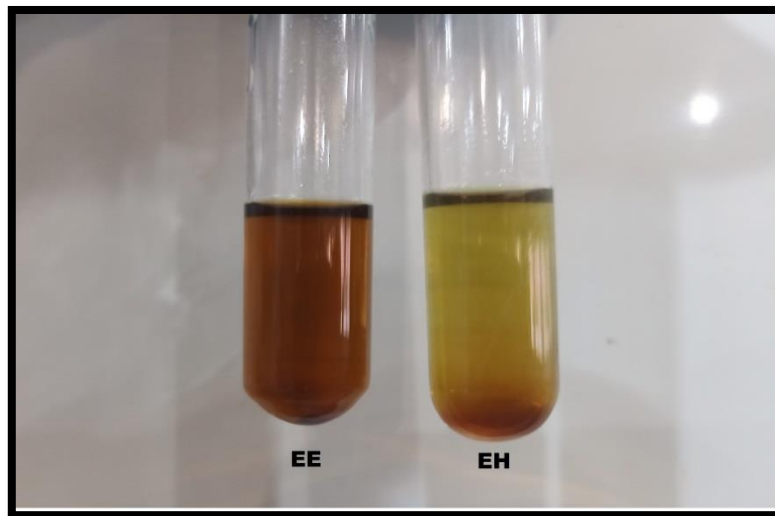
- Torrenegra, A., Miladys, E., y Méndez, G. (2017) Actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales de diferentes especies del género *Citrus*, *Revista de Investigación Científica*, 46 (2), 160-175.
- Trupti, P. y Gadekar, S. (2018). Estudios de la actividad antibacteriana del romero. *Biociencias original y farmacéutica*, 6, 36-39. DOI: 10.31555/jpbs/2018/6/2/36-39
- Vignola, M., Serra, M., y Andreatta, A. (2020). Actividad antimicrobiana de diversos aceites esenciales en bacterias benéficas, patógenas y alterantes de alimentos. *Revista Tecnología y Ciencia*. Vol. 3. Pág 5-11. DOI:<https://doi.org/10.33414/rtyc.37.92-100.2020>
- Washington, C. (2007). *Diagnóstico microbiológico*. 6a ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana.

www.bdigital.ula.ve

ANEXOS

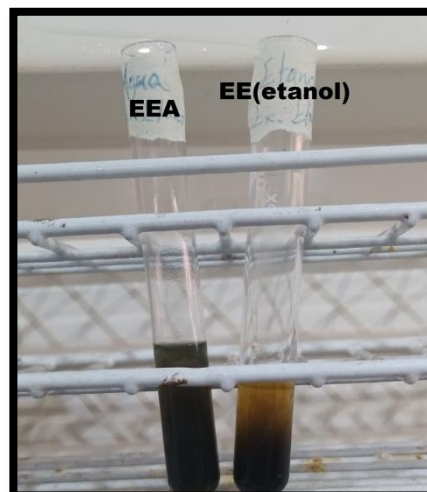
www.bdigital.ula.ve

Anexo N° 1: Determinación de triterpenos en extractos de tallos de *R. officinalis*. Positivo (+) para extracto de hexano: anillo verde y rojo. Positivo (+) para extracto de etanol: anillo rojo.



Leyenda: EE: Extracto de etanol. EH: Extracto de hexano

Anexo N° 2: Compuestos fenólicos. Positivo (+) en extracto de etanol de tallos de *R. officinalis*.

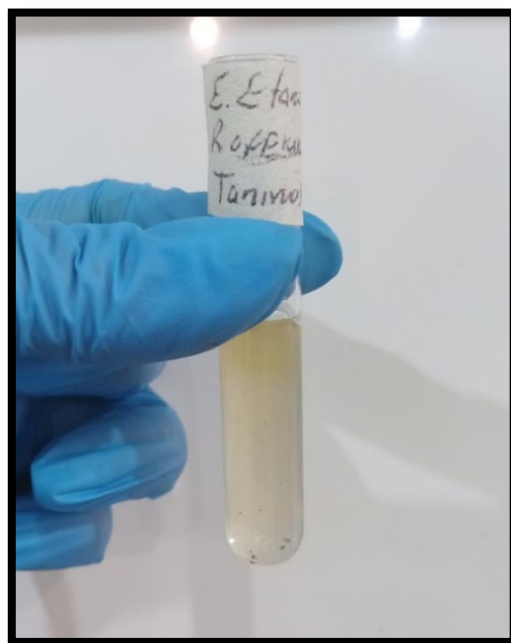


Leyenda: EEA: Extracto de etanol acuoso. EE(etanol): Extracto de etanol en etanol

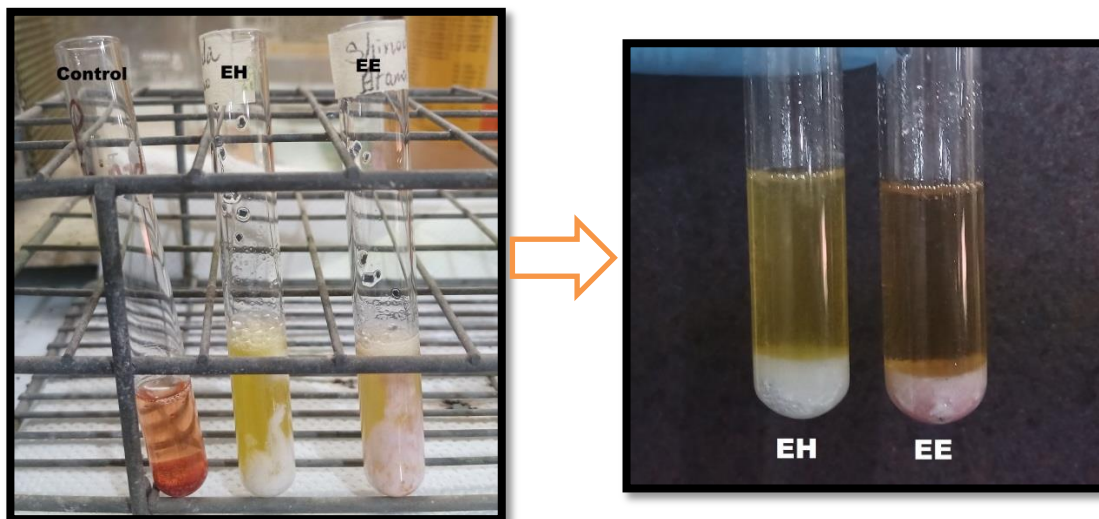
Anexo N° 3: Saponinas. Negativo en extractos de hexano y etanol de tallos de *R. officinalis*.



Anexo N° 4: Taninos. Negativo (-) en extracto de etanol de tallos de *R. officinalis*.



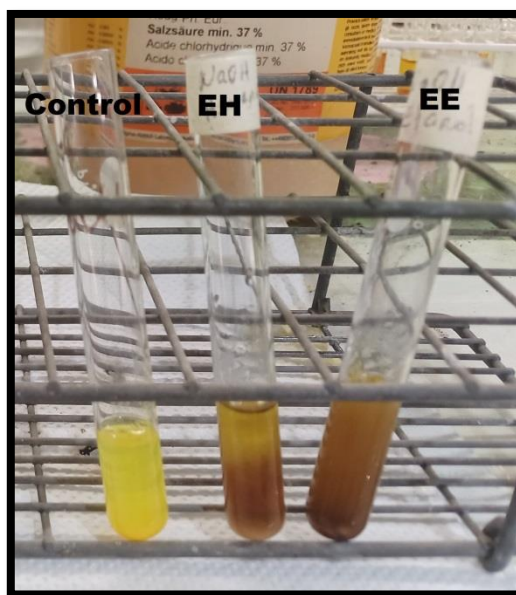
Anexo N° 5: Determinación de Flavonoides. Reacción de Shinoda:
Negativo (-) en extracto de hexano y Positivo (+) en extracto de etanol



Leyenda: EH: Extracto de hexano. EE: Extracto de etanol.

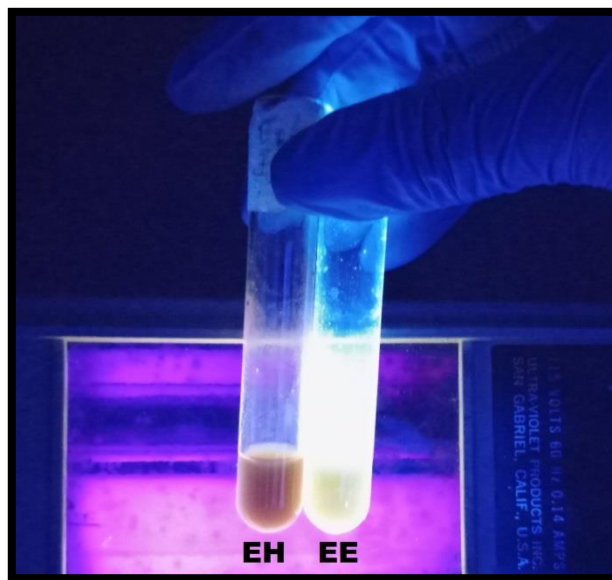
www.bdigital.ula.ve

Anexo N° 6: Determinación de Flavonoides. Reacción con NaOH al 10%.
Positivo para ambos extractos.



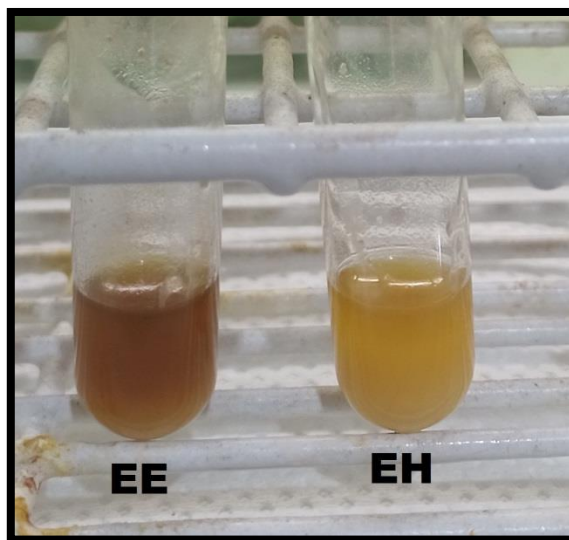
Leyenda: EH: Extracto de hexano. EE: Extracto de etanol.

Anexo N° 7: Determinación de Cumarinas. Negativo (-) para extractos de hexano y etanol.



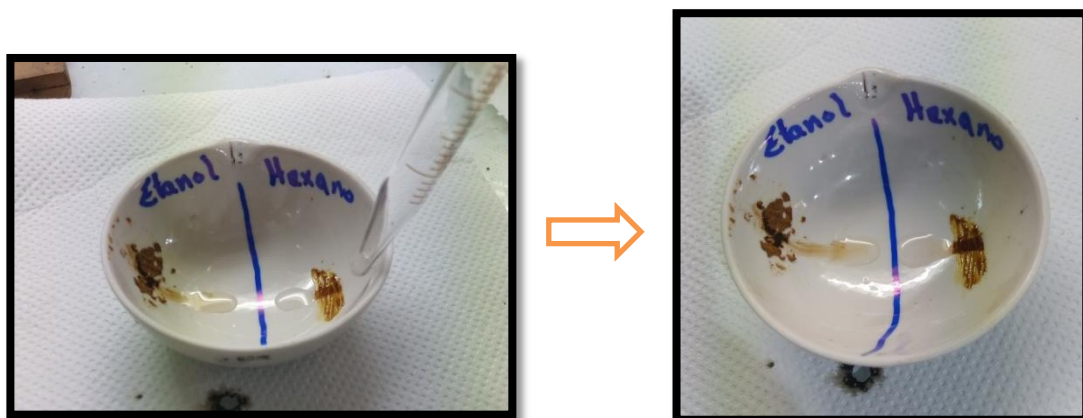
Leyenda: EH: Extracto de hexano. EE: Extracto de etanol.

Anexo N° 8: Antraquinonas. Negativo (-) para ambos extractos de tallos de *R. officinalis*.

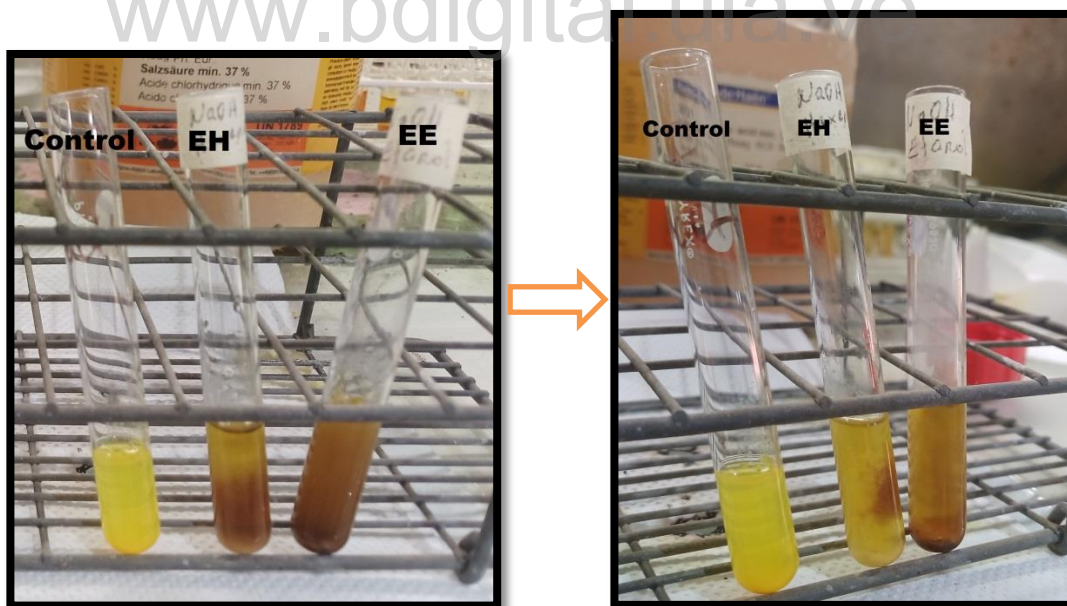


Leyenda: EH: Extracto de hexano. EE: Extracto de etanol

Anexo N° 9: Determinación de quinonas. Negativo (-) en ambos extractos de tallos de *R. officinalis*.



Anexo N° 10: Determinación de lactonas sesquiterpénicas. Positivo (+) para ambos extractos de tallos de *R. officinalis*.



Leyenda: EH: Extracto de hexano. EE: Extracto de etanol

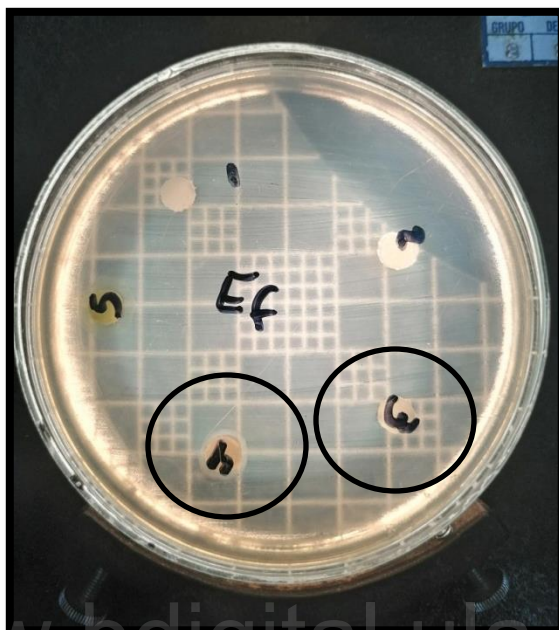
Anexo N° 11: Glicósidos cardiotónicos. Positivo en extracto de etanol de tallos de *R. officinalis*.



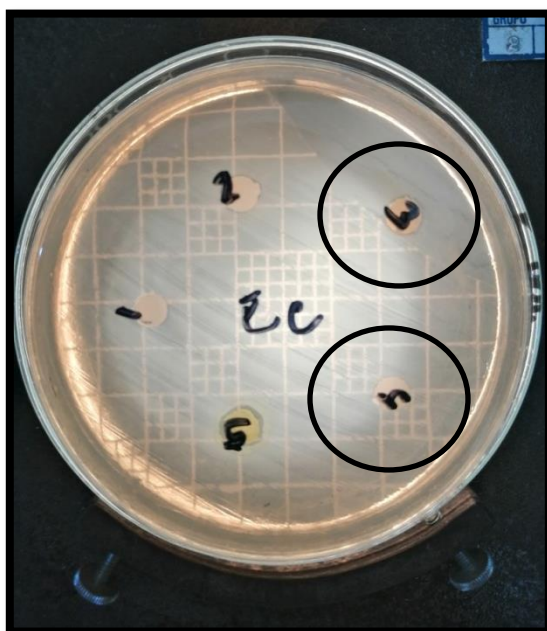
Anexo N° 12: Actividad antibacteriana de extractos de hexano (3) y etanol (4) de tallos de *R. officinalis* para cepas de *S. aureus*.



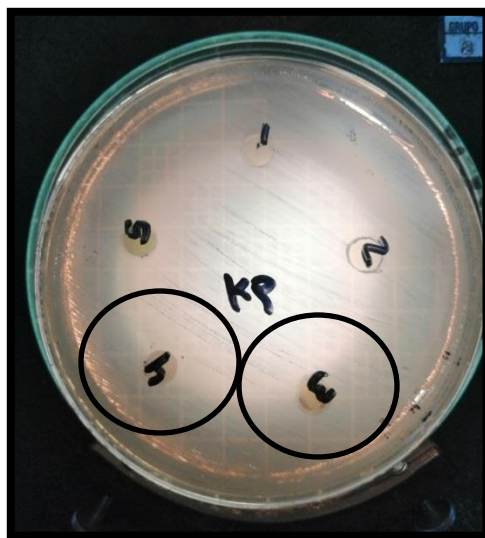
Anexo N° 13: Actividad antibacteriana de extractos de hexano (3) y etanol (4) de tallos de *R. officinalis* para cepas de *E. faecalis*.



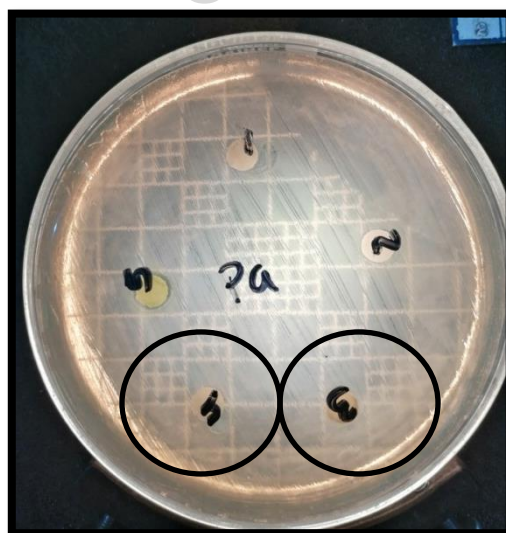
Anexo N° 14: Actividad antibacteriana de extractos de hexano (3) y etanol (4) de tallos de *R. officinalis* para cepas de *E. coli*



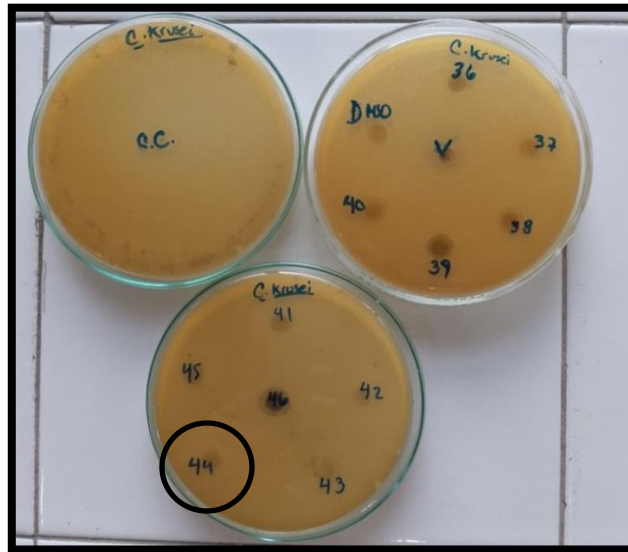
Anexo N° 15: Actividad antibacteriana de extractos de hexano (3) y etanol (4) de tallos de *R. officinalis* para cepas de *K. pneumoniae*



Anexo N° 16: Actividad antibacteriana de extractos de hexano (3) y etanol (4) de tallos de *R. officinalis* para cepas de *P. aeruginosa*

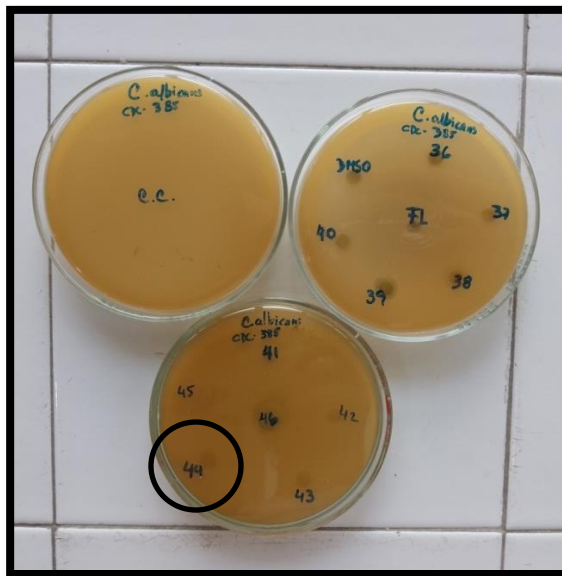


Anexo N° 17: Actividad antifúngica de extractos de etanol (44) de tallos de *R. officinalis* para cepas de *C. krusei*



Leyenda: CC: Control de crecimiento. V: Voriconazol. DMSO: Dimetilsulfóxido

Anexo N° 18: Actividad antifúngica de extractos de etanol (44) de tallos de *R. officinalis* para cepas de *C. albicans*



Leyenda: CC: Control de crecimiento. FL: Fluconazol. DMSO: Dimetilsulfóxido