

Especialización en Terapéuticas Alternativas y Farmacología Vegetal



FUNDACIÓN UNIVERSITARIA
JUAN N. CORPAS

Educación y Salud de Calidad
con Sentido Social

Trabajo de grado

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES DE *Rosmarinus officinalis* EN DIFERENTES MUESTRAS

**YENNY ANDREA AGUDELO LEMUS MD
CHRISTIAN CAMILO LÓPEZ FARFÁN MD
SANDRA MILENA MARTÍNEZ FONSECA MD
ERIKA LILIANA RUIZ MALAVER MD**

**FUNDACION UNIVERSITARIA JUAN N. CORPAS
ESCUELA DE MEDICINA
TERAPÉUTICAS ALTERNATIVAS Y FARMACOLOGIA VEGETAL
BOGOTÁ D.C.
2017**

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES DE *Rosmarinus officinalis* EN DIFERENTES MUESTRAS

**YENNY ANDREA AGUDELO LEMUS MD
CHRISTIAN CAMILO LÓPEZ FARFÁN MD
SANDRA MILENA MARTÍNEZ FONSECA MD
ERIKA LILIANA RUIZ MALAVER MD**

**Trabajo de tesis para optar el título de especialista en Terapéuticas
Alternativas y Farmacología Vegetal**

**Directora de tesis:
Liliana Paola Borrego Muñoz
Licenciada en química, maestrante en ciencias biológicas – química de
los productos naturales**

**FUNDACION UNIVERSITARIA JUAN N. CORPAS
ESCUELA DE MEDICINA
TERAPÉUTICAS ALTERNATIVAS Y FARMACOLOGÍA VEGETAL
BOGOTÁ D.C.
2017**

TABLA DE CONTENIDO

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES DE <i>Rosmarinus officinalis</i> EN DIFERENTES MUESTRAS	1
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES DE <i>Rosmarinus officinalis</i> EN DIFERENTES MUESTRAS	2
LISTA DE ANEXOS	5
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABLAS	7
GLOSARIO.....	8
RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN	11
1. OBJETIVOS.....	12
1.1.	
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
2.1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	13
2.2. JUSTIFICACIÓN.....	13
3. MARCO TEÓRICO	14
3.1. ROMERO.....	14
3.1.1. Taxonomía.....	14
3.1.2. Composición química	15
3.1.3. Usos	15
3.1.4. Reacciones adversas y contraindicaciones	16
3.2 ACEITE ESENCIAL.....	17
3.2.1. Métodos de obtención	17
3.2.2. Métodos de identificación	19
3.3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	19
3.4. MICRORGANISMOS	21
3.4.1. <i>Escherichia coli</i>	22

3.4.2. Staphylococcus aureus	22
3.4.3. Klebsiella pneumoniae	23
4. MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1. MATERIALES	24
4.1.1. Insumos	25
4.1.2. Equipos:.....	25
4.1.3. Reactivos:.....	25
4.2. METODOLOGÍA.....	25
4.2.1. Tipo de estudio	25
4.2.2. Población a estudio.....	25
4.2.3. Localización.....	26
4.2.4. Recolección de la muestra e identificación de material vegetal	26
4.2.5. Obtención de aceite esencial	26
4.2.5. Cromatografía de gases y espectrometría de masas.....	26
4.2.6. Actividad antimicrobiana	27
5. RESULTADOS	29
5.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS.	29
5.2. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL MATERIAL VEGETAL Y EL ACEITE ESENCIAL OBTENIDO.....	31
5.3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	34
5.3.1. Volumen 5 µL.....	35
5.3.2. Volumen 15 µL.....	38
6. ANALISIS DE RESULTADOS.....	41
6.1 CROMATOGRAFÍA DE GASES	41
6.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	42
7. CRONOGRAMA	43
8. DISCUSIÓN	44
9. CONCLUSIONES.....	46
10. RECOMENDACIONES	47
11. BIBLIOGRAFIA.....	48
ANEXOS.....	53

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Ubicación satelital GPS de material vegetal.....	53
Anexo B. Identificación por el herbario según protocolo del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia.	55
Anexo C. Compuestos identificados en CMG-EM	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Equipo de hidrodestilación clevenger modificado.	18
Figura 2. Cepa de Escherichia coli.	22
Figura 3. Cepa de Klebsiella pneumoniae.	23
Figura 4. Cromatógrafo Universidad Militar Nueva Granada.	27
Figura 5. Rosmarinus officinalis (M1R) Rancho natural.	31
Figura 6. Rosmarinus officinalis (M2R). Barrio Aranjuez.	32
Figura 7. Rosmarinus officinalis (M3R) Jardín medicinal Jorge Piñeros Corpas. ...	32
Figura 8. Cromatografía M1R. Reporte UMNG Laboratorio de química bioorgánica.	29
Figura 9. Cromatografía M2R. Reporte UMNG Laboratorio de química bioorgánica.	29
Figura 10. Cromatografía M3R. Reporte UMNG Laboratorio de química bioorgánica.	30
Figura 11. Halos de inhibición de los controles.	34
Figura 12. Halos de inhibición de M1R (5 µL)	36
Figura 13. Halos de inhibición M2R (5 µL).....	37
Figura 14. Halos de inhibición M3R (5 µL).....	37
Figura 15. Halos de inhibición M1R (15 µL).....	38
Figura 16. Halos de inhibición de M2R (15 µL).....	39
Figura 17. Halos de inhibición de M3R (15 µL).....	40

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Rosmarinus officinalis</i>	14
Tabla 2. Condiciones botánicas y labores culturales de material vegetal.	32
Tabla 3. Características geográficas de las muestras vegetales.	33
Tabla 4. Material vegetal y características de aceite esencial.	34
Tabla 5. Terpenos identificados en las muestras.	30
Tabla 6. Diámetros de halos de inhibición (mm) de los controles.	34
Tabla 7. Diámetros de halos de inhibición (mm) y porcentaje de inhibición de M1R (5 µL).	36
Tabla 8. Diámetros de halos de inhibición (mm) y porcentaje de inhibición de M2R (5 µL).	36
Tabla 9. Diámetros de halos de inhibición (mm) y porcentaje de inhibición de M3R (5 µL).	37
Tabla 10. Diámetros de halos de inhibición (mm) y porcentaje de inhibición de M1R (15 µL).	38
Tabla 11. Diámetros de halos de inhibición (mm) y porcentaje de inhibición de M2R (15 µL).	39
Tabla 12. Diámetros de halos de inhibición (mm) y porcentaje de inhibición de M3R (15 µL).	40
Tabla 13. Porcentaje de área de terpenos de cada material vegetal de romero.	41
Tabla 14. Actividad antimicrobiana a 5µL	42
Tabla 15. Actividad antimicrobiana a 15µL	42

GLOSARIO

ACEITE ESENCIAL: Son fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA: Proceso a través del cual se inhibe o se elimina el crecimiento de un microorganismo.

ALCANFOR: Producto sólido, cristalino, blanco, urente y de olor penetrante característico, que se obtiene del alcanforero tratando las ramas con una corriente de vapor de agua y se utiliza principalmente en la fabricación del celuloide y de la pólvora sin humo y, en medicina, como estimulante cardíaco

ALFA-PINENO: El alfa-pineno es uno de los monoterpenos más abundantes encontrado en aceites de coníferas y presente en la gran mayoría de aceites esenciales. Los pinenos son de gran valor como precursores de aromas y fragancias cuyos derivados se producen por oxidación y en menor cantidad por extracción directa de plantas.

CROMATOGRAFIA: Es una técnica que permite la separación de los componentes de una mezcla debido a la influencia de dos efectos contrapuestos. Una fase móvil que puede ser un líquido o un gas y una fase estacionaria que puede ser un sólido o un líquido anclado a un soporte sólido.

HALO DE INHIBICION: Medida en una placa de agar de la potencia de antibiótico frente al germen.

HIDRODESTILACION: Técnica de obtención de aceites esencial de una planta aromática, mediante el uso del vapor saturado a presión atmosférica.

ISOPRENOIDES: Son moléculas muy abundantes en los vegetales y su clasificación se determina por el número de isoprenos que contienen.

METABOLITOS SECUNDARIOS: Compuestos sintetizados por las plantas con propiedades biológicas que determinan los diversos usos de las especies vegetales.

MONOTERPENOS: Son metabolitos secundarios de las plantas, formados a partir de la unión de dos unidades de isopreno. Estos compuestos contienen 10 átomos de carbono y juegan un papel importante en la función metabólica de las plantas.

ROMERO: Nativa del área mediterránea. Es un arbusto erguido de hoja perenne que puede crecer hasta una altura de casi dos metros. El tronco leñoso aguanta ramas rígidas con corteza con fisuras. Las hojas son como agujas de color verde oscuro por arriba y blancas por debajo. Ambas, las hojas frescas y secas fuertes. Sus pequeñas flores son de color azul pálido. Las hojas y partes de las flores contienen un aceite volátil.

SESQUITERPENOS: Consisten en tres unidades isopreno y tienen la fórmula molecular $C_{15}H_{24}$. El alcohol sesquiterpénico es también conocido como Farnesol, el prefijo farnesil indica tres unidades isopreno.

TERPENO: Nombre común a ciertos hidrocarburos que se encuentran en los aceites volátiles obtenidos de las plantas, principalmente de las coníferas y de los frutos cítricos.

TERPENOIDES: Son un grupo de compuestos naturales caracterizados por su estructura, que consta o se deriva de varias repeticiones de un esqueleto de cinco carbonos (C5) la subunidad isopreno, por lo que se llaman también isopropenoides.

TIEMPO DE RETENCIÓN: Es el tiempo que tarda la fase móvil en atravesar la columna cromatográfica.

RESUMEN

La especie *Rosmarinus officinalis* conocida comúnmente como romero perteneciente a la familia Lamiáceae presenta diversos usos en medicina dentro de los cuales se destaca su actividad antimicrobiana, antioxidante y antiespasmódico. Determinamos si existe diferencia en la actividad antimicrobiana del *Rosmarinus officinalis* en tres muestras, mediante la obtención del aceite esencial e identificación de metabolitos secundarios. Se obtuvieron 3 muestras vegetales y a partir de las hojas se obtuvo el aceite esencial por hidrodestilación con el equipo clevenger modificado; usando cromatografía de gases acoplada a espectometría de masas (CG-EM) se determinó la composición química y mediante medición de halos de inhibición se evaluó la actividad antimicrobiana frente a las cepas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*.

Los monoterpenos identificados con mayor porcentaje de coincidencia en los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* en las 3 muestras vegetales denominadas como M1R, M2R Y M3R, fueron eucaliptol, 1R- α pineno, bornanone, camfeno, α -pineno, acetato de borneol.

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales a un volumen de 5 μ L; presentó un mayor porcentaje de inhibición frente a *Klebsiella pneumoniae* en las tres muestras de romero denominadas: muestra de romero uno (M1R), muestra de romero dos (M2R) y muestra de romero tres (M3R); M1R y M2R no mostraron actividad frente a *Staphylococcus aureus*. Con un volumen de 15 μ L en todas las muestras de romero, se observó actividad antimicrobiana con porcentajes de inhibición superiores al 50% frente a las cepas de estudio.

Palabras claves:

Rosmarinus officinalis, aceite esencial, CG-EM, actividad antimicrobiana.

INTRODUCCIÓN

Colombia cuenta con gran variedad de plantas medicinales que año tras año se han venido analizando y descubriendo en ellas principios activos con grandes beneficios para la salud; dentro de estas plantas tenemos a *Rosmarinus officinalis*, una especie de la familia Lamiaceae cuyo nombre común es romero.

El presente estudio de investigación buscó determinar si existe diferencia en la actividad antimicrobiana del *Rosmarinus officinalis* en tres muestras, mediante la obtención del aceite esencial e identificación de metabolitos secundarios.

Es importante enriquecer los trabajos en los que se documenta el beneficio de algunas plantas frente a infecciones bacterianas, con el fin de aplicar su uso como manejo complementario ya que hoy en día se vive una problemática secundaria al aumento de la resistencia antibiótica, lo cual lleva a tiempos prolongados de tratamientos y complicaciones asociadas a la pérdida de eficacia de los antibióticos por la aparición de microorganismos resistentes.

Este proyecto evaluó la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales del romero sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar actividad antimicrobiana del aceite esencial obtenido de las hojas de *Rosmarinus officinalis* en tres diferentes muestras de material vegetal.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener los aceites esenciales a partir de las hojas de *Rosmarinus officinalis*.
- Determinar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de las hojas de *Rosmarinus officinalis*.
- Identificar los metabolitos secundarios en los aceites obtenidos de las hojas de *Rosmarinus officinalis*.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

¿Existe diferencia en la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de hojas de *Rosmarinus officinalis* recolectadas en tres diferentes zonas geográficas, siendo la misma especie?

2.2. JUSTIFICACIÓN

Reconociendo la ayuda complementaria que representa la farmacología vegetal para el tratamiento de diferentes enfermedades, buscamos evaluar la actividad antimicrobiana del romero para ofrecer tratamientos coadyuvantes en patologías bacterianas que puedan requerir un manejo terapéutico adicional o complementario.

Actualmente no se encuentran registros publicados en Colombia de estudios comparativos de la especie *Rosmarinus officinalis*, por lo que es de nuestro interés identificar los metabolitos secundarios y evaluar si existe diferencia en la actividad antimicrobiana de dichos metabolitos, aspectos que consideramos importantes en el momento de elegir la materia prima para la elaboración de los medicamentos de origen vegetal.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. ROMERO

La especie *Rosmarinus officinalis*, es una planta perteneciente a la familia Lamiácea originaria de la región del mediterráneo, su nombre es derivado de latín *ros* rocío y *marinus* mar. Generalmente se encuentra en forma silvestre en zonas rocosas y arenosas cerca al mar, pero debido a su adaptabilidad se reproduce fácilmente en otras zonas. Se cultiva con éxito en suelos calcáreos y su propagación es por medio de la siembra de las semillas, después del florecimiento se cortan aproximadamente 10 cm por encima del suelo y se destila vapor para aislar el contenido de aceite volátil de la planta (1–4).


Es un arbusto verde, alcanza una altura aproximada de 1 metro, con tallos erectos, las hojas son coriáceas, opuestas, nervio central prominente. El tamaño de la hoja es de 1 a 2.2 cm de largo y 4 cm de ancho. La superficie superior de la hoja es verde y por debajo es de color gris, son de ápice obtuso y se estrechan en la base, no pecioladas. Tiene inflorescencias de flores blancas o azules con los dos estambres que se proyectan más allá de la corola. (Tabla 1) (1,2).

3.1.1. Taxonomía

La tabla 1 relaciona la clasificación taxonómica del *Rosmarinus officinalis*. (2)

Tabla 1. Taxonomía de *Rosmarinus officinalis*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnolipsida
Subclase	Asteridae
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	Rosmarinus L
Especie	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.



Fuente: <http://www.vcmhc.com/175-2/>

3.1.2. Composición química

Se han reportado diversos compuestos químicos, diferentes autores los agrupan en ácidos fenólicos, flavonoides, aceite esencial, ácidos triterpénicos y alcoholes triterpénicos (2,5).

El aceite del romero es incoloro o amarillo pálido, con sabor y gusto alcanforado. Su índice de refracción de 1.464 a 1,476 y tiene una rotación óptica de 5 a 10°, el aceite es insoluble en agua, soluble en 10 volúmenes de 80% de alcohol, el valor del ácido no es mayor a 1(1).

En el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. por cromatografía gaseosa se han detectado la presencia de monoterpenos hidrocarbonados: alfa-pineno en un 22.69% y limoneno en 2.81% y monoterpenos oxigenados: eucaliptol o 1,8 cineol en un 20.21%, bicyclo, heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl o alcanfor en un 13.36%, verbenona, acetato de bornilo borneol (1,24,27); también se han identificado betapineno, canfeno, mirceno, gama tirpineno, isoberneol, terpineol, 1 7 dimetil 1 octanol, isomentona, alcanfor, dedihidrocarvona, acetato de isobornilo (2).

Los principales compuestos en la fracción de hidrocarburos fueron alfa- pineno (44,2 %), canfeno (24,5 %), y limoneno (11,7 %), mientras que en la fracción oxigenada que eran 1,8- cineol (37,6%), alcanfor (16,5%), y acetato de bornilo (21,4%) (6).

Dependiendo la predominancia de los compuestos químicos presentes en el aceite esencial se han diferenciado tres quimiotipos: cineolifurm (alto porcentaje de 1,8 cineol), camforifeum (más del 20% en alcanfor) y verbenoniferum (más del 15% en verbenona) y otros monoterpenos como borneol, b-pineno, limoneno y p-cimeno. (13)

3.1.3. Usos

El romero se utiliza como carminativo, rubefaciente, estimulante y como un agente aromatizante para alimentos, lociones para cabello, jabones y cosméticos (1). Las hojas de romero tienen muchos usos medicinales por su acción antibacteriana y antiespasmódica. Se describe su uso oral para síntomas dispépticos y uso local para problemas articulares y circulatorios. También se utiliza en dolores de cabeza, trastornos menstruales, cansancio, nerviosismo, problemas de memoria, esguinces y contusiones (7).

Respecto al sistema nervioso, es usado para tratar la debilidad general, insomnio, fatiga mental, ansiedad, depresión, y cefaleas. A nivel cardiovascular mejora la circulación, aumenta la tensión arterial y la frecuencia cardíaca. En el sistema gastrointestinal es útil en halitosis y malestar estomacal, promueve una adecuada digestión, tonificación y efecto calmante sobre la digestión, favorece la función del hígado y estimula producción de bilis (2).

En aromaterapia se utiliza el aceite esencial como descongestionante además para mejorar la memoria y la concentración. El aceite se utiliza en cremas para artritis, contusiones, dolores musculares, úlceras y heridas. Las flores se colocan en armarios y en la ropa para destruir las polillas. Las hojas se trituran en carnes, pescado ensaladas para prevenir intoxicaciones por alimentos (2).

Científicamente se ha demostrado su actividad antimicrobiana, antioxidante, antihepatotóxica, antinefrotóxica, antitumoral, antiulcerosa, además su efecto diurético, antiespasmódico y acción osteoclástica (1,3,4). Por otra parte se ha documentado de forma experimental su actividad antitumoral resaltando el incremento de la apoptosis de células del cáncer hepático, la inhibición del glioma inducido por el factor de necrosis tumoral y la protección frente al tumor cutáneo y de mama (2).

Se ha observado que la actividad antioxidante de los extractos del romero se debe a los ácidos caféico y rosmarínico, este último posee doble función: antioxidante y estimulante de la producción de prostaglandina E2 e inhibidor de la producción de leucotrienos B4 en leucocitos polimorfonucleares, lo que también resulta importante como acción antiinflamatoria (8,9). Por último se le ha conferido una actividad antiplaquetaria debido a que inhibe al ácido araquidónico, al colágeno y a la trombina (2).

3.1.4. Reacciones adversas y contraindicaciones

La literatura ha reportado los siguientes eventos y reacciones relacionados con el uso del *Rosmarinus officinalis* (2):

- Inhalado puede causar irritación y raramente laringoespasma.
- Reacciones de hipersensibilidad en la piel.
- Dermatitis de contacto y queilitis.

- En Menores de 12 años y durante la gestación se desconocen márgenes de seguridad.

3.2 ACEITE ESENCIAL

Los aceites esenciales son sustancias líquidas volátiles presentes en cada una de las partes de la planta que por sus propiedades aromáticas y antioxidantes, son utilizados en la realización de perfumes, saborizantes, condimentos y como antibacterianos de acuerdo a las propiedades estudiadas de la planta a manejar (10,11).

Son componentes heterogéneos que están formados por sesquiterpenos, terpenos, ácidos, ésteres, lactonas, presentes en las plantas. Los monoterpenoides y los sesquiterpenoides son terpenos de 10 a 15 carbonos, derivan biosintéticamente de geranilpírofosfato (GPP) y farnesilpírofosfato (FPP) respectivamente (12).

Los aceites esenciales se caracterizan por ser volátiles y líquidos a temperatura ambiente, además son incoloros, liposolubles y con densidad inferior a la del agua. Tienen un índice refractario elevado y son solubles en alcoholes y disolventes orgánicos (12).

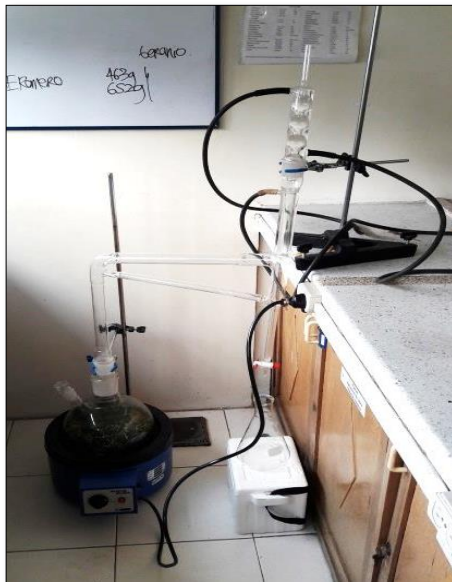
3.2.1. Métodos de obtención

Se pueden obtener por distintos métodos, el más utilizado es la extracción en corriente de vapor o destilación, para extraer aromas florales delicados se utiliza enflorado con grasas a temperatura ambiente. Otro método es la extracción con disolventes orgánicos a temperatura ambiente (12,13).

3.2.1.1. Hidrodestilación

Se debe tener claridad entre el proceso llamado destilación por arrastre de vapor pues es similar al proceso de hidrodestilación; en el primer proceso el vapor saturado o sobresaturado está fuera del equipo principal, mientras que en el segundo proceso el material vegetal y el agua se encuentran en contacto directo durante el proceso de generar vapor (10,14).

Figura 1. Equipo de hidrodestilación clewenger modificado (Laboratorio FUJNC)



Fuente: Autores.

Para dar inicio a este proceso, se debe tomar el material vegetal bien sea molido, macerado o triturado, el cual debe ser suficiente con el fin de obtener la cantidad de aceite que se requiere, dicho material y el agua se calienta hasta obtener el punto de ebullición. El producto obtenido lleva vapor de agua el cual contiene las partículas del aceite esencial, que al estar en contacto con el agua disminuye su punto de ebullición lo cual permite su obtención (13).

En este proceso se utiliza un equipo denominado clewenger (Figura 1), considerado el equipo más adecuado para determinar la totalidad del aceite esencial en una planta aromática. Consta de un balón donde se deposita la planta molida y una cantidad de agua pura, lo cual se calienta de una forma constante haciendo que el aceite esencial con el agua se evapore. Una conexión en D permite acumular y separar el aceite esencial de la mezcla condensada, este proceso se lleva a cabo en dos fases, la fase orgánica que contiene el aceite esencial, y la fase acuosa en la que el agua contiene una pequeña fracción de aceite esencial, lo que genera por ejemplo, las esencias florales (11,13).

3.2.2. Métodos de identificación

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas es una técnica que permite realizar la separación de compuestos volátiles y su respectiva identificación hasta la cuantificación de estos, con el fin de reconocer los metabolitos de la sustancia a estudiar. La técnica de cromatografía de gases se implementó desde el año 1952 donde se identifica y se valida su utilidad (15). Proporciona resultados obtenidos en corto tiempo con alta resolución y sensibilidad de las muestras analizadas. Factores como la temperatura participan en el desarrollo de la identificación de compuestos volátiles y semivolátiles por lo tanto se limita su uso en compuestos poco volátiles, sensibles a cambios térmicos o formas iónicas, por tanto el uso de esta técnica se enfoca en compuestos volátiles o semivolátiles y que sean térmicamente estables o que toleren temperaturas de 300 a 400 °C (15,16).

A través de la cromatografía de gases se pueden identificar cantidades de compuestos individuales en la muestra sometida a proceso de análisis a partir de curvas de calibración de los patrones de lectura. Es por esto que la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, logra una detección de compuestos volátiles cuantificables de sustancias orgánicas (16).

La muestra que va a ser sometida a análisis debe ser colocada en la fase móvil que habitualmente es helio. Durante esta fase los componentes de la muestra pasan por la fase estacionaria que se encuentra fija en una columna capilar localizada en un área que permite programar temperatura. Cada componente debe migrar a velocidad entre la fase móvil y la estacionaria, cada soluto presente en la muestra es afín a la fase estacionaria lo que determina su separación, los que son retenidos fuertemente en la fase estacionaria se moverán lento, y los que no, se moverán más rápido separándose en bandas para su análisis cuantitativo y cualitativo(15,16).

Por otro lado la espectrometría de masas tiene la capacidad de identificar de manera precisa y sin errores el espectro de cada molécula, midiendo la concentración de las sustancias e identificando la estructura de la molécula en el menor tiempo posible. La identificación se compara con una colección de espectros previamente determinados en la máquina de análisis, con el fin de identificar la molécula de origen (16).

3.3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Las plantas medicinales pueden tener actividad biológica debido al conjunto de compuestos químicos que la componen. Los aceites esenciales son el producto volátil obtenido de una materia prima vegetal y resultan ser el producto final del metabolismo secundario de las plantas aromáticas, constituyendo hasta el 80% de los mismos, otros compuestos están solo en trazas y están constituidos principalmente por terpenos con actividad y composición variada, son de naturaleza oleosa y son encontrados prácticamente en todas las plantas (17).

Existen gran variedad de antimicrobianos de origen vegetal como los ácidos orgánicos, el timol, el carvacrol, el eugenol, los isotiocianatos, la alicina, los fenoles y los polifenoles(17).

Luqman *et al.*, 2007 (3), han reportado que la inactivación microbiana de los aceites esenciales con actividad antimicrobiana es causada por daño de la pared celular de los microorganismos, desordenes en la membrana citoplasmática, agotamiento de las fuerzas motrices de los protones, coagulación de los contenidos celulares o alteraciones en el flujo de electrones, en el flujo del contenido celular y en el transporte activo. Davidson y Branen (1993) (18), indicaron que puede ser por inactivación de enzimas esenciales o al reaccionar con la membrana celular y alterar la función del material genético. López – Malo (1995) (19), señala que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales puede deberse al deterioro de varios sistemas enzimáticos en los microorganismos, incluidos aquellos involucrados en la producción de energía y en la síntesis de componentes estructurales (17).

La acción de los metabolitos secundarios pueden conducir a la desnaturalización de las proteínas y a la destrucción de la membrana celular, haciéndola más permeable, terminando en ruptura o fuga del material del citoplasma, lisis celular y por ende en la muerte del microorganismo (19).

Las bacterias Gram negativas son generalmente menos sensibles a los aceites esenciales debido a los lipopolisacáridos presentes en su membrana externa, lo que restringe la difusión de compuestos hidrófobos, por lo que se requiere un mayor tiempo de exposición a los aceites esenciales (19).

Estudios experimentales han demostrado que el aceite esencial de romero tiene actividad antimicrobiana, antiinflamatorio, antiséptico, diurético, antiespasmódico (20). El extracto de hoja de *Rosmarinus officinalis* afecta a la membrana celular de las bacterias, la actividad citotóxica afecta directamente a la fase mitótica de las bacterias Gram positivas y Gram negativas (21).

Considerando la gran variedad de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales, es muy probable que la actividad antimicrobiana no sea atribuible a un mecanismo específico, sino a la acción combinada de varios de ellos (22). Los factores que pueden afectar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales son el grado de inhibición del tipo de microorganismo, el tipo de sustrato, las variaciones en la composición de la planta, las diferencias en las zonas geográficas de cultivo (17); también depende del carácter hidrófilo o hidrófobo del aceite esencial, los componentes químicos presentes y el tipo de microorganismo (19).

Los aceites esenciales se introducen a la célula infectada a través de los lípidos de la membrana celular y mitocondrial, alterando su estructura y haciéndolas más permeables, ocasionando fuga de iones y otros contenidos celulares llevando a la muerte celular (22). Por su insolubilidad en agua pueden reducir la capacidad de dilución o causar separación de fases en los medios en los que se requiere evaluar, además periodos muy largos de incubación pueden dar lugar a la evaporación o descomposición de algunos de los componentes químicos presentes en el aceite esencial durante su evaluación (19).

Son muchos los factores que influyen en la composición de un aceite, como por ejemplo el origen, la especie, el órgano de la planta, las condiciones climáticas y de crecimiento (temperatura, fertilizantes, tierra de cultivo, etc.), así como la destilación, la forma de almacenamiento del aceite y la madurez de la planta en el momento de la recolección (22); varía también dependiendo del órgano de la planta empleado, la época de cosecha, las condiciones ambientales y método de extracción, tiempo de extracción (23); genotípica y diferencias ambientales dentro de las especies; entre otros factores (24).

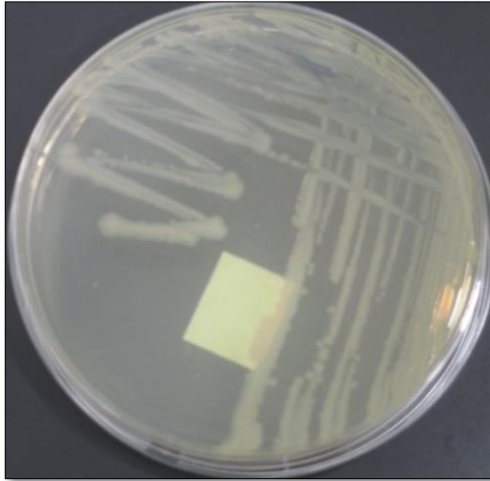
La efectividad de cada método puede ser afectada por diferentes factores tales como el origen del aceite esencial, el volumen del inóculo, la fase de crecimiento del microorganismo, el medio de cultivo utilizado, el tiempo de inoculación, la temperatura, el pH y la actividad de agua del medio (19).

3.4. MICRORGANISMOS

Las cepas implicadas en este estudio son las que se relacionan a continuación:

3.4.1. *Escherichia coli*

Figura 2. Cepa de *Escherichia coli*.



Fuente: Autores

Es un anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, se caracteriza por poseer bacilos Gram negativos, no formadora de esporas, se mueve por medio de flagelos peritricos. La cubierta consta de tres elementos: la membrana citoplasmática, la membrana externa y, entre ambas, un espacio periplásmico constituido por péptido-glucano. Esta última estructura confiere a la bacteria su forma y rigidez, y le permite resistir presiones osmóticas ambientales relativamente elevadas. En la figura 2, se muestra una cepa de este microorganismo (25).

Escherichia coli coloniza el intestino del hombre y se considera de flora normal, pero hay descritos seis grupos de *E. coli* productora de diarrea: enterotoxigénica, enterohemorrágica, enteroinvasiva, enteropatógena y enteroagregativa (25,26).

3.4.2. *Staphylococcus aureus*

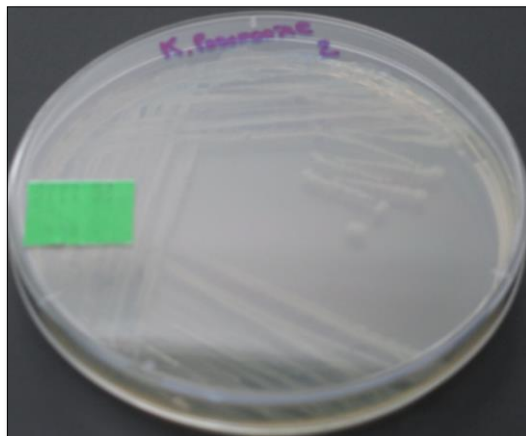
Es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa, inmóvil, no esporulada y que no posee cápsula. La mayoría de los estafilococos producen catalasa, enzima capaz de desdoblarse el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre. El género *Staphylococcus* contiene 32 especies, de las cuales 16 de ellas se localizan en los humanos, algunas forman parte de la flora de piel y mucosas en humanos, y otras

se encuentran sólo entre la flora de otros mamíferos y aves. Algunas de estas especies son patógenas cuando existe predisposición e inmunosupresión en el huésped (27). Entre las especies que colonizan al humano, las de mayor importancia clínica son: *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus lugdunensis* (28).

Una característica sobresaliente del genoma de *Staphylococcus aureus* es la presencia de gran número de elementos móviles, que contienen factores de virulencia y resistencia a diversos antimicrobianos. Los transposones pueden transportar uno o más marcadores de resistencia antibiótica (28).

3.4.3. *Klebsiella pneumoniae*

Figura 3. Cepa de *Klebsiella pneumoniae*.



Fuente: Autores.

Corresponde a la familia *Enterobacteriaceae*, son microorganismos con forma de bastón, está formado por bacilos Gram negativos, anaeróbicos facultativos y oxidasa negativos. Se caracteriza por ser generalmente capsuladas, no móviles, productoras de la enzima lisina descarboxilasa (29,30). Su envoltura celular es una estructura multilaminar, su membrana interna consta de una doble capa de fosfolípidos que regula el paso de nutrientes, metabolitos y demás moléculas (29). La membrana externa consta de otra doble cadena de fosfolípidos que incluyen lipopolisacáridos que hacen parte un factor importante de virulencia. En la figura 3, se muestra una cepa de este microorganismo

Forma parte de flora habitual en boca, piel e intestinos puede causar infección urinaria y neumonía y aunque con poca frecuencia absceso hepático. La mayoría

de las infecciones se adquieren en medio hospitalario u ocurren en paciente inmunocomprometidos (31).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

A continuación se relacionan por categorías, los materiales utilizados para llevar a cabo este trabajo.

4.1.1. Insumos

- Material vegetal: Hojas de *Rosmarinus officinalis*.
- Micropipetas.
- Pinzas.
- Sensidiscos blancos estériles.
- Puntas para micropipetas.
- Cajas de Petri.

4.1.2. Equipos:

- Hidrodestilador tipo clevenger modificado.
- Cromatógrafo de gases.
- Balanza de precisión.
- Incubadora.

4.1.3. Reactivos:

- Agar Mueller Hinton
- Agar Tripticasa de Soya
- Agua peptonada
- Agua destilada
- Diclorometano

4.2. METODOLOGÍA

4.2.1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio observacional de la actividad antimicrobiana del *Rosmarinus officinalis* en tres muestras diferentes.

4.2.2. Población a estudio Se tomó para este estudio la parte aérea de la especie *Rosmarinus officinalis*

4.2.3. Localización

Se obtuvieron muestras del material vegetal (M1R, M2R y M3R) a partir de tres zonas geográficas diferentes en la sabana de Bogotá D.C.

4.2.4. Recolección de la muestra e identificación de material vegetal

Se realizó visita a los tres lugares seleccionados para la toma de las muestras del material vegetal. De cada lugar se tomó aproximadamente 1 kg de material vegetal; se cortó los tallos de aproximadamente 30 cm de longitud y de grosor similar. El material fue transportado en bolsas plásticas y conservado en frío.

Adicional a esto se recolectó ejemplares botánicos para identificación por el herbario según protocolo del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia.

4.2.5. Obtención de aceite esencial

A partir de las de las muestras del material vegetal, previa trituración de hojas, se realizó la hidrodestilación con el equipo clewenger modificado para la obtención del aceite esencial, el cual se utilizó para realizar la cromatografía de gases más espectrometría de masas y el análisis de actividad antimicrobiana.

Se calculó la densidad del aceite vegetal de acuerdo a la siguiente fórmula:

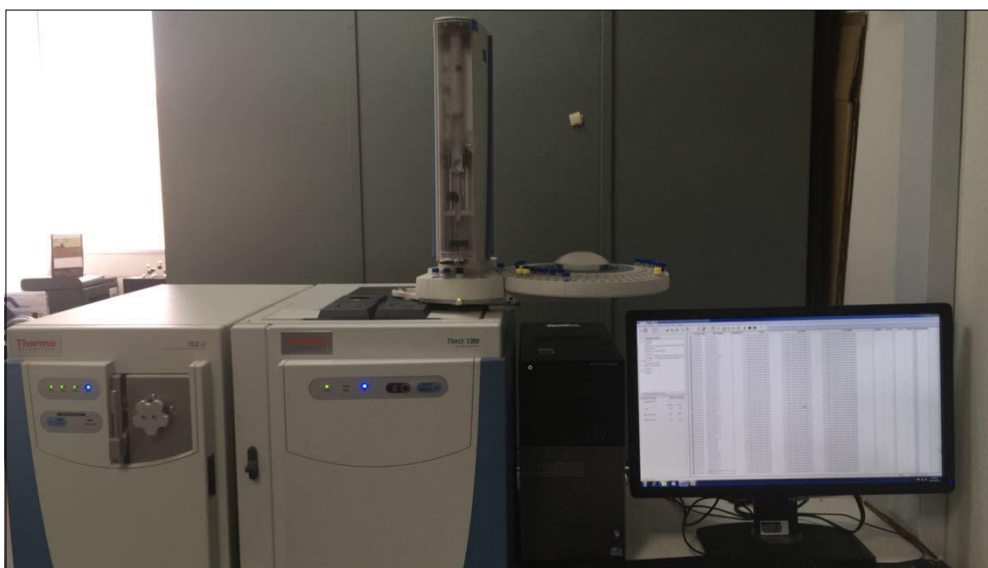
$$\text{Densidad del aceite vegetal} = \frac{\text{masa (g)}}{\text{volumen (ml)}}$$

4.2.5. Cromatografía de gases y espectrometría de masas

En el laboratorio de ciencias básicas y química bioorgánica de la Universidad Militar Nueva Granada se llevó a cabo la identificación de metabolitos secundarios mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los perfiles cromatográficos y los espectros de masas fueron obtenidos con un equipo Thermo Trace 1300 acoplado a un espectrómetro de masas ISQ LT con cuadrupolo sencillo como analizador (Figura 7). Para el análisis se utilizó una columna Rxi® 5Sil MS de 60 m, 0.25 mm ID y 0.25 μm df (5% difenil/95% dimetilpolisiloxano).

Se implementó un programa de temperatura empezando en 120 °C manteniéndose durante 2 min, luego se aplicó una rampa de 6 °C/min hasta llegar a 300°C manteniéndose durante 10 min; el volumen de inyección fue 1 μL en modo Split, con un flujo de 1mL/min y una relación de Split de 10. La forma de ionización fue impacto electrónico (E.I) a 70 eV.

Figura 4. Cromatógrafo Universidad Militar Nueva Granada.



Fuente: autores

4.2.6. Actividad antimicrobiana

En el laboratorio de microbiología de la Fundación Universitaria Juan N Corpas, se llevó a cabo la evaluación de la actividad antimicrobiana.

Las cepas que se utilizaron en los ensayos fueron ATCC (American Type Culture Collection), para gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; y para gram negativas *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031. El cultivo celular de cada uno de los microorganismos se preparó inoculando cada una de las cepas ATCC por siembra masiva en una caja de petri con Agar Tripticasa de soya a partir de las perlas del sistema de preservación Cryobank.

Se incubaron a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, en condiciones aptas para bacterias. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la tinción de gram para cada uno de los microorganismos verificando la pureza del cultivo y a través de medios sólidos selectivos. El inóculo utilizado contiene $3,0 \times 10^8$ UFC/mL equivalentes al estándar número 1 de la escala McFarland (USP 2014). Se usaron como controles positivos gentamicina y vancomicina a una concentración de 30 μg .

Se calculó el porcentaje de inhibición del material vegetal con respecto a los controles según la siguiente fórmula (32) tomando como datos primarios los diámetros de los halos de inhibición del material vegetal y del medicamento control:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{\text{Promedio del diametro del material vegetal}}{\text{Promedio del diametro del control}} \times 100$$

5. RESULTADOS

5.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

A continuación se relacionan las imágenes de los reportes de las cromatografías obtenidas del análisis de los aceites esenciales en cada una de las muestras (Figuras 8 a 10), donde se observan los picos del área de retención de las sustancias 1R α -Pineno, eucaliptol, 2-Bornanone y α -Terpineol.

Figura 5. Cromatografía M1R. Reporte UMNG Laboratorio de química bioorgánica.

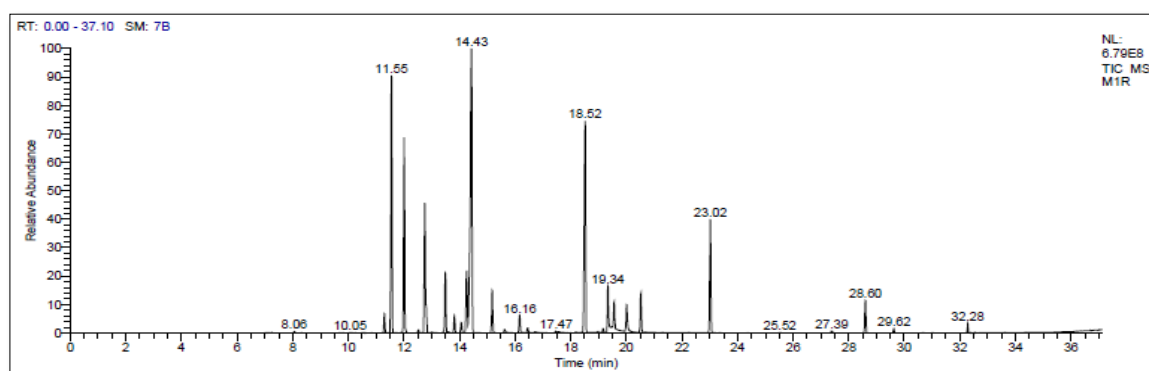


Figura 6. Cromatografía M2R. Reporte UMNG Laboratorio de química bioorgánica.

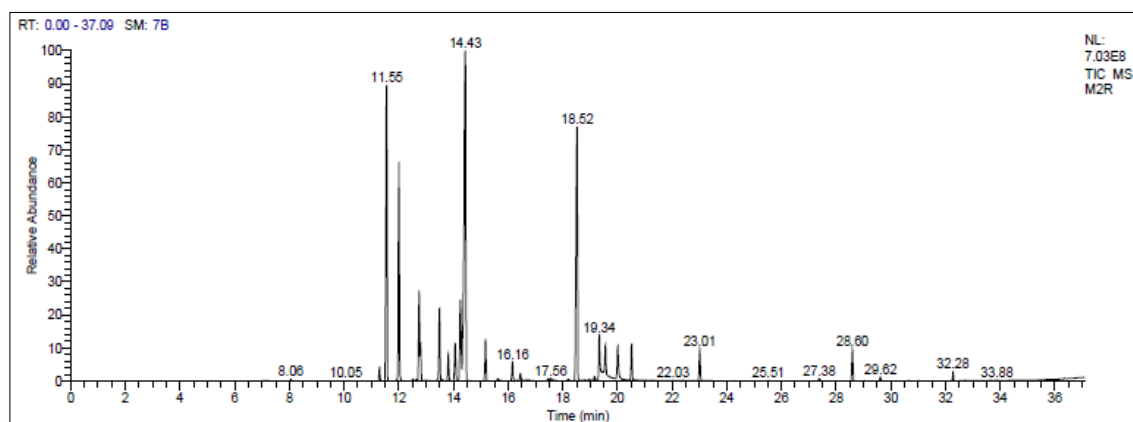
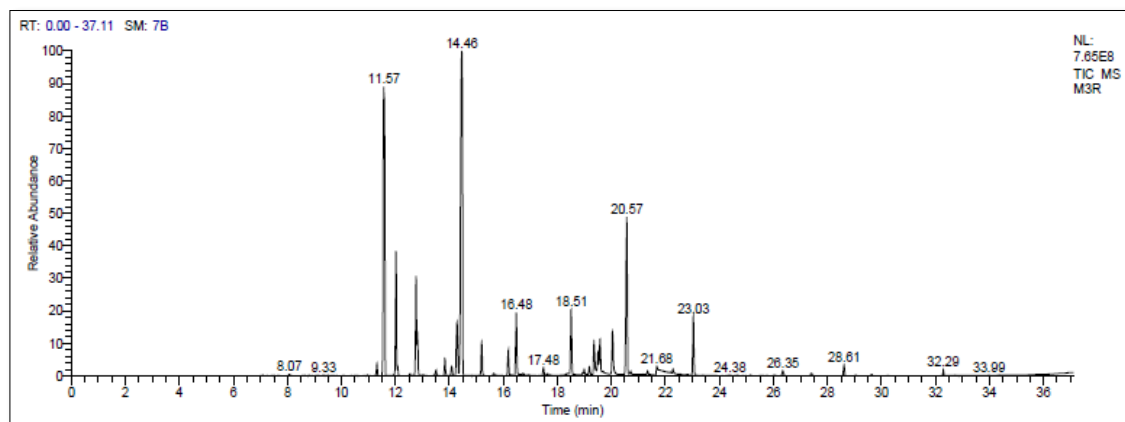


Figura 7. Cromatografía M3R. Reporte UMNG Laboratorio de química bioorgánica.



En cada una de las imágenes se evidencia cómo se comporta la abundancia relativa en el tiempo para las tres muestras obtenidas.

En el Anexo C se encuentra los compuestos que por comparación presentan más de un 90% de coincidencia con el espectro de la librería NIST 08 y los porcentajes de abundancia de cada componente dentro del aceite esencial, el 29,4% corresponden a terpenos.

En el aceite esencial de cada muestra fueron identificados 51 compuestos de los cuales 14 corresponden a monoterpenos y 1 sesquiterpeno (tabla 5).

Tabla 2. Terpenos identificados en las muestras.

M1R - M2R – M3R
1R α Pineno
Camfeno
α Pineno
D Limoneno
Eucaliptol
Cis α Terpineol
α Linalool
Endo-borneol
I-Verbenona
Acetato de borneol
Cariofileno

c-Terpineno

α felandreno

Alcanfor

Terpinen 4 ol

5.2. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL MATERIAL VEGETAL Y EL ACEITE ESENCIAL OBTENIDO

Se realizó la consecución del material vegetal en tres zonas geográficas de la sabana de Bogotá D.C., encontrando dos cultivos orgánicos y un arbusto ornamental, tal como se muestra en las figuras 5 a 7. En la tabla 2 se describen las características botánicas de las muestras.

Figura 8. *Rosmarinus officinalis* (M1R) Rancho natural.



Fuente: Autores.

Figura 9. *Rosmarinus officinalis* (M2R). Barrio Aranjuez.



Fuente: Autores.

Figura 10. *Rosmarinus officinalis* (M3R) Jardín medicinal Jorge Piñeros Corpas.



Fuente: Autores.

Tabla 3. Condiciones botánicas y labores culturales de material vegetal.

	M1R	M2R	M3R
Fecha recolección	29/09/2016	01/10/2016	03/10/ 2016
Variedad	Israelí	Israelí	Crespo

Edad del cultivo	18 meses	8 años	10 años
Origen	Esquejes	Esquejes	Esquejes
Altura	50 cm	120cm	180 cm
Color	Verde brillante	Verde oscuro	Verde brillante
Ambiente cultivo	Campo abierto-suelo	Matera	Campo abierto-suelo
Área sembrada	40 m ²	2 m ²	10 m ²
Manejo de cultivo	Aspersión	Lluvia	Aspersión
Fumigación	3 meses con ajo y ají	No	No
Control de arvenses	Manual	No	Manual
Manejo fitosanitario	Orgánico	No	Orgánico

Se recogieron las muestras de material vegetal en las tres ubicaciones referidas de acuerdo a las localizaciones que se describieron en la tabla 3. Las características, con relación al peso, material vegetal densidad y rendimiento de cada una de las muestras de romero se describen la tabla 4.

Tabla 4. Características geográficas de las muestras vegetales.

	M1R	M2R	M3R
Ubicación	Rancho Natural: Km 6.5 vía Siberia – Tenjo	Barrió Aranjuez. Localidad Usaqué	Jardín medicinal Jorge Piñeros Corpas
Coordenadas	Latitud: 4° 84' 58.13" N. Longitud: -74° 15' 85.55" W	Latitud: 4° 74' 35.94" N. Longitud: -74° 03' 37.66" W	Latitud: 4° 76' 15.39" N. Longitud: -74° 09' 26.71" W
Altura	2.551 msnm.	2.557 msnm.	2.557 msnm.

Tabla 5. Material vegetal y características de aceite esencial.

MUESTRA	PESO (g)	ACEITE ESENCIAL (mL)	DENSIDAD (g/mL)	RENDIMIENTO (%)
M1R	1054,3	11	0,85	0,888
M2R	509,1	5	0,81	0,795
M3R	999,5	9	0,83	0,754

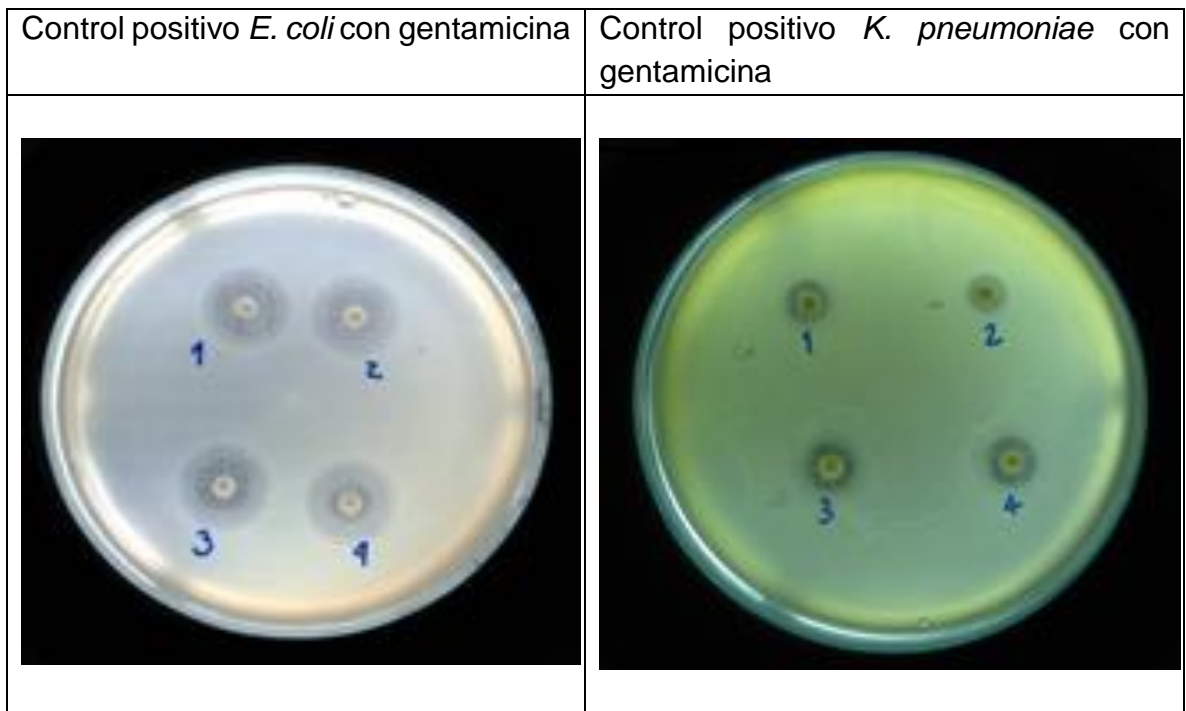
5.3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Se utilizaron como antibióticos control para las cepas seleccionadas gentamicina y vancomicina a concentraciones de 30 mcg. Se realizó la evaluación actividad antimicrobiana de estos antibióticos control, encontrando los diámetros de los halos de inhibición reportados en la tabla 6. En la figura 11 se observan los halos de inhibición de los controles.

Tabla 6. Diámetros de halos de inhibición (mm) de los controles.

CONTROL POSITIVO	D1	D2	D3	D4	PROMEDIO	ANTIBIOTICO
<i>Escherichia coli</i>	17,56	16,55	15,82	11,47	15,35	GENTAMICINA
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13,54	13,76	13,15	13,97	13,61	GENTAMICINA
<i>Staphylococcus aureus</i>	15,67	16,00	14,92	15,43	15,51	VANCOMICINA

Figura 11. Halos de inhibición de los controles.



Adicionalmente, se realizó la evaluación de la actividad antimicrobiana del material vegetal encontrado, basados en dos volúmenes diferentes de los aceites esenciales (5 y 15 μ L).

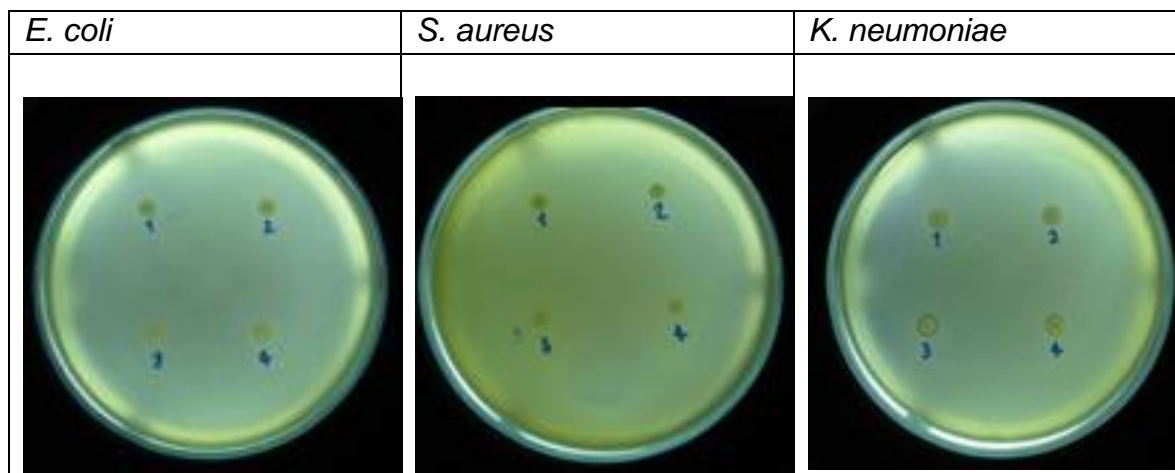
5.3.1. Volumen 5 μ L

En la tabla 7 se reporta el promedio de los halos de inhibición del material vegetal (M1R) con el porcentaje de inhibición con un volumen de 5 μ L del aceite esencial frente a tres cepas estudiadas. En la figura 12 se observan los halos de inhibición del material vegetal frente a las 3 cepas.

Tabla 7. Diámetros de halos de inhibición (mm) y porcentaje de inhibición de M1R (5 μ L).

M1R	D1	D2	D3	D4	PROMEDIO	% INHIBICIÓN
<i>E. coli</i>	8,10	8,27	8,06	8,06	8,12	52,92
<i>K. pneumoniae</i>	8,35	8,32	8,31	8,37	8,33	61,28
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0

Figura 12. Halos de inhibición de M1R (5 μ L)

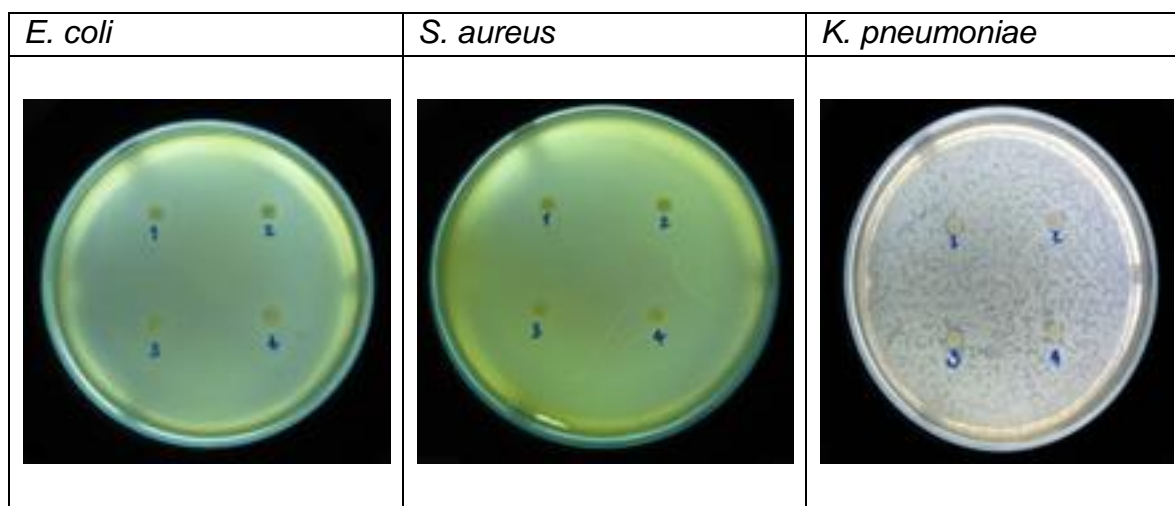


En la tabla 8 se reporta el promedio de los halos de inhibición y porcentaje de inhibición con un volumen de 5 μ L del aceite esencial de M2R frente a las tres cepas estudiadas. En la figura 13 se observan los halos de inhibición del material vegetal frente a las 3 cepas.

Tabla 8. Diámetros de halos de inhibición (mm) y porcentaje de inhibición de M2R (5 μ L).

M2R	D1	D2	D3	D4	PROMEDIO	% INHIBICIÓN
<i>E. coli</i>	8,75	8,16	8,44	8,76	8,52	55,55
<i>K. pneumoniae</i>	8,25	7,97	7,62	8,29	8,03	59,04
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0

Figura 13. Halos de inhibición M2R (5 μ L).

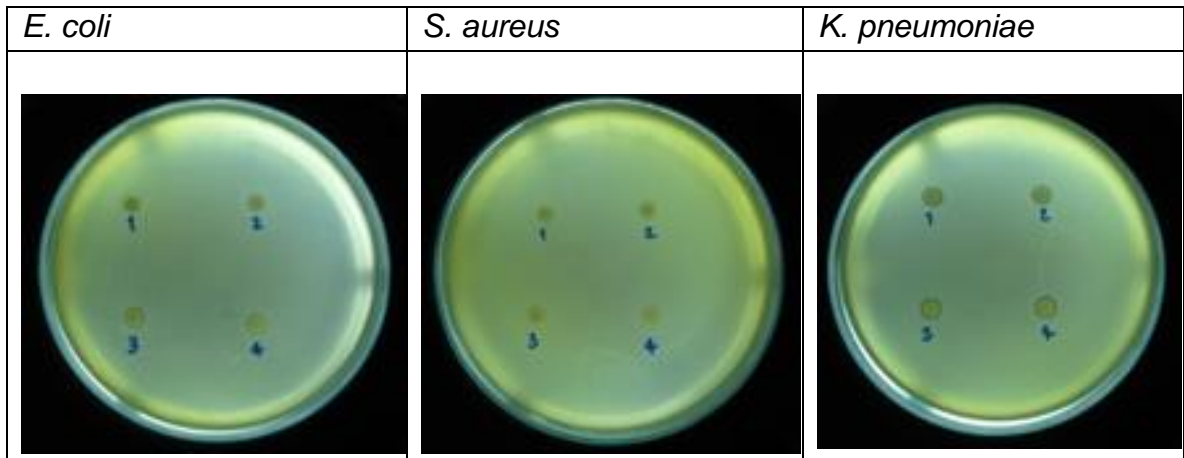


En la tabla 9 se reporta el promedio de los halos de inhibición y porcentaje de inhibición con un volumen de 5 μ L del aceite esencial de M3R frente a las tres cepas estudiadas. En la figura 14 se observan los halos de inhibición del material vegetal frente a las 3 cepas.

Tabla 9. Diámetros de halos de inhibición (mm) y porcentaje de inhibición de M3R (5 μ L).

M3R	D1	D2	D3	D4	PROMEDIO	% INHIBICIÓN
<i>E. coli</i>	7,64	8,65	8,87	8,37	8,38	54,61
<i>K. pneumoniae</i>	9,32	9,00	9,81	9,12	9,31	68,45
<i>S. aureus</i>	8,10	8,11	8,10	8,01	8,08	52,11

Figura 14. Halos de inhibición M3R (5 μ L).



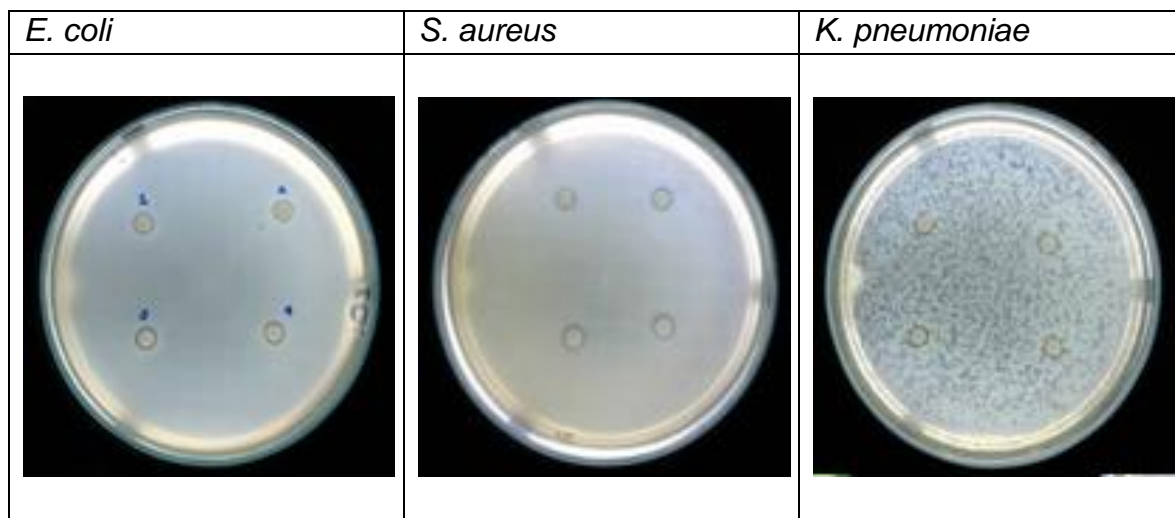
5.3.2. Volumen 15 μ L

En la tabla 10 se reporta el promedio de los halos de inhibición y porcentaje de inhibición con un volumen de 15 μ L del aceite esencial de M1R frente a las tres cepas estudiadas. En la figura 15 se observan los halos de inhibición del material vegetal frente a las 3 cepas.

Tabla 10. Diámetros de halos de inhibición (mm) y porcentaje de inhibición de M1R (15 μ L).

M1R	D1	D2	D3	D4	PROMEDIO	% INHIBICIÓN
<i>E. coli</i>	9,24	9,54	9,52	8,90	9,31	60,59
<i>K. pneumoniae</i>	9,18	10,16	7,79	10,14	9,31	68,49
<i>S. aureus</i>	9,05	9,25	8,71	8,97	8,99	58,01

Figura 15. Halos de inhibición M1R (15 μ L).

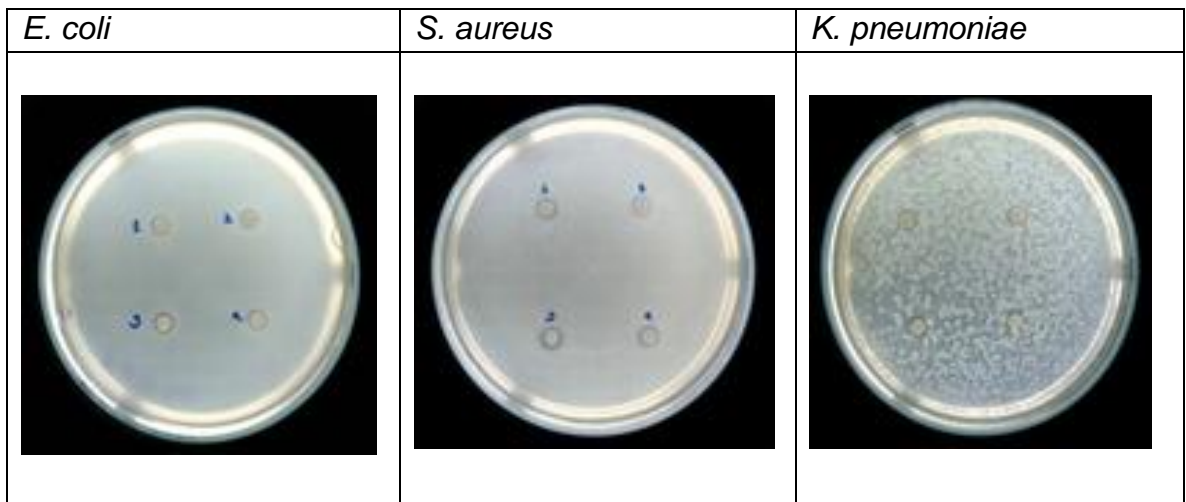


En la tabla 11 se reporta el promedio de los halos de inhibición y porcentaje de inhibición con un volumen de 15 μ L del aceite esencial de M2R frente a las tres cepas estudiadas. En la figura 16 se observan los halos de inhibición del material vegetal frente a las 3 cepas.

Tabla 11. Diámetros de halos de inhibición (mm) y porcentaje de inhibición de M2R (15 μ L).

M2R	D1	D2	D3	D4	PROMEDIO	% INHIBICIÓN
<i>E. coli</i>	9,07	10,5	9,25	9,61	9,60	62,59
<i>K. pneumoniae</i>	8,26	9,54	9,08	8,28	8,79	64,61
<i>S. aureus</i>	8,91	8,70	9,38	9,55	9,13	58,92

Figura 16. Halos de inhibición de M2R (15 μ L).

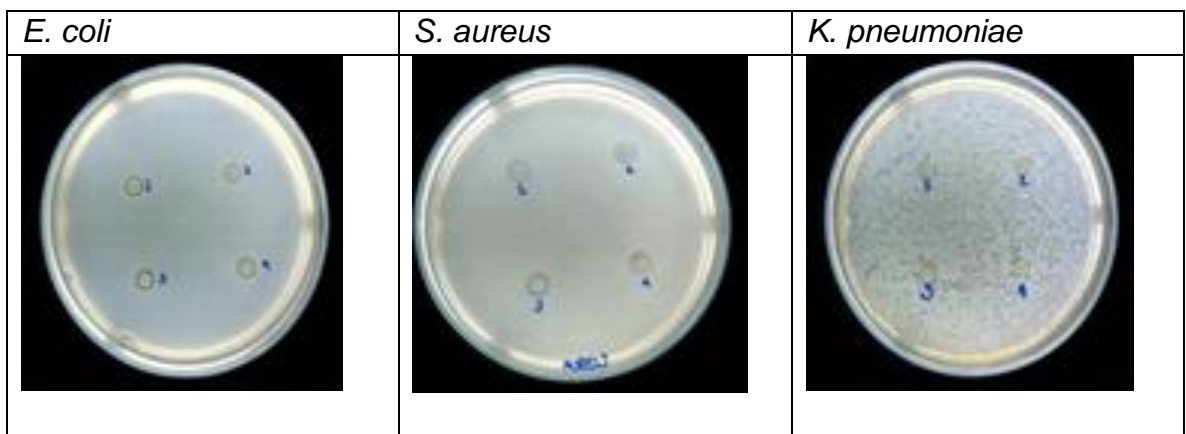


En la tabla 12 se reporta el promedio de los halos de inhibición y porcentaje de inhibición con un volumen de 15 μ L del aceite esencial de M3R frente a las tres cepas estudiadas. En la figura 17 se observan los halos de inhibición del material vegetal frente a las 3 cepas.

Tabla 12. Diámetros de halos de inhibición (mm) y porcentaje de inhibición de M3R (15 μ L).

M3R	D1	D2	D3	D4	PROMEDIO	% INHIBICIÓN
<i>E. coli</i>	9,70	10,09	9,75	9,44	9,74	63,49
<i>K. pneumoniae</i>	9,31	10,48	7,76	6,30	8,46	62,20
<i>S. aureus</i>	10,37	10,05	9,25	9,61	9,82	63,33

Figura 17. Halos de inhibición de M3R (15 μ L).



6. ANALISIS DE RESULTADOS

6.1 CROMATOGRAFÍA DE GASES

En cuanto a los terpenos identificados con mayor porcentaje de coincidencia en los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis*, tomamos el área de abundancia relativa evidenciando un porcentaje mayor para eucaliptol, 1R- α Pineno, bornanone, camfeno, α -pineno, acetato de borneol como se registra en la tabla 13.

Tabla 13. Porcentaje de área de terpenos de cada material vegetal de romero.

COMPUESTO	% AREA		
	M1R	M2R	M3R
Eucaliptol	23,06	24,90	27,05
1R- α Pineno	14,79	16,37	21,82
Alcanfor	14,38	16,25	3,42
Camfeno	9,85	10,05	5,72
α -Pineno	7,80	5,44	6,14
Acetato borneol	6,36	1,62	3,03
D-Limoneno	3,31	4,03	3,31
α felandreno	3,13	3,40	0,31
Endo-borneol	2,42	2,15	1,67
c-Terpineno	2,29	2,01	1,70
l-Verbenona	2,13	1,77	9,35
Cariofileno	1,70	1,48	0,55
Terpinen 4 ol	1,49	1,50	1,59
α - Linalol	0,27	0,36	3,21
Terpineol, cis- α	0,21	0,13	0,16

El análisis comparativo de los componentes reportados en los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* permitió identificar mayor porcentaje de área de alcanfor en M1R (14,38%) y M2R (16,25%) en comparación a M3R (3,42%); de igual manera se evidencio con camfeno en M1R (9,85%) y M2R (10,05%) en comparación a M3R (5,72%).

En contraposición se observó un mayor porcentaje de área en M3R de 1R- α pineno (21,82%) respecto a M1R (14,79%) y M2R (16,37%); así mismo con l- verbenon en M3R (9,35%) en comparación a M1R (2,13%) y M2R (1,77%).

6.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

En la siguiente tabla se muestra la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales a un volumen de 5 μ L; se documentó un mayor porcentaje de inhibición frente a *Klebsiella pneumoniae* en las tres muestras; M1R y M2R no mostraron actividad frente a *Staphylococcus aureus*.

Tabla 14. Actividad antimicrobiana a 5 μ L

ESPECIE	M1R	M2R	M3R
<i>Escherichia coli</i>	52,9%	55,6%	54,6%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	61,3%	59,0%	68,4%
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,0%	0,0%	52,1%

Con un volumen de 15 μ L en todas las muestras se observó actividad antimicrobiana significativa y similar con porcentajes de inhibición superiores al 50%, frente a las cepas de estudio tal como se relaciona a continuación.

Tabla 15. Actividad antimicrobiana a 15 μ L

ESPECIE	M1R	M2R	M3R
<i>Escherichia coli</i>	60,6%	62,6%	63,5%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	68,5%	64,6%	62,2%
<i>Staphylococcus aureus</i>	58,0%	58,9%	63,3%

7. CRONOGRAMA

CRONOGRAMA	Mes							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Planteamiento de pregunta de investigación	■							
Elaboración de objetivos del trabajo	■							
Elaboración de marco teórico		■	■					
Elaboración de metodología				■				
Realización de pruebas y ensayo de laboratorio					■	■		
Análisis y discusión de los resultados obtenidos							■	
Elaboración de conclusiones								■
Elaboración de tablas, gráficas y cuadro de resultados								■

8. DISCUSIÓN

Las diferencias encontradas en la composición química de los aceites esenciales pueden estar relacionadas con el hecho de que a pesar de que es la misma especie estudiada las condiciones ambientales en las 3 muestras (temperatura, suelo, humedad relativa, época de recolección, etc.) son diferentes.

En nuestro estudio se reporta que la actividad antimicrobiana observada, basados en la actividad de *Rosmarinus officinalis* sobre cepas Gram positivas y gram negativas, puede ser debida a la presencia de monoterpenos, tales como eucaliptol, 1R α pineno, alcanfor y camfeno, los cuales se observaron en una concentración mayoritaria.

Resultados similares también se han reportado en la literatura por Rondon *et al* y Cobellis *et tal*, demostrando en el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* que su actividad antimicrobiana se basa en compuestos bioactivos básicamente monoterpenos (33,34).

Adicionalmente, dicha actividad también se atribuye a sus distintos componentes fenólicos como el ácido carnósico, carnasol y ácido rosmarínico y a los principales agentes activos contenidos en el aceite esencial como son: pineno, canfeno, eucaliptol, limoneno, alcanfor, linalol, D-linalol, borneol y su acetato, terpeno y cariofileno (35), tal y como se comprobó en nuestro estudio; de igual forma Rau *et al.*, 2006 (36), reportaron la actividad antimicrobiana y citotoxicidad del α -pineno, eucaliptol, camfeno, β -mirceno, alcanfor y borneol, contenidos en el aceite de romero.

Dehkordi *et al.*, 2009 (37), estudiaron e identificaron al α - pineno en una proporción de 14.06 %, alcanfor y eucaliptol 13.62%; verbenona 11.2%; borneol 7.3%; 3-octanona 7.02%; camfeno 5.46% y linalol 5.07% en el aceite esencial y concluyeron que la acción inhibitoria del romero es eficaz. Por último, Mekonnen A. *et al.*, 2016 (38), identificaron los monoterpenos bicíclicos principales del aceite de romero, α -pineno y β -pineno mostraron una actividad biológica considerable. También Weerakkody N. *et al.*, 2011 (39), registraron como principales componentes químicos del extracto de romero a eucaliptol (26,3%) y alcanfor (20,3%); resultados similares a los reportados por nosotros, siendo para eucaliptol 23.06, 24.9 y 27.05% para las muestras M1R, M2R y M3R respectivamente.

Los porcentajes de inhibición observados en cada una de las muestras de romero, mostraron variabilidad en la actividad antimicrobiana según el volumen de los aceites esenciales sobre cada una de las cepas ensayadas.

A un volumen de 5 μ L de aceite esencial de M1R y M2R no mostraron actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* pero al aumentar el volumen a 15 μ L se evidencia un porcentaje de inhibición superior al 50%, así mismo aumentó la actividad frente *E. coli* y *K pneumoniae*; comportamiento similar reportado por Volcão L. *et al.*, 2011 (40), quienes evaluaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* sobre *Escherichia coli* O157:H7 *Enterococcus faecalis* y *Enterobacter aerogenes*. El aceite esencial mostró mayor actividad antimicrobiana en *Enterococcus faecalis* Gram-positivo y *Enterobacter aerogenes* bacilo Gram - negativo. También mostraron inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7 a mayor concentración del aceite esencial, tal como lo reportamos en nuestro estudio.

Algunos estudios han demostrado que el romero disminuye el crecimiento de algunas bacterias tales como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium sp*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella spp*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Mycobacterium intracellulerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona auruginosa* (35). Nuestros resultados son consistentes con los reportado por Hussain A. *et al.* (4), Kamal A. *et al.* (24), Fu Y. *et al* (41) y Abdel R *et al.* (42), en donde se documentó actividad antimicrobiana para las cepas estudiadas.

La actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* utilizando el método de difusión del disco (Kirby Bauer), obtuvo efecto frente a una bacteria Gram positiva; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y una bacteria Gram negativa, *Escherichia coli* ATTC 11225 (33).

9. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio corroboran la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales obtenidos de la hojas de *Rosmarinus officinalis* frente a las cepas estudiadas, sin documentarse variabilidad entre las tres muestras analizadas; esto debido al contenido de compuestos principalmente monoterpenos que cumplen esta actividad biológica.

Se identificó que a mayor volumen de aceite esencial sobre las cepas utilizadas aumenta la actividad antimicrobiana.

La actividad antimicrobiana se puede explicar por la presencia de metabolitos secundarios como eucaliptol, 1R α pineno, alcanfor, camfeno entre otros.

Existe diferencia en los porcentajes reportados de compuestos encontrados en M1R y M2R (israelí) respecto a M3R (crespo), que podría corresponder a la variedad de especie; esto se podría relacionar con las diferencias encontradas en la actividad antimicrobiana, teniendo en cuenta que a bajo volumen de aceite esencial en la muestra israelí no mostro inhibición frente a *S. aureus*.

Podemos considerar el uso de romero como terapia complementaria para manejo de patologías infecciosas causadas por *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, teniendo en cuenta la efectividad que mostro actividad antimicrobiana en nuestro estudio.

Se identificó actividad antimicrobiana frente a *Klebsiella pneumoniae*, la cual ha sido poco documentada en la literatura consultada.

10. RECOMENDACIONES

Consideramos tener en cuenta en próximos estudios el análisis detallado de factores externos como las condiciones del suelo y cultivos, los cuales pueden influir en las diferencias encontradas en cada muestra vegetal a pesar de ser la misma especie.

Este estudio abre la posibilidad a futuras investigaciones para ampliar indicaciones terapéuticas del romero frente a diferentes patologías de origen infeccioso, así como para evaluar la dosis respuesta de este material vegetal a diferentes volúmenes y concentraciones en su efecto antimicrobiano.

11. BIBLIOGRAFIA

1. Avila-sosa R, Navarro-cruz AR, Vera-lópez O, Dávila-márquez RM, Melgozapalma N, Meza-pluma R. Romero (*Rosmarinus officinalis*): Una revisión de sus usos no culinarios. Benemérita Univ Autónoma Puebla. 2011;52(222):23–36.
2. Begum A, Sandhya S, Ali SS, Vinod KR, Reddy S, Banji D. An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). Acta Sci Pol Technol Aliment. 2013;12(1):61–73.
3. Luqman S, Dwivedi GR, Darokar MP, Kalra A, Khanuja SPS. Potential of Rosemary Oil To Be Used in Drug-Resistant Infections. Altern Ther Health Med [Internet]. 2007;13(5):54–9. Available from: <http://search.proquest.com/docview/204835060?accountid=34489%0Ahttp://atoz.ebsco.com/titles.asp?lang=&lang.subject=&lang.menu=&KW=&sid=258657917&id=1811&SF=Titles&ST=Contains&cmdSearchSubmit=BuscarAlternative+Therapies+in+Health+and+Medicine/>
4. Hussain AI, Anwar F, Chatha SAS, Jabbar A, Mahboob S, Nigam PS. *Rosmarinus officinalis* essential oil: Antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. Brazilian J Microbiol. 2010;41(4):1070–8.
5. Jordán MJ, Lax V, Rota MC, Lorán S, Sotomayor JA. Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *rosmarinus officinalis* L. Food Control [Internet]. 2013;30(2):463–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.07.029>
6. Celiktas OY, Kocabas EEH, Bedir E, Sukan FV, Ozek T, Baser KHC. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. Food Chem. 2007;100(2):553–9.
7. Al-Sereiti MR, Abu-Amer KM, Sen P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. Indian J Exp Biol. 1999;37(2):124–30.
8. MONTES M, VALENZUELA L, BELLO F. Esencias de algunas Labiadas aclimatadas en la Región del Bío-Bío, Chile. *Rosmarinus officinalis* L., *Mentha pulegium* L., *Mentha Spicata*. constituyentes y propiedades antimicrobianas. An Real Acad Farm [Internet]. 1991;57:425–38. Available from: <http://www.fcfar.unesp.br/arquivos/link/20141015103501618879.pdf>
9. Ojeda-Sana AM, van Baren CM, Elechosa MA, Juárez MA, Moreno S. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils

- and their main components. *Food Control*. 2013;31(1):189–95.
10. Torres EL, Vigil AL-M, Morales MES. Extracción, composición y caracterización de los aceites esenciales de hoja y semilla de cilantro (*Coriandrum sativum*). *Temas Sel Ing en Aliment*. 2013;7(1):97–103.
 11. Contreras Puentes E, Ruiz Pérez JD. Estudio comparativo de dos métodos de extracción para el aceite esencial presente en la cáscara de Pomelo (*Citrus maxima*). Universidad de Cartagena; 2012.
 12. Martínez A. Aceites esenciales. Pharmaceutical Chemistry Faculty [Internet]. 2003;1–34. Available from: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf>
 13. Cerpa MG. Hidrodestilación de aceites esenciales: Modelado y caracterización [Internet]. Universidad de Valladolid.; 2007. Available from: <http://www.anipam.es/downloads/43/hidrodestilacion-de-aceites-esenciales.pdf>
 14. Peredo-Luna H, Palou-García E, López-Malo A. Aceites esenciales: métodos de extracción. Vol. 3, *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 2009. p. 8.
 15. Olgún LP, Magadán H, Rodríguez M. Métodos en biotecnología. Instituto de biotecnología. 2004;3–45.
 16. Gutiérrez MC, Droguet M. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Bol Intexter del Inst Investig Text y Coop Ind*. 2002;(122):35–41.
 17. Vega-Portocarrero E y, López-Malo A. Agentes antimicrobianos presentes en especias y hierbas. *Temas Sel Ing Aliment*. 2009;1:85–95.
 18. Davidson PM, Branen AL, John N. Sofos a. LBPMD. Food antimicrobials-an introduction. Third Edit. Vol. 145, *Food Science and Technology*-New York-Marcel Dekker-. Taylor & Francis Group.; 2005. 721 p.
 19. López-malo A, Palou E, Reyes-Jurado F. Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana Y De Determinación De Los Componentes Químicos De Los Aceites Esenciales. 2014;l:68–78.
 20. Cardoso GHS, Dantas EBS, Sousa FRC, Peron AP. Cytotoxicity of aqueous extracts of *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae) in plant test system. *Brazilian J Biol* [Internet]. 2014;74(4):886–9. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cmedm&AN=25627599&site=eds-live>
 21. Nacional U, San MDE, Odontología EAPDE. Actividad antimicrobiana in vitro

- del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con bolsa periodontal Isabel de María San Román Suárez. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.; 2013.
22. Zekaria D. Los aceites esenciales, una alternativa a los antimicrobianos. Lab Calier. 2007;1–6.
 23. Bernal Rozo AM. EVALUACIÓN DEL ENRAIZAMIENTO DE ESQUEJES DE DOS CULTIVARES DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis* L.) CRESPO E ISRAELÍ [Internet]. Universidad Militar Nueva Granada.; 2014. Available from: http://repository.unimilitar.edu.co/bitstream/10654/11639/2/TESIS_FINAL_FINAL.pdf
 24. Genena AK, Hense H, Smania Junior A, Souza SM De. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) – a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *Cienc e Tecnol Aliment.* 2008;28(2):463–9.
 25. Rodríguez-Angeles MG. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publica Mex.* 2002;44(5):464–75.
 26. Rios M, Prado V, Trucksis M, Arellano C, Borie C, Alexandre M, et al. Clonal diversity of Chilean isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. *J Clin Microbiol.* 1999;37(3):778–81.
 27. Lowy F. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* [Internet]. 2003;111(9):1265–73. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=154455&tool=pmc_entrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://www.jci.org/cgi/content/abstract/111/9/1265
 28. Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* [Internet]. 2014;61(1):28–40. Available from: www.medigraphic.com/patologiaclinica%5Cnwww.medigraphic.org.mx
 29. Puerta-García EA, Mateos-Rodríguez F. Enterobacterias. *Medicine (Baltimore)*. 2010;10(51):3426–31.
 30. IZQUIERDO-LÁZARO L. Biosíntesis del lipopolisacárido de *Klebsiella Pneumoniae*. Univesitat de Barcelona. Universitat de Barcelona.; 2003.
 31. Microbiology F, Liu C, Pla C, Hospital G, Chen Z, Pla C, et al. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae* Molecular pathogenesis of *Klebsiella*

- pneumoniae. *Futur Microbiol.* 2014;9(9):1071–81.
32. Corzo Barragán DC. Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico. *Rev Mex Ciencias Farm.* 2012;43(3):81–6.
 33. Rondon Perez RG. Evaluación antimicrobiana in vitro del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “ romero ” frente a bacterias patógenas Grampositivas y Gramnegativas. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.
 34. Cobellis G, Yu Z, Forte C, Acuti G, Trabalza-Marinucci M. Dietary supplementation of *Rosmarinus officinalis* L. leaves in sheep affects the abundance of rumen methanogens and other microbial populations. *J Anim Sci Biotechnol* [Internet]. 2016;7(1):27. Available from: <http://jasbsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40104-016-0086-8>
 35. Estrada S. Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Thymus vulgaris*). Tesis de Grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2010.
 36. Rau O, Wurglics M, Paulke A, Zitzkowski J, Meindl N, Bock A, et al. Carnosic acid and carnosol, phenolic diterpene compounds of the labiate herbs rosemary and sage, are activators of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Planta Med.* 2006;72(10):881–7.
 37. Dehkordi S, Tajk H, Moradi M, Dehkordi J. Chemical Composition and antibacterial Effects of *Rosmarinus Officinalis* L Essential Oil with Lysozyme on *Listeria monocytogenes*. *Armaghane danesh.* 2009;14(3):1–11.
 38. Mekonnen A, Yitayew B, Tesema A, Taddese S. In Vitro Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis*. *Int J Microbiol.* 2016;2016:8.
 39. Weerakkody NS, Caffin N, Lambert LK, Turner MS, Dykes GA. Synergistic antimicrobial activity of galangal (*Alpinia galanga*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and lemon iron bark (*Eucalyptus staigerana*) extracts. *J Sci Food Agric.* 2011;91(3):461–8.
 40. Volcão LM, Marques JL RG. Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. en patógenos alimentarios. XX Congreso de iniciación científica, II Muestra Científica UFPEL 2011. 2011;
 41. Fu Y, Zu Y, Chen L, Shi X, Wang Z, Sun S, et al. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phyther Res.* 2007;21(10):989–94.

42. Roula Abdel-Massih, Abdou E, Baydoun E, Daoud Z. Antibacterial activity of the extracts obtained from *rosmarinus officinalis*, *origanum majorana*, and *trigonella foenum-graecum* on highly drug-resistant gram negative bacilli. *J Bot Hindawi Publ Corp.* 2010;2010:1–8.

ANEXOS

Anexo A. Ubicación satelital GPS de material vegetal

M1R



Tomado Google Earth, 2013.

M2R



Tomado Google Earth, 2013.

M3R



Tomado Google Earth, 2013.

Anexo B. Identificación por el herbario según protocolo del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE CIENCIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES
HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)

COL - 408
Bogotá D.C., 12 de octubre de 2016

Señores
Erika Ruiz Malaver
Ciudad

Asunto: **Identificación Taxonómica muestras**

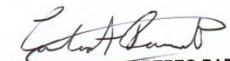
Cordial Saludo,

Me permito dar respuesta a su solicitud referente a la identificación taxonómica de la(s) muestra(s) botánica(s):

Nombre	FAMILIA	No. COL	Colector	No de Colecta	Determinó
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	LAMIACEAE	592068	Cristian López	01A	C. Parra-O./2016
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	LAMIACEAE	592070	Erika Ruiz & Andrea Agudelo	02B	C. Parra-O./2016
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	LAMIACEAE	592069	Erika Ruiz & Andrea Agudelo	01B	C. Parra-O./2016

Esta certificación no es válida para trámites ante el INVIMA o el ICA. El (Los) pliego(s) testigo(s) quedará(n) como muestra permanente en nuestro herbario.

Cordialmente,


Prof. CARLOS ALBERTO PARRA
Administrador General
Herbario Nacional Colombiano -COL
E-mail: herbacol_fcbog@unal.edu.co

Copia: Archivo COL
Floreto Fabio

Carrera 30 No. 45-03, INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES,
"HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)" Edificio 425- 2° piso, Oficina 222
Conmutador: (57-1) 316 5000 Ext.11538 – 11518 Fax: 11538
Correo electrónico: herbacol_fcbog@unal.edu.co
Bogotá, Colombia, Sur América

Anexo C. Compuestos identificados en CMG-EM

M1R	M2R	M3R
Metabolitos secundarios	Metabolitos secundarios	Metabolitos secundarios
Cyclobutene, 2-propenylidene	Cyclobutene, 2-propenylidene	Cyclobutene, 2-propenylidene
3-Thujene	Tricyclene	3-Thujene
1R- α -Pinene	1R- α -Pinene	1R- α -Pinene
Camphene	Camphene	Camphene
4(10)-Thujene	4(10)-Thujene	4(10)-Thujene
2(10)-Pinene	α -Pinene	2(10)-Pinene
2,3-Dehydro-1,8-cineole	α -Phellandrene	α -Phellandrene
α -Phellandrene	3-Carene	α -Terpinene
3-Carene	p-Mentha-1,4(8)-diene	p-Cymene
α -Terpinen	o-Cymene	D-Limonene
p-Cymene	D-Limonene	ζ -Terpinene
D-Limonene	Eucalyptol	Terpineol, cis- α
Eucalyptol	ζ -Terpinene	p-Mentha-1,4(8)-diene
ζ -Terpinene	Terpineol, cis- α -	α -Linalool
Terpineol, cis- α	p-Mentha-1,4(8)-diene	α -Campholenal
p-Mentha-1,4(8)-diene	p-Cymenene	cis-Verbenol
α -Linalool	α -Linalool	(+)-2-Bornanone
2-Cyclohexen-1-ol, 1-methylethyl-, trans	Terpineol, cis- α -	endo-Borneol
2-Cyclohexen-1-ol, 1-methylethyl cis-	2-Cyclohexen-1-ol, methylethy, trans	3-Pinanone, cis
(+)-2-Bornanone	2-Cyclohexen-1-ol, methylethy cis	p-Menth-1-en-4-ol
endo-Borneol	(+)-2-Bornanone	α -Terpineol
Terpinen-4-ol	endo-Borneol	l-Verbenone
α -Terpineol	α -Terpineol	Borneol, acetate
l-Verbenone	l-Verbenone	Geranyl acetate
Borneol, acetate	Bornyl acetate	Methyleugenol
Eugenol	Eugenol	Caryophyllene
Methyleugenol	Methyleugenol	Humulene
Caryophyllene	Caryophyllene	Caryophyllene oxide
Humulene	Humulene	
Caryophyllene oxide	Caryophyllene oxide	