

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**  
**SEDE CUENCA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA  
DE LOS RECURSOS NATURALES**

*Trabajo de titulación previo a la obtención  
del título de Ingeniera en Biotecnología  
de los Recursos Naturales*

**TRABAJO EXPERIMENTAL:**

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS  
ALCOHÓLICO Y ACUOSO DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis*),  
FRENTE A UN COMPUESTO SINTÉTICO**

**AUTORA:**

PAULA ESTEFANÍA MEJÍA CALLE

**TUTORA:**

BQF. SILVIA TORRES SEGARRA, MGS.

CUENCA - ECUADOR

2019

## CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Paula Estefanía Mejía Calle con documento identificación N° 0150342517, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana, la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación: **EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ALCOHÓLICO Y ACUOSO DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis*), FRENTE A UN COMPUESTO SINTÉTICO**, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en condición de autora me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, octubre de 2019



Paula Estefanía Mejía Calle

C.I. 0150342517

## CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ALCOHÓLICO Y ACUOSO DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis*), FRENTE A UN COMPUESTO SINTÉTICO**, realizado por Paula Estefanía Mejía Calle, obteniendo el *Trabajo Experimental* que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, octubre de 2019



Bqf. Silvia Torres Segarra, Mgs.

C.I. 0103597225

## **DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD**

Yo, Paula Estefanía Mejía Calle con documento de identificación N° 0150342517, autora del trabajo de titulación: **EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ALCOHÓLICO Y ACUOSO DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis*), FRENTE A UN COMPUESTO SINTÉTICO**, certifico que el contenido del *Trabajo Experimental* es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, octubre de 2019



Paula Estefanía Mejía Calle

C.I. 0150342517

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo de investigación va dedicado a Dios, por guiarme con su luz, amor y bondad en mi vida, además brindarme cada día la sabiduría para poder resolver cualquier dificultad que se me ha presentado y de igual manera poder realizarlo en el futuro.

A mis padres José y María Eulalia, quienes han sido mi fortaleza para jamás darme por vencida, me han apoyado incondicionalmente en mis estudios con sus consejos, motivación y perseverancia para alcanzar mis objetivos.

A mi hija Keyla quien ha sido mi mayor inspiración para jamás abandonar mis estudios, poder ser un ejemplo para ella y así guiarla cada día con todo mi amor y ternura.

A mi esposo Jefferson quien siempre me ha apoyado, brindándome su amor infinito apoyándome en momentos difíciles y enseñándome que una sonrisa siempre será la solución para las adversidades de la vida.

A mi hermana María José quien ha sido un gran ejemplo a seguir, siempre me ha brindado sus consejos en momentos difíciles los cuales me han ayudado a crecer de manera profesional y personal, además por el cariño incondicional que siempre me ha brindado.

## AGRADECIMIENTOS

Primero agradezco a Dios por guiarme en el camino, por siempre acompañarme, ayudarme a levantar y aprender de mis errores y seguir adelante. Por jamás dejarme sola y enviarme una luz para resolver los problemas que he afrontado durante estos años de carrera y así poder alcanzar una de las primeras metas de mi vida

A mis padres por todos los sacrificios que han realizado para no permitir que abandone mis estudios y por ser una gran motivación en mi vida, enseñarme que las cosas que valen la pena no se obtienen de manera fácil, pero que al final viene la recompensa.

A mi tutora Bqf. Silvia Torres S, quien ha aportado con sus enseñanzas al presente trabajo de investigación, además por la paciencia que me ha tenido y más que una docente ha sido una amiga que siempre me ha aconsejado para poder superar las adversidades de la vida.

A mis profesores quienes me han guiado toda la carrera con sus conocimientos y así poder ser un gran profesional, por la paciencia que han tenido para explicarme cada una de sus materias.

A mis amigas Liz y Nico, con quienes desde primer ciclo compartí alegrías, tristezas haciendo la mejor experiencia de la universidad y así aprendiendo de los errores que cometíamos. Gracias por siempre estar a mi lado.

## ÍNDICE

<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>5</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>6</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>10</b>
<b>ÍNDICE DE GRÁFICAS .....</b>	<b>11</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>12</b>
<b>ÍNDICE DE ANEXOS.....</b>	<b>13</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>14</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Introducción .....</b>	<b>16</b>
<b>1.2 Planteamiento del problema .....</b>	<b>17</b>
<b>1.3 Formulación de la pregunta de investigación.....</b>	<b>17</b>
<b>1.4 Justificación .....</b>	<b>17</b>
<b>1.5 Limitación del problema .....</b>	<b>18</b>
<b>1.6 Objetivos .....</b>	<b>19</b>
<b>1.6.1 Objetivo General .....</b>	<b>19</b>

1.6.2	Objetivos Específicos .....	19
1.7	Hipótesis.....	19
<b>CAPÍTULO II .....</b>		<b>21</b>
2.1	Estado del Arte.....	21
2.2	Marco Conceptual.....	22
2.3	Bases Teóricas .....	24
2.3.1	Metabolismo vegetal .....	24
2.3.1.1	Metabolitos primarios .....	25
2.3.1.2	Metabolitos secundarios.....	25
2.3.2	Descripción y hábitat del romero .....	25
2.3.3	Taxonomía del romero .....	26
2.3.4	Metabolitos del romero .....	27
2.3.5	Características Botánicas .....	29
2.3.6	Características Químicas .....	30
2.3.7	Usos Medicinales .....	31
2.3.8	Métodos de separación y purificación de principios activos.....	31
2.3.8.1	Maceración .....	32



2.3.9 <i>Screening</i> fitoquímico .....	32
2.3.10 Capacidad antioxidante.....	34
<b>MARCO METODOLÓGICO .....</b>	<b>38</b>
3.1 Nivel de investigación .....	38
3.2 Procesos .....	40
3.2.2 Marcha o <i>Screening</i> Fitoquímico .....	43
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>49</b>
4.1 Fase 1. Obtención de la materia vegetal .....	49
4.2 Fase 2. Caracterización cualitativa de la muestra .....	50
4.3 Fase 3. Determinación de la capacidad antioxidante .....	52
4.3.3 Determinación de la capacidad antioxidante del extracto acuoso de romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.) .....	56
4.3.4 Determinación de la capacidad antioxidante del extracto etanólico de romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.) .....	58
4.3.4 Comparación de los valores del IC <sub>50</sub> del ácido ascórbico puro, ácido ascórbico en pastilla y extractos -acuoso y etanólico- del romero. ....	60
4.4.1 Comparación de la capacidad antioxidante del extracto acuoso frente al compuesto sintético. ....	61

<b>CAPITULO V .....</b>	<b>66</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>79</b>

### ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1 Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i> L).....</b>	<b>26</b>
<b>Fig. 2 Selección de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. como materia prima.....</b>	<b>41</b>
<b>Fig. 3 Extracto etanólico en el rotavapor.....</b>	<b>42</b>
<b>Fig. 4 Prueba de saponinas en extracto etanólico y acuoso.....</b>	<b>43</b>
<b>Fig. 5 Prueba de taninos en extracto etanólico y acuoso. ....</b>	<b>44</b>
<b>Fig. 6 Prueba de flavonoides en extracto etanólico y acuoso .....</b>	<b>45</b>
<b>Fig. 7 Prueba de fenoles en extracto etanólico y acuoso.....</b>	<b>46</b>
<b>Fig. 8 Prueba estadística del ANOVA.....</b>	<b>63</b>
<b>Fig. 9 Pesaje de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i> L). ....</b>	<b>80</b>
<b>Fig. 10 Extractos de Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i> L).....</b>	<b>80</b>
<b>Fig. 11 Extracto etanólico en rotavapor .....</b>	<b>81</b>
<b>Fig. 12 Extracto etanólico de Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i> L).....</b>	<b>81</b>

<b>Fig. 13 Extracto acuoso de Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i> L).....</b>	<b>82</b>
<b>Fig. 14 Dilución de ácido ascórbico. ....</b>	<b>83</b>
<b>Fig. 15 Dilución del extracto acuoso.....</b>	<b>83</b>
<b>Fig. 16 Celdas con muestras para método DPPH. ....</b>	<b>84</b>
<b>Fig. 17 Espectrofotómetro UV. ....</b>	<b>84</b>

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfico 1. Ciclo para disminuir el estrés oxidativo. ....</b>	<b>36</b>
<b>Gráfico 2. Porcentaje de inhibición de DPPH de ácido ascórbico puro.. ....</b>	<b>54</b>
<b>Gráfico 3. Porcentaje de inhibición de DPPH de la pastilla de ácido ascórbico.....</b>	<b>56</b>
<b>Gráfico 4. Porcentaje de inhibición de DPPH del extracto acuoso de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....</b>	<b>57</b>
<b>Gráfico 5. Porcentaje de inhibición de DPPH del extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....</b>	<b>59</b>
<b>Gráfico 6. Valores del IC50 del ensayo de DPPH de extractos, ácido ascórbico puro y ácido ascórbico en pastilla. ....</b>	<b>60</b>
<b>Gráfico 7. Histograma de la capacidad antioxidante de los extractos de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i> L), frente al ácido ascórbico .....</b>	<b>65</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1. Taxonomía de la planta <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ....</b>	<b>27</b>
<b>Tabla 2. Características de las especies del género <i>Rosmarinus</i>. ....</b>	<b>30</b>
<b>Tabla 3. Tipos de antioxidantes.....</b>	<b>35</b>
<b>Tabla 4. Preparación de fracciones para lectura del antirradical DPPH. ....</b>	<b>47</b>
<b>Tabla 5. Datos de la obtención del extracto etanólico total. ....</b>	<b>49</b>
<b>Tabla 6. Datos de la obtención del extracto acuoso total. ....</b>	<b>50</b>
<b>Tabla 7. Resultados de la marcha fitoquímica de cada extracto.....</b>	<b>50</b>
<b>Tabla 8. Resultados de porcentaje de captación de radicales libres del patrón de estudio ácido ascórbico puro. ....</b>	<b>53</b>
<b>Tabla 9. Resultados de porcentaje de captación de radicales libres del ácido ascórbico en pastilla. ....</b>	<b>55</b>
<b>Tabla 10. Resultados de porcentaje de captación de radicales libres del extracto acuoso de la planta.....</b>	<b>56</b>
<b>Tabla 11. Resultados de porcentaje de captación de radicales libres del extracto etanólico de la planta.....</b>	<b>58</b>
<b>Tabla 12. Prueba de Shapiro-Wilks.....</b>	<b>62</b>
<b>Tabla 13. Prueba de Dunnett comparando con ácido ascórbico puro.....</b>	<b>64</b>

**Tabla 14. Prueba de Dunnett comparando con la pastilla de ácido ascórbico . .... 64**

## Resumen

En el presente trabajo de investigación se tiene como finalidad comparar la capacidad antioxidante de los extractos alcohólico y acuoso de romero (*Rosmarinus Officinalis* L), frente a un compuesto sintético, para esto se determinó su porcentaje de inhibición de radicales libres. Se realizó ésta indagación, ya que Ecuador posee una variedad de climas debido a su ubicación geográfica y por ésta razón cualquier planta se puede desarrollar en sus tierras, y la mayoría de las mismas poseen una gran importancia antioxidante, que ayudan a prevenir el envejecimiento tanto en productos cosméticos, alimenticios y medicamentos, lo cual es muy importante para las empresas que se dedican a fabricar estos productos. La investigación comenzó con la elaboración de extractos acuoso y etanólico -96%- del romero en una relación 7:1, seguido de la extracción de principios activos a partir de los mismos, a continuación se procedió a realizar el *screening* fitoquímico determinando de manera cualitativa la presencia de principales grupos químicos. Posteriormente se realiza la metodología de DPPH, en la cual se emplearon las siguientes concentraciones de 1uL, 5 uL, 10 uL, 20 uL, 50 uL, 80 uL y 100 uL, obteniendo como resultado el valor del IC<sub>50</sub> para el extracto acuoso 17,13 µg/mL y para el etanólico 42,26 µg/mL, determinando que el extracto acuoso posee mayor capacidad antioxidante. Con respecto al compuesto sintético se obtuvieron los valores del IC<sub>50</sub> para el ácido ascórbico puro 20,79 µg/mL y para la pastilla de ácido ascórbico 113,47µg/mL, luego se determinó el porcentaje de inhibición de cada muestra obteniendo 88,71% para el extracto acuoso, 42,36% para el extracto etanólico, 81,54% para el ácido ascórbico puro y 14,87% para la pastilla de ácido ascórbico. Dichos valores se analizaron de manera estadística por bloques completamente al azar en el cual se acepta la hipótesis alternativa que señala que por lo menos un extracto posee mayor capacidad antioxidante que el compuesto sintético.

**Palabras clave:** DPPH, *Rosmatinus Officinalis*, antioxidante, porcentaje de inhibición, IC<sub>50</sub>.

## **Abstract**

The purpose of this research work is to compare the antioxidant capacity of the alcoholic and aqueous extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L), against a synthetic compound, for this purpose its percentage of free radical inhibition was determined. This inquiry was made because Ecuador has a variety of climates due to its geographical location and for this reason any plant can be developed in its lands, and most of them have a great antioxidant importance, which help prevent aging both in cosmetic products, foodstuffs and medicines, which is very important for companies that manufacture these products. The investigation began with the elaboration of aqueous and ethanol extracts -96% - of the rosemary in a 7: 1 ratio, followed by the extraction of active ingredients from them, then the phytochemical *screening* was carried out determining qualitatively the presence of major chemical groups. Subsequently, the DPPH methodology is performed, in which the following concentrations of 1 uL, 5 uL, 10 uL, 20 uL, 50 uL, 80 uL and 100 uL were used, obtaining as a result the IC50 value for the aqueous extract 17,13 µg / mL and for the 42.26 µg / mL ethanol, determining that the aqueous extract has a higher antioxidant capacity. With respect to the synthetic compound, the IC50 values were obtained for pure ascorbic acid 20.79 µg / mL and for ascorbic acid tablet 113.47 µg / mL, then the percentage of inhibition of each sample was determined obtaining 88.71% for the aqueous extract, 42.36% for the ethanol extract, 81.54% for the pure ascorbic acid and 14.87% for the ascorbic acid tablet. These values were statistically analyzed by completely random blocks in which the alternative hypothesis is accepted that states that at least one extract has a greater antioxidant capacity than the synthetic compound.

**Keywords:** DPPH, *Rosmarinus Officinalis*, antioxidant, percent inhibition, IC50.

# CAPÍTULO I

## 1.1 Introducción

Ecuador es un país que posee un elevado número de especies vegetales como: plantas y flores, debido a la variabilidad climática que posee. El territorio ecuatoriano posee alrededor de 25 mil especies de plantas vasculares. Es por eso que en éste territorio se encuentra el 10% de todas las especies que existen en el planeta. De dicho porcentaje, la mayor cantidad crece en la cordillera de los Andes, en la zona noroccidental, donde se calcula que hay aproximadamente 10 mil especies (Viteri & Nuñez, 2016).

El romero (*Rosmarinus Officinalis* L), es una de las especies que habita en el Ecuador debido a la variedad de climas, dicha planta crece en espacios como laderas o territorios montañosos, dado que es una especie termófila requiere de una temperatura templada o templada- cálida (Muñoz, 2002).

Se ha determinado mediante ensayos *in vitro* que compuestos como el rosmanol, carnosol y ácido carnosólico presentan un efecto antioxidante frente a bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Genena, Hense, Smania, & Machado., 2008).

En recientes investigaciones se ha demostrado que la adición del extracto de romero y aceite de oliva favorece la conservación de la mortadela y el mantenimiento de sus características organolépticas y nutricionales, debido a que permite la estabilidad y



disminuye el porcentaje de grasas, carbohidratos y humedad (Vergara, Cueva, Loor, Pomagualli, & López, 2016).

## **1.2 Planteamiento del problema**

Los antioxidantes son sustancias que en la actualidad son muy utilizados por las industrias enfocadas a la producción de cosméticos, alimentos y medicamentos, debido a que ayudan a mantener características adecuadas de dichos productos además evita el envejecimiento prematuro, sin embargo el consumo en exceso de los mismos puede causar efectos nocivos a la salud.

Actualmente la planta romero (*Rosmarinus officinalis*), es de fácil adquisición, tiene un costo asequible de cinco dólares el kilo, y la misma es cultivada en la mayor parte del Ecuador, pero no es muy utilizada ya que se desconoce sus propiedades. En la presente investigación se determinará la actividad antioxidante que posee la misma, para un futuro uso como materia prima en las industrias.

## **1.3 Formulación de la pregunta de investigación**

¿Cuál de los dos extractos de romero –acuoso y alcohólico- posee mayor capacidad antioxidante frente a un compuesto sintético?

## **1.4 Justificación**

Un antioxidante es un elemento que tiene la capacidad de retardar y prevenir la oxidación de un producto susceptible a la degradación o descomposición, lo cual lo realiza actuando como donador de electrones. En los seres vivos se realiza éste proceso mediante la respiración cuando inhalan el oxígeno para obtener energía y al mismo

tiempo liberan radicales libres, pero si existen niveles bajos de los mismos, o se inhiben las enzimas antioxidantes se produce el estrés oxidativo lo cual daña a la células ocasionándoles la muerte (Alomar, 2010).

El proceso de oxidación genera olores y sabores rancios en los productos, además ocasiona cambios negativos en el color y textura, generando así la pérdida del valor nutritivo, ya que se pierden varios componentes esenciales como: vitaminas y ácidos grasos; al momento de consumir o aplicarse las personas éstos productos pueden observar cambios perjudiciales en su salud. Debido a éstas razones las industrias cada día buscan nuevas sustancias que posean capacidad antioxidante y que no sean tan dañinas como los antioxidantes sintéticos; en la actualidad utilizan envasados al vacío o ámbar para evitar las reacciones químicas indeseables (Flavorix, 2012).

El consumo excesivo de los antioxidantes sintéticos como suplementos de algunos productos resulta tóxico para el sistema inmunológico, piel, pulmones e hígado. Dichas sustancias pueden causar reacciones alérgicas, interferir con las funciones hormonales y generar el crecimiento de tumores (Sociedad Española de Medicina Estética, 2013). Cabe destacar que la mayoría de productos como cremas, medicamentos y alimentos contiene en su composición antioxidantes sintéticos para poder brindarle un tiempo de vida más prolongado al producto (UNESCO, 2014)

## **1.5 Limitación del problema**

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, entre algunas limitaciones las más

relevantes son: tiempo y espacios físicos necesarios ocupados en otras actividades académicas; estos son algunos factores que retrasan la obtención de resultados.

## **1.6 Objetivos**

### **1.6.1 Objetivo General**

Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos alcohólico y acuoso de romero (*Rosmarinus officinalis* L), frente a un compuesto sintético, mediante técnicas de laboratorio, para posible uso en la industria.

### **1.6.2 Objetivos Específicos**

- Caracterizar de manera cualitativa los extractos alcohólico y acuoso de romero (*Rosmarinus officinalis* L), para identificación de metabolitos presentes en el mismo, a través de pruebas físico-químicas.
- Determinar la capacidad antioxidante de los extractos alcohólico y acuoso de romero (*Rosmarinus officinalis* L), y del compuestos sintético, a través de metodología DPPH -2,2-difenil-1-picril hidrazilo-, para posible utilización de extractos como materia prima en la industria.
- Evaluar el nivel de capacidad antioxidante de los extractos alcohólico y acuoso de romero (*Rosmarinus officinalis* L), en relación a una sustancia sintética, a través de análisis estadístico para determinación de los niveles de capacidad.

## **1.7 Hipótesis**

Si los extractos alcohólico y acuoso de la planta de romero (*Rosmarinus officinalis* L) poseen mayor capacidad antioxidante que el compuesto sintético, podrían ser usadas en la industria.

## CAPÍTULO II

### 2.1 Estado del Arte

Erkan et al.,(2008) evaluaron la actividad antioxidante de tres compuestos puros del romero -ácido carnósico, ácido rosmarínico y sesamol-, extracto de romero y aceite esencial de semilla negra, obteniendo como resultado que el extracto de romero presenta mayor actividad antioxidante que los compuestos puros y que el aceite de semilla negra, este resultado es atribuido al alto contenido fenólico del romero.

Lin-Chen et al.,(2006) realizaron un estudio sobre la actividad antioxidante de veinte y tres plantas comestibles sometidas a digestión, una de las plantas analizadas fue el romero. Los resultados obtenidos reflejan que la planta de romero puede ser considerada como una fuente importante de antioxidantes de origen natural.

Zaccarelli., (2006) determinó las propiedades antioxidantes del extracto de romero fueron arduamente estudiadas y su eficacia fue comprobada en la conservación de la vida útil de los alimentos. Dentro de la industria alimenticia, el extracto de romero es una excelente alternativa como antioxidante natural.

Fonnegra, (2007) utilizó diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo*, basados en el extracto metanólico de romero, el cual mostró actividad antioxidante debido principalmente a los diterpenos carnosol y ácido carnosólico.

Mierlici, (2009) realizó una investigación con extractos hidroalcohólicos de la planta de romero, en los mismos determinó la presencia de compuestos como: polifenoles y flavonas, las cuales son sustancias con capacidad antioxidante.

Waggas & Balawi, (2008) mencionan la utilización del romero en experimentos antibacterianos, como antioxidantes, y antiflogísticos. El aceite esencial ha mostrado efectos positivos en la circulación de las extremidades, antirreumáticos y alivio de dolores neurálgicos.

López, (2008) observó la presencia de diterpenos que contiene el romero, los biosintetizan en las plantas, como respuesta al estrés oxidativo, para ejercer un efecto protector de las membranas celulares de los vegetales, por lo que ejercen un potente efecto antioxidante y captador de radicales libres.

Sánchez, (2003) evaluó el extracto procedente de romero fresco, utilizando la metodología de pérdida de absorbancia a 517 nm de una disolución metanólica de DPPH, en la cual se evidenció una alta capacidad antioxidante en el macerado de la planta.

## **2.2 Marco Conceptual**

**Metabolismo primario:** Es un proceso químico que cada organismo vivo debe cumplir para poder vivir y reproducirse, esto se lleva a cabo mediante: la fotosíntesis, así como diversos ciclos indispensables para la vida de la planta como son la glicólisis, síntesis de proteínas, duplicación de material genético y células (Quizhpe, 2016).

**Metabolismo secundario:** Procesos químicos de las plantas, los cuales no son necesarios, ni indispensables para el cumplimiento de funciones vitales de la planta, sin embargo realiza otros roles como: de defensa, mediante la atracción de insectos o secretando sustancias con olores o sabores amargos y fuertes (Quizhpe, 2016).

**Extracto:** Compuestos producidos mediante la obtención de sustancias biológicamente activas que se encuentran en los tejidos de las plantas, y utilizando un solvente, el cual puede ser alcohólico o acuoso (Santamaría, Astorga, & Martín-González, 2015).

**Antioxidante:** Sustancia que se encuentra en pequeñas concentraciones, y evita la oxidación del sustrato. En los últimos años se han clasificado de diferentes maneras siendo las más estudiadas la estructura química y función biológica, quedando divididas en: enzimáticas y no enzimáticas (Hicks, Torres, & Sierra, 2006).

**Propiedades organolépticas:** Descripciones de particulares físicas que tiene un producto, las cuales se perciben mediante los sentidos, por ejemplo su color, textura, sabor y olor, estos criterios son evaluados por personal especializado antes de realizar estudios preliminares como el contenido de distintos nutrientes, de energía, etc (Contreras, Matamoros, & Venegas., 2012).

**Radicales libres:** Entidad química con un electrón desapareado, por lo cual dicha molécula es muy inestable, extraordinariamente reactiva y de vida efímera, consecuencia de la inestabilidad y reactividad de los radicales libres es su enorme capacidad para combinarse inespecíficamente, lo cual da como resultado una molécula disfuncional, lo que puede repercutir en la vida celular (Piña, 2007).

**Ácido ascórbico:** También conocida como vitamina C, es un agente antioxidante muy importante en la formación del material que conforma la célula, además reduce la acción perjudicial de radicales libres. Es una sustancia hidrosoluble y se encuentra principalmente en vegetales y frutas frescas (Bastias & Cepero, 2017).

**Estrés oxidativo:** Es un proceso en el cual se produce la ruptura de biomoléculas que ocasiona la liberación de productos, los cuales son muy reactivos ocasionando cambios estructurales y funcionales, y en casos extremos daño celular y tisular (Hicks, Torres, & Sierra, 2006).

**Principio Activo:** Diversos compuestos que poseen similar estructura química, algunos pueden asumir la función nutritiva o en casos más importantes poseen función medicinal (Santamaría, Astorga, & Martín-González, 2015).

## **2.3 Bases Teóricas**

### **2.3.1 Metabolismo vegetal**

Es un conjunto de procesos físicos-químicos y de reacciones a las que está sujeta una célula; las cuales les permiten realizar sus principales actividades como: reproducción, crecimiento, mantenimiento de sus estructuras y la respuesta a los estímulos que reciben o perciben (Chávez C. , 2014).



### **2.3.1.1 Metabolitos primarios**

Es un conjunto de sustancias químicas que se encuentran íntimamente relacionadas con la supervivencia, desarrollo y reproducción de las plantas como son: fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, translocación, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, diferenciación de tejidos, y en general la formación de carbohidratos, lípidos y proteínas (UMSNH, 2008).

### **2.3.1.2 Metabolitos secundarios**

También conocidos como productos secundarios, son compuestos químicos que se encuentran en diferentes grupos taxonómicos, ya que no cumplen ninguna función específica, ni vital en la planta, las mismas son utilizadas en la naturaleza para una mejor interacción del vegetal y su ambiente; pero el hombre los utiliza con fines industriales para su beneficio como: perfumes, cremas, insecticidas, medicamentos, colorantes, entre otros (Chaves, Sosa, & Valares, 2011)

### **2.3.2 Descripción y hábitat del romero**

El subarbusto perfumado pertenece a la familia *Labiataeae*, puede medir de 50 a 150 cm de altura, es perenne, frondoso y ramificado. Los principios activos se encuentran principalmente en las hojas las cuales poseen un color verde intenso. Posee floración casi todo el año con una coloración blanca, azulada o rosa. La planta posee un característico olor a alcanfor, también posee un sabor áspero y algo picante. Dicho arbusto es propio de zonas áridas y secas, una vez que se realiza el cultivo se almacena en cajas de cartón o bolsas de papel (López T. , 2008).

### 2.3.3 Taxonomía del romero



Figura 1. Romero (*Rosmarinus Officinalis* L.)

Fuente: Gonzáles (2013)

El romero conocido también popularmente como romero de olor, romero de jardín, romero real o romero, es un arbusto perenne de aproximadamente 1.5 metros de altura, con hojas lineales coriáceas de forma tubular, con aroma fuerte y agradable (Sousa, Talita, & Conceição., 2007).

Posee un tallo leñoso y ramificado, flores de color azul pálido lila, raramente blancas o rosas que se encuentran en conjunto muy próximas entre sí, tienen un estilo alargado y florecen durante todo el año (Gonzáles, 2013).

Tabla 1

*Taxonomía de la planta Rosmarinus officinalis L.*

<b>Nombre científico:</b>	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.
<b>Familia:</b>	Lamiaceae
<b>Phylum:</b>	Euphyta
<b>División:</b>	Angiospermae
<b>Clase:</b>	Dicotyledones
<b>Orden:</b>	Tubiflorae
<b>Género:</b>	Rosmarinus
<b>Especies:</b>	Officinalis L.

Fuente: (González, 2013)

#### 2.3.4 Metabolitos del romero

El romero (*Rosmarinus officinalis* L.), planta rica en principios activos y posee acción beneficiosa sobre la mayoría de los órganos del cuerpo humano. Esto se debe a que posee un gran contenido de aceites esenciales, cuyos compuestos activos son flavonoides, ácidos fenólicos y principios amargos, lo cual genera una acción tónica y estimulante sobre el sistema nervioso, circulatorio y corazón, además de ser colerético, colagogo, antiespasmódico, diurético, emenagogo y antigodanotrópico (Musa, 2008).

Se ha observado que la actividad antioxidante de los extractos de romero se debe particularmente a los ácidos caféico y rosmarínico, estos últimos poseen una doble función: como antioxidante y estimulante de la producción de prostaglandina E2 e inhibidor de la producción de leucotrienos B4 (Martínez, 2004).

#### 2.3.4.1 Metabolitos presentes en el romero

La capacidad antioxidante se puede dividir en dos categorías: sintéticos y naturales.

Los primeros son compuestos de estructuras fenólicas con varios grados de sustitución alquílica, mientras que los segundos pueden ser: compuestos fenólicos - tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos-, compuestos nitrogenados -alcaloides, aminoácidos y aminos- o carotenoides (Pastene, 2009).

- **Flavonoides:** Son metabolitos secundarios, que poseen una coloración amarillenta y rojiza, son compuestos fenólicos ya que poseen un grupo aromático enlazado a un alcohol. Se encuentran presentes en diversos vegetales así como en sus semillas, frutos etc; estas sustancias poseen efectos antiinflamatorios, antivirales, antialérgicos y además poseen un efecto protector frente a diversas patologías como cáncer y enfermedades cardiovasculares (Escamilla, Cuevas, & Guevara, 2009).
- **Ácidos fenólicos:** Los compuestos fenólicos son moléculas que tienen uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático. Junto con las vitaminas, los compuestos fenólicos son considerados como potentes antioxidantes en la dieta, por ejemplo, se encuentran presentes en variedad cereales, frutas, raíces y hortalizas (Peñarrieta, Tejada, Mollideno, Vila, & Bravo., 2014)
- **Taninos:** Estos principios activos se clasifican en: taninos hidrolizables (TH) los cuales son de gran interés científico debido a su potencial nutraceútico. Tanto los galotaninos (GT) como los elagitaninos (ET) muestran diversas propiedades bioquímicas en las personas que las consumen, lo cual se traduce en beneficios

para la salud -antidiabéticas, antimutagénica, antimicrobianas- gracias a su capacidad antioxidante (Aguirre, y otros, 2015).

- **Ácido caféico:** Se encuentra dentro de los compuesto fenólicos, es antioxidante, ejerce efectos quelantes y modula la actividad de varios sistemas enzimáticos, actuando en su mayoría en la dieta, es un elemento que promueve la salud ante componentes químicos y físicos que resulten estresantes para el organismo (Sánchez, Villalobos, Arguedas, & Monge., 2018).
- **Ácido rosmarínico:** Posee actividades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas de amplio espectro contra bacterias y hongos. La actividad antioxidante del ácido rosmarínico es más fuerte comparando con la vitamina E. Elimina las pecas, refuerza la elasticidad de la piel y retrasa el envejecimiento. Aumenta la circulación sanguínea del cuero cabelludo y estimula el crecimiento del cabello y de las uñas ( Dermocosmetic Institute, 2017).

### **2.3.5 Características Botánicas**

El género *Rosmarinus*, cuenta con tres especies las cuales se diferencian morfológicamente en:

Tabla 2

*Características de las especies del género Rosmarinus.*

Especie	Características
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Posee hojas hasta de 40mm, en general de tamaño variable de rama, posee cáliz con pelos ramificados, inflorescencias axilares y glabras por el haz.
<i>Rosmarinus eriocalix</i>	Posee hojas glabras por el haz y núculas de hasta 2,9 mm.
<i>Rosmarinus tomentosus</i>	Posee hojas pelosas por el haz y núculas de hasta 3,1 mm.

Fuente: (Morales, 2014)

Aunque oficialmente son tres las especies de la planta de romero, en ciertas ocasiones se ha observado la presencia de híbridos de manera natural como es el caso de: *Rosmarinus eriocalix* - *Rosmarinus officinalis*; y de *Rosmarinus officinalis* - *Rosmarinus tomentosus* (Morales, 2014).

### 2.3.6 Características Químicas

Las hojas de la planta de romero poseen 1,0-2,5% de aceite esencial el cual se encuentra constituido por: 1,8-cineol, alfa-pineno, alcanfor, alfa-terpineol, canfeno, borneol, acetato de bornilo, limoneno, linalol, mirceno, verbenona. Pero ésta composición puede variar debido a factores como: lugar en donde se recolectó la planta, grado de desarrollo de la planta, estrés abiótico, etc. Además las hojas de romero también contienen principios amargos como diterpenos -picrosalvina, carnosol, isorosmanol, rosmadial, rosmaridifenol, rosmariquinona-, triterpenos, flavonoides y compuestos fenólicos derivados de ácido cinámico (López T. , 2008).

### **2.3.7 Usos Medicinales**

La planta de romero posee varios usos medicinales dentro de los cuales se destacan sus propiedades coléricas, antiespasmódicas, colagogas y hepatoprotectoras, debido a que estimula la producción de jugos gástricos y relajación del esfínter Oddi y músculo liso gastrointestinal. La misma también ejerce un efecto antiinflamatorio, diurético, antioxidante y antiulcerogénico, aunque en ensayos clínicos no se ha descrito dichas propiedades medicinales pero se ha demostrado en ensayos *in vivo* e *in vitro*. En cuanto a los principios activos los diterpenos que posee el romero ejercen un efecto protector en las membranas celulares generando un resultado antioxidante y captador de radicales libres, también inhiben la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad y el envejecimiento de la piel ocasionado por factores de oxidación (López T. , 2008).

### **2.3.8 Métodos de separación y purificación de principios activos**

La razón principal para el aislamiento de compuestos químicos presentes en las plantas es para encontrar principios activos que posean funciones que ayuden a mejorar productos alimenticios, medicinas, etc; y de ésta manera mejorar el estilo de vida del hombre.

Entre los métodos más utilizados se encuentran: extracción separativa, purificación, cromatografía, cristalización, extracción líquido- líquido y destilación (Hidalgo, 2015).

### **2.3.8.1 Maceración**

Es un método de extracción de un sólido-líquido, se utiliza generalmente para estructuras duras de la planta como: tallos, hojas rígidas, etc; el proceso consiste en mantener en reposo y en contacto durante varios días a la droga con el solvente, para así poder extraer y determinar los principios activos que posee la misma. Es el procedimiento de extracción más simple ya que solo debe de protegerse de la luz para de esta manera evitar algunas reacciones secundarias y agitar periódicamente (Carrión & García, 2010).

### **2.3.8.2 Métodos de extracción de metabolitos con solventes**

La extracción consiste en la separación de una sustancia, la cual se encuentra distribuida en dos fases, existen técnicas para las diferentes muestras. Para la mezcla sólida se utiliza Soxhlet, mientras que para la muestra líquida se utiliza la decantación. El objetivo de éste método es aumentar la concentración del analito y reducir al mínimo o eliminar interferencias en el proceso de análisis. Actualmente las combinaciones líquidas son las más utilizadas (Wandersleben, 2016).

### **2.3.9 *Screening* fitoquímico**

Es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales metabolitos secundarios presentes en una planta, entonces aislar a grupos de interés dependiendo del estudio o investigación que se esté realizando. El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de color y precipitación (Palacios, 2013).



- **Prueba para determinación de presencia de alcaloides.**

Para realizar la prueba de Dragendorff, en 1 mL de extracto acuoso se coloca una gota de HCl concentrado al 50%, se agita y se filtra hasta que el filtrado sea completamente transparente, luego se coloca el reactivo de Dragendorff, se considera como positiva las pruebas en las que aparece un precipitado color anaranjado-marrón (Pérez, 2015).

Además se realiza el ensayo de Mayer, en 5 mL de extracto acuoso se coloca 5 gotas de HCl concentrado al 50%, se calienta y enfría luego se agrega NaCl en polvo, se agita y se procede a filtrar, en la parte filtrada se añade de 2 a 3 gotas del Reactivo de Mayer, se considera como positiva las pruebas en las que aparece un precipitado color blanco crema (Cortés & Guzmán, 2011).

- **Prueba para determinación de presencia de flavonoides.**

Se realiza la prueba de Shinoda en la cual se prepara un tubo con el extracto diluido se le agrega un trocito de viruta de magnesio amalgamado y unas gotas de ácido clorhídrico concentrado. La aparición de colores que van del rojo profundo a magenta indica la presencia de una flavanona o dihidroflavanol. dihidrochalconas y otros flavonoides no reaccionan (Palacios, 2013).

- **Prueba para determinación de presencia de taninos**

Se realiza la prueba de cloruro férrico en la cual se coloca en un crisol 5 mL de extracto alcohólico y disolvemos en 10 mL de agua destilada, filtramos y tomamos 3 mL de extracto acuoso en donde añadimos 2 gotas de cloruro férrico al 10%, se consideran como positivas las pruebas en las que aparece un precipitado color violeta (Barrera, Parra, & Cuca, 2014).

- **Prueba para determinación de presencia de saponinas**

Se realiza el test de índice de espuma o índice afrosimétrico, en cual se coloca el extracto de la planta en un tubo de ensayo a continuación se coloca agua destilada y se procede a agitar fuertemente. Si en la superficie del extracto se forma espuma la prueba es positiva. Éste método de valuación se basa en las propiedades físico-químicas que presentan las soluciones, ya que disminuye la tensión superficial de los líquidos provocando la presencia de espuma por la agitación (Foy-Valencia, Mac-Donald, Cuyos, & Dueñas, 2005).

### **2.3.10 Capacidad antioxidante**

La oxidación, es una reacción química en la que un ión, átomo o molécula cede electrones. Un ejemplo típico es cuando se deja un pedazo de manzana sobre una superficie, al pasar del tiempo se va oxidando presentando una coloración cada vez más oscura, debido a que la energía se encuentra liberándose ya sea de manera rápida o lenta, lo mismo ocurre con los productos que no poseen capacidad antioxidante o sustancias con dicho potencial (Williamson, 2014).

Un antioxidante es una sustancia que se encuentra presente en alimentos de consumo diario y ayuda a prevenir diversas patologías en las personas. En la actualidad son muy utilizados en las industrias para retrasar los procesos de oxidación evitando así la presencia de efectos negativos en los productos. Además de las interacciones químico-biológicas de los compuestos antioxidantes se debe estudiar también el proceso de deterioro oxidativo (Coronado, 2015).

Los antioxidantes se clasifican en: endógenos - normalmente biosintetizados por el organismo- y exógenos -a través de la dieta-. El mecanismo de acción de los antioxidantes se basa en prevenir o retardar la oxidación de un sustrato biológico, y en algunos casos revertir el daño oxidativo de las moléculas afectadas (Palacios, 2013).

Según el mecanismo de acción, se clasifican en:

Tabla 3

*Tipos de antioxidantes*

	Aparecen al comienzo de una cadena de oxidación.
<b>Antioxidantes preventivos</b>	Ejemplo: enzimas, glutatión peroxidasa, catalasa y peroxidasa.
<b>Antioxidantes secundarios</b>	Son aquellos que interrumpen la cadena de oxidación, captando radicales libres. Algunos ejemplos son: enzima superóxido dismutasa, vitamina E y C.

Fuente: (Alomar, 2010)

En el momento que se saturan los antioxidantes, ya no pueden captar más radicales libres y dejan de ser efectivos y simplemente los estabilizan y comienza el denominado período de latencia (Bueno, 2014).

### 2.3.10.1 ¿Cómo se da la capacidad antioxidante?

Las plantas obtienen mayor capacidad antioxidante cuando sus metabolitos secundarios son capaces de:

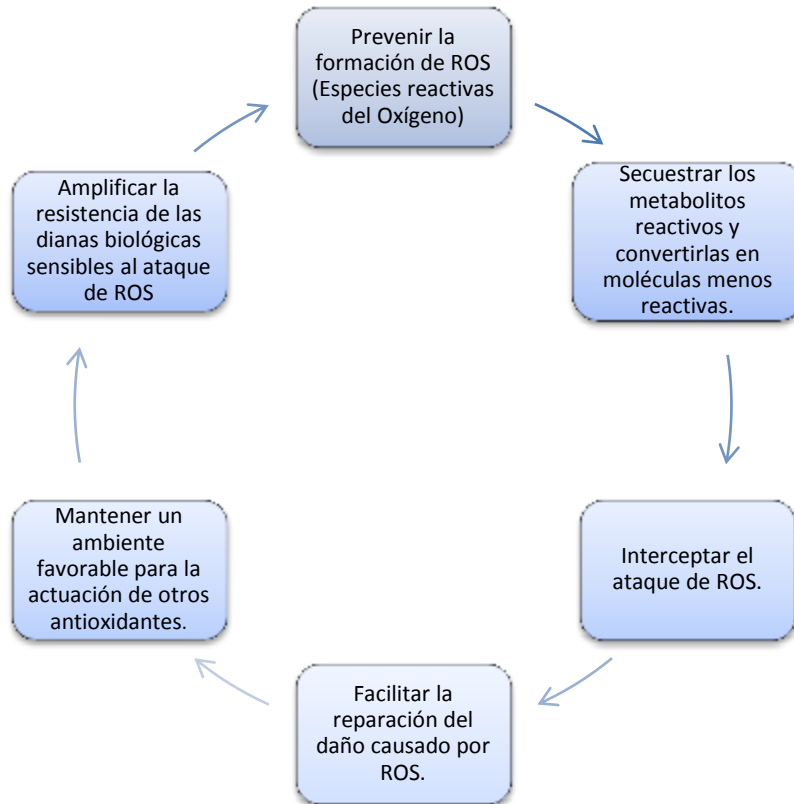


Gráfico 1. Ciclo para disminuir el estrés oxidativo.

Fuente: (Agudo, 2002)

### **2.3.10.2 Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método DPPH-2,2-difenil-1-picril hidrazilo-**

Consiste en el radical tiene un electrón desapareado y el mismo se representa de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por la reacción de la presencia de una sustancia antioxidante, siendo medida espectrofotométricamente a 517 nm. Por diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de captación de radical libre DPPH a una concentración de 20 mg/L (Chávez, 2004).

Los resultados del ensayo DPPH se presentan de diversas maneras. En la mayoría de estudios se expresa los resultados como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria  $-IC_{50}$ -, definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%. Este valor se calcula graficando el porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto (Deng, Cheng, & Yang, 2011).

# **CAPÍTULO III**

## **MARCO METODOLÓGICO**

### **3.1 Nivel de investigación**

La evaluación de la capacidad antioxidante es un tipo de investigación explicativa debido a que intenta buscar las causas del problema; es decir, establecer condiciones ambientales y tipo de solvente, para de ésta manera determinar que extracto posee mayor capacidad antioxidante.

Los resultados de la presente investigación van dirigidos a contribuir con más literatura desarrollada en diferentes países donde ésta especie vegetal es considerada muy importante debido a cada uno de los componentes que posee.

#### **3.1.1 Población y muestra**

Para el presente estudio se contó con una población finita y accesible en donde se receptorá tres kilogramos de romero fresco obtenido en el mercado "10 de Agosto" de la ciudad de Cuenca, del cual se tomará como muestra efectiva un kilogramo de planta fresca. Se seleccionó de la población una muestra homogénea donde se eliminó cualquier cuerpo extraño que pueda interferir en los resultados.

### **3.1.2 Variables**

#### **Variables según su función**

##### **Independiente**

- La variable independiente es el solvente utilizado en la muestra.

##### **Dependiente**

- La variable dependiente es la capacidad antioxidante de los extractos.

##### **Intervinientes**

- Las variables intervinientes son: tamaño de la partícula de la muestra, humedad y temperatura.

### **3.1.3 Técnicas e instrumentos de recolección de datos**

La recolección de datos de las pruebas se realizó mediante el uso de fichas de observación, en las cuales se evidenció las características y cualidades necesarias de cada procedimiento.

### **3.1.4 Técnicas de procesamiento y análisis de datos**

Se utilizó un método completamente al azar debido a que la investigación posee solo una variable, además de gráficos y tablas en los que se podrá interpretar de mejor manera los resultados.

## **3.2 Procesos**

### **Fase 1. Recolección de la muestra**

En ésta fase inicia la investigación, mediante la obtención de la cantidad necesaria de muestra a utilizarse en el proyecto. A continuación se describe los métodos y técnicas aplicadas.

#### **Toma de la muestra vegetal**

Se adquiere la muestra en el mercado "10 de Agosto" ubicado en la ciudad de Cuenca, obteniendo 1 Kg de la planta de romero (*Rosmarinus officinalis* L), se consideró solamente las hojas de la planta para realizar el estudio.

#### **Tratamiento de la muestra vegetal**

Se procede a lavar al material vegetal por tres veces con agua ultra pura, y de igual manera se procede a retirar cuerpos extraños que se encuentren presentes en la materia prima para evitar cualquier tipo de contaminación. El material vegetal se mantiene a temperatura ambiente.





*Figura 2.* Selección de romero (*Rosmarinus Officinalis L.*) como materia prima.

Fuente: Autora

### **Obtención de extracto total etanólico**

El extracto total etanólico se prepara utilizando 100 g de las hojas de materia prima, lo cual se macera durante quince días con 750 mL de etanol concentrado al 96%, es decir en relación 7:1 a la muestra. Transcurrido ese tiempo se procede a colocar la maceración en reposo y a temperatura ambiente.

El extracto etanólico se purifica a través de papel filtro y al vacío, se coloca en el rotavapor a 75°C hasta obtener un extracto totalmente concentrado con un volumen final de 150 mL.



*Figura 3.* Extracto etanólico en el rotavapor.

Fuente: Autora

### **Obtención total de extracto acuoso**

Para obtener el extracto total se trata a la materia vegetal con agua destilada. El extracto acuoso se prepara utilizando 100 g de las hojas de materia prima, lo cual se macera durante quince días con 750 mL de agua destilada, es decir en relación 7:1 a la muestra. Transcurrido ese tiempo se procede a colocar la maceración en reposo y a temperatura ambiente. El extracto acuoso se purifica a través de papel filtro y al vacío.

### **Fase 2. Caracterización cualitativa**

En ésta fase el extracto se somete a diversas pruebas para determinación de metabolitos presentes en el mismo. Las técnicas utilizadas se describen a continuación.

### 3.2.2 Marcha o *Screening* Fitoquímico

#### Prueba para determinación de alcaloides

**Ensayo de Dragendorff:** Se coloca 1 mL de muestra acuosa en un tubo de ensayo y 1 mL de muestra alcohólica en otro tubo de ensayo, posteriormente se adiciona a cada tubo 1 mL de ácido clorhídrico al 1%, luego se coloca a baño maría para que se evapore el solvente, se agrega tres gotas del reactivo de Dragendorff. Si las muestras son positivas se observa un cambio de coloración anaranjado.

#### Prueba para determinación saponinas

**Ensayo de espuma:** Se coloca 1 mL de extracto acuoso y alcohólico de la muestra en diferentes tubos de ensayo cada uno. Posteriormente se procede a colocar 5 mL de agua destilada en cada uno de los tubos y se agita fuertemente por dos minutos.

Se considera como una prueba positiva cuando existe espuma sobre la superficie del líquido con al menos 2 mm de altura.



*Figura 4.* Prueba de saponinas en extracto etanólico y acuoso.

Fuente: Autora

## Prueba para determinación de taninos

**Ensayo con cloruro férrico:** Se coloca 1 mL de extracto acuoso y alcohólico de la muestra en cada uno de los tubos correspondientes, luego se le agrega 1 mL de cloruro férrico al 5% y 1 mL de solución salina acuosa. Se considera como una prueba positiva cuando se obtiene una coloración:

- Verde intensa: Taninos pirocatecólicos.
- Azul: Taninos pirogalotánicos.



*Figura 5.* Prueba de taninos en extracto etanólico y acuoso.

Fuente: Autora

## Prueba para determinación de flavonoides

**Ensayo de Shidona:** Se adiciona 1 mL de extracto acuoso y alcohólico de la muestra en cada uno de los tubos correspondientes, se coloca 1 mL de ácido clorhídrico concentrado en cada uno de los tubos, a continuación se agrega un pedazo de cinta de magnesio. Posterior a la reacción se espera 5 minutos y se agrega 1 mL de alcohol

amílico. La prueba se considera positiva cuando se observa una coloración anaranjada o rojiza intensa.

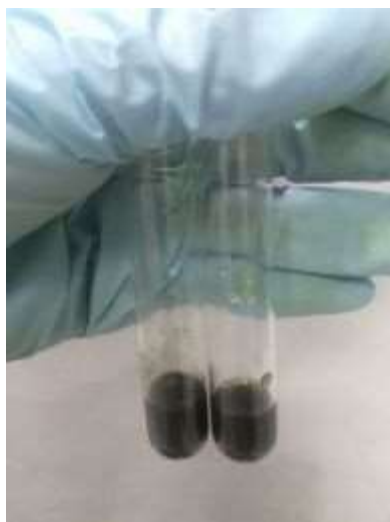


*Figura 6.* Prueba de flavonoides en extracto etanólico y acuoso

Fuente: Autora

### **Prueba para determinación de fenoles**

Se coloca 1 mL de extracto acuoso y alcohólico de la muestra en cada uno de los tubos correspondientes, luego se adiciona 1 mL de solución de cloruro férrico al 1%. Se considera como prueba positiva cuando cambia a una coloración verde, azul violeta o negro.



*Figura 7.* Prueba de fenoles en extracto etanólico y acuoso.

Fuente: Autora.

### **Fase 3. Determinación de la capacidad antioxidante**

Se prepara una solución de 0,5 mM de DPPH en etanol al 96%, para cual pesamos 49 mg de DPPH y se aforó a 250 mL con etanol al 96%; luego se coloca en frasco ámbar y se mantiene en refrigeración hasta el momento del ensayo.

#### **Curva de Calibración**

La curva de calibración se realizó en base al ácido ascórbico puro, para lo cual se pesó 25 mg del mismo y se procedió a aforar en un balón de 25 mL con etanol al 96%.

#### **Preparación de las muestras**

Se extrae 1 mL de extracto acuoso y alcohólico de la muestra de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), y se afora en un balón de 10 mL con etanol al 96%. De igual manera se realiza el procedimiento para el ácido ascórbico en pastilla el cual es el compuesto sintético con el que se comparó los resultados del extracto.

Se enciende el espectrofotómetro UV-VIS y se programa la longitud de onda a 517 nm. Además se encera con etanol antes de leer las muestras (Noriega, Aldana, & Guayasamín, 2014).

### Preparación de soluciones de las fracciones

Tabla 4

*Preparación de fracciones para lectura del antirradical DPPH*

<b>Frascos</b>	<b>Muestras uL</b>	<b>DPPH mL</b>	<b>Etanol 96% uL</b>
Blanco	-	2,9	100
1	1	2,9	99
2	5	2,9	95
3	10	2,9	90
4	20	2,9	80
5	50	2,9	50
6	80	2,9	20
7	100	2,9	0

Fuente: Autora

Se coloca los frascos dentro de un vaso de precipitación y lo dejamos agitar a 200 rpm durante una hora a temperatura ambiente. Se mide la absorbancia de los frascos comenzando por el blanco y luego los otros de forma ascendente.

El porcentaje de inhibición se calcula mediante la formula

$$\% \text{ DDPP } Inhibido = \left( \frac{Ac - Am}{Ac} \right) \times 100$$

(Scartezzini, Antognoni, Raggi, Poli, & Sabbioni., 2006).

Donde

- **Ac** es la absorbancia del patrón de referencia
- **Am** representa la absorbancia de cada una de las soluciones diluidas del extracto de la especie vegetal.

La actividad antioxidante se expresa como una concentración,  $IC_{50}$  en  $\mu\text{g/mL}$ , que se requiere para el 50% de inhibición de la formación del radical DPPH (Noriega, Aldana, & Guayasamín, 2014).



# CAPÍTULO IV

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Fase 1. Obtención de la materia vegetal

#### 4.1.1 Obtención del extracto etanólico

De un kilogramo de planta de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), se obtuvo por maceración 150 mL de extracto etanólico concentrado, después de haber filtrado y colocado en el rotavapor, el mismo posee un aspecto de color verde oscuro y sin viscosidad.

Tabla 5

*Datos de la obtención del extracto etanólico total.*

<b>Especie Vegetal</b>	<b>Peso inicial</b>	<b>Peso de la muestra</b>	<b>Volumen del extracto etanólico total</b>
<i>Rosmarinus</i> <i>Officinalis</i> L	1 Kg	100 g	150 mL

Fuente: Autora

#### 4.1.2 Obtención del extracto acuoso

De un kilogramo de planta de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), se obtuvo por maceración 350 mL de extracto acuoso libre de impurezas, después de haber filtrado al vacío. El mismo posee un aspecto de color verde claro y sin viscosidad.

Tabla 6

*Datos de la obtención del extracto acuoso total*

<b>Especie Vegetal</b>	<b>Peso inicial</b>	<b>Peso de la muestra</b>	<b>Volumen del extracto acuoso total</b>
<i>Rosmarinus officinalis</i> L	1 Kg	100 g	350 mL

Fuente: Autora

#### **4.2 Fase 2. Caracterización cualitativa de la muestra**

Se aplicó el screening fitoquímico tanto al extracto acuoso y alcohólico, a continuación se describen los resultados.

Tabla 7

*Resultados de la marcha fitoquímica de cada extracto*

<b>Metabolito Secundario</b>	<b>Extracto Acuoso</b>	<b>Extracto Etanólico</b>
<b>Alcaloides</b>	-	+
<b>Saponinas</b>	-	+
<b>Taninos</b>	+	+
<b>Flavonoides</b>	-	+
<b>Fenoles</b>	+	+

Fuente: Autora

(+) Presencia de metabolito secundario. (-) Ausencia de metabolito secundario.

La presencia de alcaloides se evidencia en el extracto etanólico observándose un color anaranjado, mientras que en el extracto acuoso no se observa dicha coloración lo que da un resultado negativo. Se evidenció de manera cualitativa la presencia de éste metabolito secundario solamente en el extracto alcohólico. Según estudios realizados por Estrada (2010), en su investigación determina la presencia de pequeñas cantidades de alcaloide rosmaricina en la planta. De igual manera lo afirma Ávila, Navarro, Vera, Dávila, Melgoza, & Meza (2011) donde demuestran en sus estudios un alto contenido de rosmaricina especialmente en las hojas de romero (*Rosmarinus officinalis* L.).

La presencia de saponinas se evidencia en el extracto etanólico observándose la presencia de burbujas sobre la superficie del mismo, mientras que en el extracto acuoso no se observó la formación de burbujas lo que dio un resultado negativo. En las investigaciones realizadas por Herráiz (2009), se encontró saponinas ácidas (0,15%).

La presencia de taninos se observa en el extracto acuoso, ya que el mismo posee una coloración verde claro, mientras que en el extracto etanólico se observa una coloración verde oscura lo que da como resultado positivo. Según Herráiz (2009) el romero (*Rosmarinus officinalis* L.) posee taninos especialmente en sus tallos.

La presencia de flavonoides se evidencia en el extracto etanólico, ya que el mismo posee una coloración rojiza, mientras que el extracto acuoso posee una coloración amarillenta obteniendo un resultado negativo. Ávila, Navarro, Vera, Dávila, Melgoza, & Meza (2011) en su estudio demostraron que la planta de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) posee un alto contenido de flavonoides. De igual manera afirma Estrada (2010), quien demostró la presencia de éstos compuestos como son:

apigenina, diosmetina, diosmina, hispidulina, luteolina, cirsimarina, nepritina, sinensetina y cupafolina.

La presencia de fenoles se evidencia en el extracto etanólico, ya que posee una coloración verde oscura, de igual manera se observa en el extracto acuoso; es decir, que los fenoles se encuentran presentes en los dos extractos. En el artículo publicado por Barni, Fantanals, & Moreno (2009), se evidencia que el extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) posee una concentración de 2,3% de polifenoles activos. Miercieli (2009), realiza un estudio en las tinturas de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) demostrando que las mismas poseen mayor cantidad de polifenoles que las tinturas de *Salvia officinalis*.

#### **4.3 Fase 3. Determinación de la capacidad antioxidante**

Se procede a obtener los resultados (Tabla N°8, N°9, N°10 y N°11), de la capacidad antioxidante del extracto alcohólico, acuoso y el ácido ascórbico en tableta el cual es el compuesto sintético con el cual se comparó los resultados para ver cual posee mayor capacidad antioxidante, además como patrón se utilizó el ácido ascórbico puro.

### 4.3.1 Determinación de la capacidad antioxidante del ácido ascórbico puro

Tabla 8

*Resultados de porcentaje de captación de radicales libres del ácido ascórbico puro.*

<b>μL de extracto</b>	<b>Concentración (μg/mL)</b>	<b>Absorbancia a 517 nm</b>			<b>Promedio</b>	<b>% de Inhibición</b>
1	0,3333	2,3552	2,3529	2,3518	2,3533	0,0212
5	1,6667	2,248	2,2406	2,2496	2,2461	4,5755
10	3,3333	2,1526	2,1536	2,1526	2,1529	8,5351
20	6,6667	2,0079	2,0079	2,0091	2,0083	14,6784
50	16,6667	1,4564	1,4554	1,4562	1,456	38,1426
80	26,6667	0,8424	0,8421	0,8429	0,8425	64,2068
100	33,3333	0,4338	0,4346	0,4352	0,4345	81,5404
					<b>IC<sub>50</sub> (μg/mL)</b>	<b>20,7889</b>

Fuente: Autora

Al evaluar el porcentaje de captación de radicales libres del patrón de referencia que se utilizó en la presente investigación que es el ácido ascórbico puro se pudo evidenciar que en la concentración de 100 ppm se obtuvo un mayor porcentaje del 81,54%.

En cuanto al IC<sub>50</sub> del ácido ascórbico puro se obtuvo 20,7889 µg/mL; según Noriega, Aldana & Guayasamín (2014), en su investigación: “Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos -alcohólico y acuoso- de la hojas de *Ficus Citrifolia* y caracterización química de los polifenoles” obtiene un valor del IC<sub>50</sub> de 17,864 µg/mL es decir que los valores obtenidos en el presente trabajo son muy parecidos y existe normalidad.

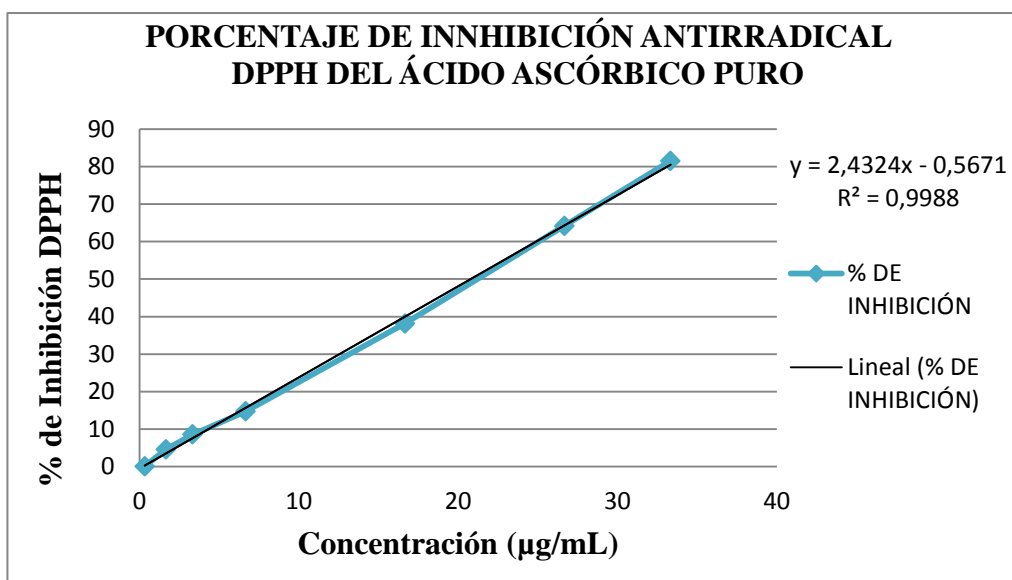


Gráfico 2. Porcentaje de inhibición de DPPH de ácido ascórbico puro.

Fuente: Autora

### 4.3.2 Determinación de la capacidad antioxidante del ácido ascórbico en pastilla.

Tabla 9

Resultados de porcentaje de captación de radicales libres del ácido ascórbico en pastilla.

$\mu\text{L}$ de extracto	Concentración ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Absorbancia a 517 nm				Promedio	% de Inhibición
1	0,3333	1,6527	1,68	1,6802	1,6709	0,5417	
5	1,6667	1,652	1,6521	1,652	1,652	1,6667	
10	3,3333	1,611	1,6356	1,6592	1,6453	2,0655	
20	6,6667	1,6232	1,6211	1,6221	1,6223	3,4345	
50	16,6667	1,5522	1,5518	1,5517	1,5518	7,631	
80	26,6667	1,4469	1,4772	1,4764	1,4668	12,6905	
100	33,3333	1,4311	1,43	1,4297	1,4302	14,869	
<b>IC<sub>50</sub></b>							
<b>(<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>							113,4747

Fuente: Autora

Para la presente investigación se comparó los extractos del romero (*Rosmarinus officinalis* L.), frente a ácido ascórbico en pastilla, en el cual se observó que el IC<sub>50</sub> es igual a 113,4747  $\mu\text{g}/\text{mL}$  lo que significa que la pastilla de ácido ascórbico ya sea por los preservantes, excipientes y demás no posee una alta capacidad antioxidante como en el caso anterior del ácido ascórbico puro. Silva & Noriega (2018), en su reciente investigación revelan que el valor del IC<sub>50</sub>, de la pastilla del ácido ascórbico es de 34,88  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , pero éste valor depende de la marca comercial debido a la cantidad de sustancias que contiene como colorantes, saborizantes y entre otros.

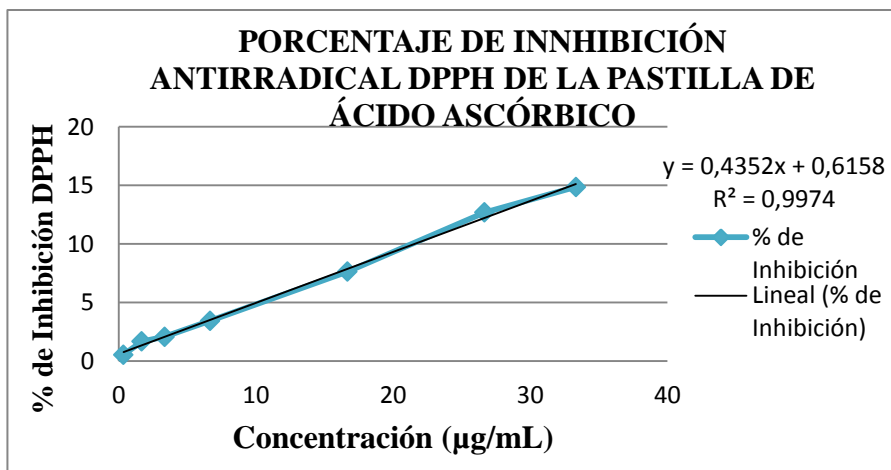


Gráfico 3. Porcentaje de inhibición de DPPH de la pastilla de ácido ascórbico.

Fuente: Autora

#### 4.3.3 Determinación de la capacidad antioxidante del extracto acuoso de romero (*Rosmarinus officinalis* L.)

Tabla 10

Resultados de porcentaje de captación de radicales libres del extracto acuoso de la planta.

µL de extracto	Concentración (µg/mL)	Absorbancia a 517 nm				Promedio	% de Inhibición
1	0,3333	2,2636	2,2635	2,2654	2,2642	2,2366	
5	1,6667	2,1576	2,1619	2,1616	2,1446	7,4006	
10	3,3333	2,1363	2,1365	2,1398	2,1375	7,7072	
20	6,6667	1,8928	1,8915	1,8916	1,892	18,3074	
50	16,6667	1,1095	1,1082	1,1084	1,1087	52,1286	
80	26,6667	0,3494	0,3508	0,3507	0,3503	84,8747	
100	33,3333	0,259	0,2633	0,262	0,2614	88,7133	
<b>IC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>						<b>17,1263</b>	

Fuente: Autora



Al evaluar el porcentaje de captación de radicales libres en el extracto acuoso de la muestra se evidencia que en la concentración de 100 ppm se obtiene el más alto porcentaje, el cual equivale a 88,71%. Comparado con el patrón de referencia tenemos mayor porcentaje de captación de radicales libres en el extracto. Posee un  $IC_{50}$  de 17,1263  $\mu\text{g/mL}$  lo que demuestra que el extracto acuoso posee capacidad antioxidante. De igual manera los autores Berrington & Lall (2012), describen en su estudio un valor del  $IC_{50}$  correspondiente a 10,965 para el extracto de romero. Según Quispe (2001), en su investigación utilizó extracto acuoso de romero (*Rosmarinus officinalis* L), y obtuvo un valor del  $IC_{50}$  igual a 21.56  $\mu\text{g/ml}$ .

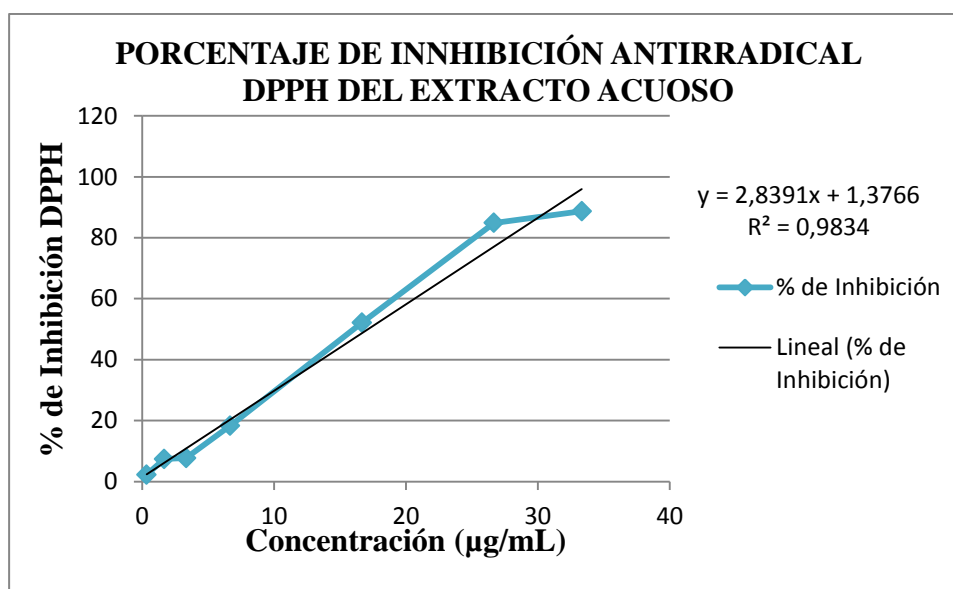


Gráfico 4. Porcentaje de inhibición de DPPH del extracto acuoso de *Rosmarinus Officinalis* L.

Fuente: Autora.

#### 4.3.4 Determinación de la capacidad antioxidante del extracto etanólico de romero (*Rosmarinus officinalis* L.)

Tabla 11

*Resultados de porcentaje de captación de radicales libres del extracto etanólico de la planta.*

$\mu\text{L}$ de extracto	Concentración ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Absorbancia a 517 nm			Promedio	% de Inhibición
1	0,3333	1,3265	1,3265	1,3265	1,3265	3,2105
5	1,6667	1,253	1,2531	1,2531	1,2531	8,5662
10	3,3333	1,2571	1,2575	1,2574	1,2573	8,2597
20	6,6667	1,2166	1,2162	1,2171	1,2166	11,2294
50	16,6667	1,1308	1,1312	1,1316	1,1312	17,4607
80	26,6667	0,9002	0,899	0,8996	0,8996	34,3597
100	33,3333	0,8033	0,8026	0,8051	0,8037	41,3571
					<b>IC<sub>50</sub> (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	42,2613

Fuente: Autora

Al evaluar el porcentaje de captación de radicales libres en el extracto etanólico de la muestra se observa que en la concentración de 100 ppm se obtiene el más alto porcentaje, el cual equivale a 41,36%. Comparado con el patrón de referencia y con el extracto etanólico tenemos menor porcentaje de captación de radicales libres. El extracto etanólico posee un IC<sub>50</sub> de 42,2613  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , lo que significa que el extracto acuoso posee mayor capacidad antioxidante que el extracto etanólico debido a que mientras más bajo es el IC<sub>50</sub> mayor capacidad antioxidante existe.

No existe material bibliográfico para comparar los resultados del extracto etanólico, Abuashwashi (2017), realizó un estudio en extracto metanólico de *Rosmarinus officinalis* L., en el cual obtuvo un IC<sub>50</sub> correspondiente a 13,25 µg/mL.

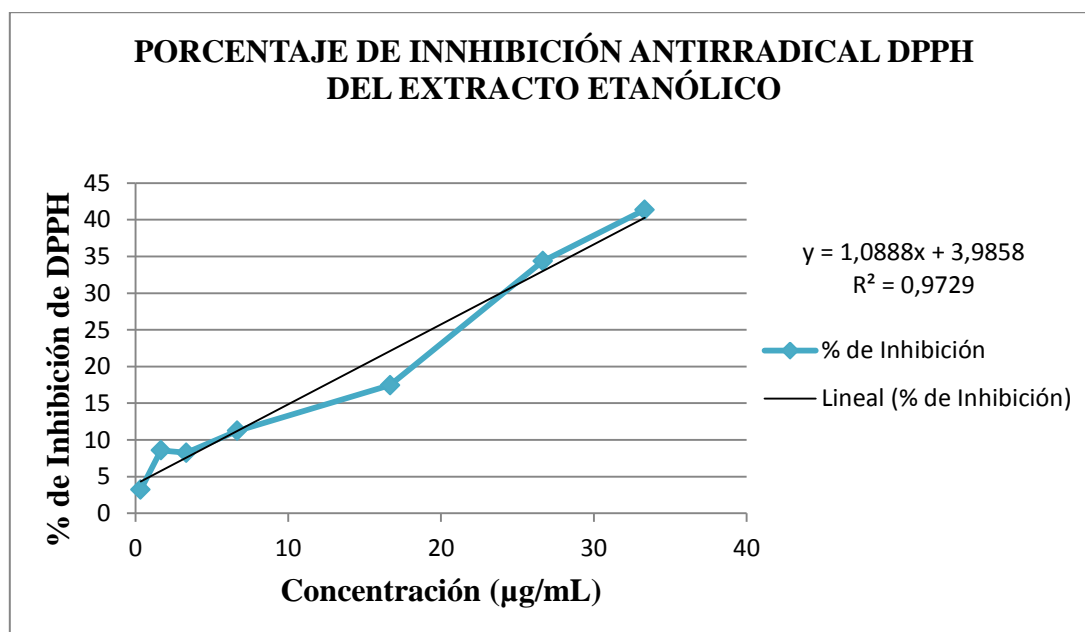


Gráfico 5. Porcentaje de inhibición de DPPH del extracto etanólico de *Rosmarinus Officinalis* L.

Fuente: Autora.

#### 4.3.4 Comparación de los valores del IC<sub>50</sub> del ácido ascórbico puro, ácido ascórbico en pastilla y extractos -acuoso y etanólico- del romero.

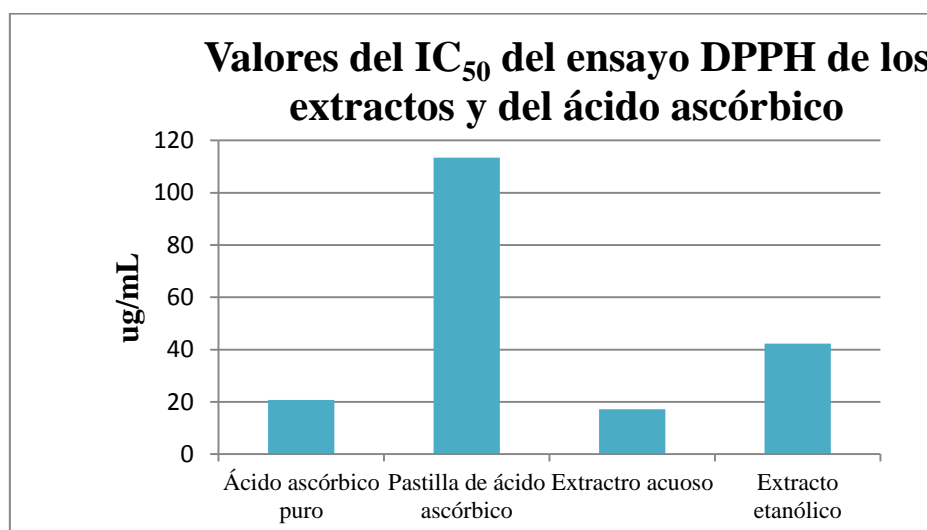


Gráfico 6. Valores del IC<sub>50</sub> el ensayo de DPPH de extractos, ácido ascórbico puro y ácido ascórbico en pastilla.

Fuente: Autora.

En el gráfico N° 6 se observa de manera más clara que el extracto acuoso posee un IC<sub>50</sub> menor que el ácido ascórbico puro, extracto acuso y que la pastilla de ácido ascórbico. Es decir que dicho extracto posee mayor capacidad antioxidante debido a que su valor del IC<sub>50</sub> es el más bajo.

#### 4.4 Comparación de la capacidad antioxidante de los extractos de la planta de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) frente a un compuesto sintético.

Para cumplir con el tercer objetivo de la presente investigación se realizó un análisis estadístico inferencial y descriptivo, mediante la ayuda de los programas estadísticos IBM SPSS Statistics ® e InfoStat/L versión libre 2019.

#### **4.4.1 Comparación de la capacidad antioxidante del extracto acuoso frente al compuesto sintético.**

Para el análisis inferencial se realiza la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks, debido a que se tiene una muestra menor a 50 datos, razón por la cual se plantea las siguientes hipótesis:

$H_o$  = Los datos poseen una distribución normal

$H_a$  = Los datos no poseen una distribución normal

Tabla 12

*Prueba de Shapiro-Wilks*

<b>Pruebas de normalidad</b>						
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilks		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Ácido ascórbico	,255	7	,188	,871	7	,191
Pastilla de ácido ascórbico	,252	7	,200	,877	7	,215
Extracto acuoso	,264	7	,150	,823	7	,069
Extracto etanólico	,251	7	,200 <sup>*</sup>	,858	7	,147

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Fuente: Autora

Una vez realizada la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks se puede observar en la columna de significancia que los datos de las muestras poseen una distribución normal porque los valores son mayores a 0,05; razón por la cual se acepta la hipótesis nula.

Basándose en los resultados de la prueba de normalidad se aplica un diseño completamente al azar, debido que se posee un factor de entrada -variable dependiente-, un factor de salida -variable independiente- y un nivel de confianza del 95%. La variable dependiente en éste caso es el solvente y la variable independiente es la capacidad antioxidante de cada extracto. Para esta prueba se plantean las siguientes hipótesis:

$$H_0 = u_1 = u_2 = u_3$$

$$H_a = u_1 \neq u_2 \neq u_3$$

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
IC50	4	0,94	0,91	28,05

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5644,07	1	5644,07	30,61	0,0311
Concentración	5644,07	1	5644,07	30,61	0,0311
Error	368,75	2	184,37		
Total	6012,82	3			

Figura 8. Prueba estadística del ANOVA.

Fuente: Autora

En la ilustración N° 8 se puede observar que el valor de  $p$  es menor a 0,05; razón por la cual se acepta la hipótesis alternativa es decir que la actividad antioxidante de los extractos del romero (*Rosmarinus officinalis* L.) posee diferencias significativas entre sí. En realidad el extracto acuoso de la planta posee mayor actividad antioxidante que el extracto etanólico, debido a que el agua es el mejor solvente por su polaridad debido a que tiene una mayor capacidad para atraer a los iones y así incrementar su capacidad antioxidante.

Finalmente para determinar que extracto es el que tiene mayor capacidad antioxidante frente al ácido ascórbico puro y a la pastilla de ácido ascórbico se realiza la prueba estadística de Dunnett (tabla N°13 y N°14), la cual se basa en la comparación de diferentes tratamientos para observar y determinar el más adecuado.

Para la interpretación de resultados se debe determinar el límite superior de la prueba, en donde los valores negativos representan una menor capacidad antioxidante frente al patrón de estudio.

Tabla 13

*Prueba de Dunnett comparando con ácido ascórbico puro*

<b>Comparaciones múltiples</b>						
Variable dependiente: CONCENTRACIÓN						
T de Dunnett (bilateral) <sup>a</sup>						
(I) Extractos	(J) Extractos	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Extracto acuoso	Ácido ascórbico puro	7,09000	13,83441	,919	-27,5883	41,7683
Extracto etanólico	Ácido ascórbico puro	-12,46857	13,83441	,698	-47,1469	-22,2097

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.

Fuente: Autora

En la tabla N°13 en la cual se compara con el ácido ascórbico puro se evidencia que el extracto etanólico posee menor capacidad antioxidante. Y que el extracto acuoso posee mayor capacidad antioxidante que el ácido puro.

Tabla 14

*Prueba de Dunnett comparando con la pastilla de ácido ascórbico*

<b>Comparaciones múltiples</b>						
Variable dependiente: CONCENTRACIÓN						
T de Dunnett (bilateral) <sup>a</sup>						
(I) Extractos	(J) Extractos	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Extracto acuoso	Pastilla de ácido ascórbico	31,19857	13,83441	,084	-3,4797	65,8769
Extracto etanólico	Pastilla de ácido ascórbico	11,64000	13,83441	,738	-23,0383	46,3183

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.

Fuente: Autora



En la tabla N°14 se compara los extractos de *Rosmarinus officinalis* L. con la pastilla de ácido ascórbico, en donde se observa que las muestras poseen mayor capacidad antioxidante que el compuesto sintético.

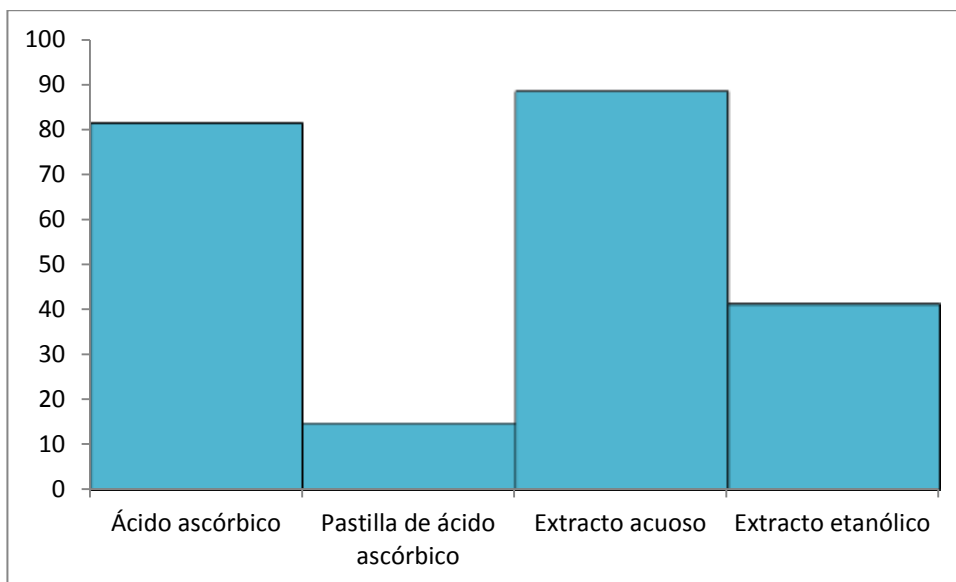


Gráfico 7. Histograma de la capacidad antioxidante de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), frente al ácido ascórbico.

Fuente: Autora

Para finalizar se realiza la estadística descriptiva, mediante el uso de un histograma, en donde se afirma que el extracto acuoso de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), posee mayor capacidad antioxidante que el extracto etanólico, ácido ascórbico puro y la pastilla de ácido ascórbico.

# CAPÍTULO V

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A partir de la evaluación de la capacidad antioxidante del extracto alcohólico y acuoso de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), frente a un compuesto sintético se concluye lo siguiente:

De acuerdo con el *screening* fitoquímico del extracto alcohólico, se evidencio la presencia de: alcaloides, saponinas, taninos, flavonoides y fenoles; mientras que en el extracto acuoso se observó la presencia de: taninos y fenoles. Lo cual permite verificar la capacidad antioxidante que posee la planta.

Se calculó el valor del IC<sub>50</sub> tanto de los extractos como del ácido ascórbico puro y la pastilla de ácido ascórbico; obteniendo un valor más bajo para el extracto acuoso y uno similar para el ácido ascórbico puro, demostrando que la planta posee capacidad antioxidante.

A través del análisis estadístico de bloque al azar –ANOVA-, el valor de *p* es menor a 0.05 es decir que se rechaza la hipótesis nula, demostrando así que la capacidad antioxidante del extracto acuoso de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), es diferente a la del extracto etanólico.

También se observó el cambio de coloración de las muestras al realizar la técnica de DPPH -2,2-difenil-1-picril hidrazilo-, la cual va desde un morado intenso-violeta-café claro y finalmente amarillo pálido; comprobando una vez más la presencia de la actividad antioxidante.

El extracto acuoso fue que el presentó mayor capacidad antioxidante con 88,71%, seguido del ácido ascórbico puro con 81,54%, luego el extracto etanólico con 41,35% y finalmente la pastilla de ácido ascórbico con 14,87%.

Mediante ésta investigación se demostró que la planta de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) posee mayor capacidad antioxidante que los compuestos químicos, ya que en los últimos se disminuye su capacidad por las sustancias que contiene como: preservantes, colorantes, etc.

## RECOMENDACIONES

- La continuidad de estudios sobre la planta de romero (*Rosmarinus officinalis* L), debido a que la planta tanto en el extracto acuoso como en el etanólico posee la mayoría de metabolitos que se estudiaron.
- Desde el momento de la recolección de la planta hasta la elaboración de las pruebas se tenga la asepsia adecuada para evitar contaminación cruzada.
- El estudio de la planta en diferentes épocas del año es importante para la observación de presencia o ausencia de diversos metabolitos secundarios.
- Estudio de la capacidad antioxidante del romero (*Rosmarinus officinalis* L), por otros métodos como: ABTS o FRAP.
- Estudio de factores que afectan la capacidad antioxidante de la planta de romero (*Rosmarinus officinalis* L).
- Envolver en papel aluminio los frascos ámbar para evitar la degradación de los reactivos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dermocosmetic Institute. (2017). *Ácido Rosmarínico*. Recuperado el 12 de Enero de 2019, de *Ácido Rosmarínico*: <http://bit.ly/2Y9exiT>
2. Universidad de Sonora. (s.f.). *Importancia de los antioxidantes*. Recuperado el 26 de Noviembre de 2018, de *Importancia de los antioxidantes*: <http://bit.ly/2Ls7iNe>
3. Abuashwashi, M. (2017). *Estudio analítico y de la actividad antioxidante de Rosmarinus officinalis L. de la Península Ibérica*. Recuperado el 17 de Enero de 2019, de *Estudio analítico y de la actividad antioxidante de Rosmarinus officinalis L. de la Península Ibérica.*: <http://bit.ly/2YUsQFg>
4. Agudo. (2002). *Técnicas para la determinación de compuestos antioxidante en alimentos*.
5. Aguirre, F., Medrano, A., González, G., López, J., Álvarez, E., Rosa, L. d., y otros. (30 de Enero de 2015). *Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud*. Recuperado el 12 de Enero de 2019, de *Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud.*: <http://bit.ly/2LtYvKL>
6. Alomar, F. (2010). *Antioxidantes*. Recuperado el 27 de Noviembre de 2018, de *Antioxidantes* : <http://bit.ly/2JHWN4U>
7. Ávila, R., Navarro, A., Vera, O., Dávila, R., Melgoza, N., & Meza, R. (2011). Romero (*Rosmarinus officinalis* L.) una revisión de sus usos no culinarios. *Ciencia y Mar*, 23-36.

8. Balawi, A. W. (2008). *Neurophysiological study on possible protective effect of rosemary leaves extract in male albino rats treated with acrylamide*. Journal of Scientific Research.
9. Barni, Fantanals, & Moreno. (2009). Estudio de la eficacia antibiótica de un extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L., contra *Staphylococcus aureus* en dos modelos de infección en piel de ratón. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 219-233.
10. Barrera, Parra, & Cuca. (2014). *Caracterización química del aceite esencial de la especie rutaceae*. Recuperado el 13 de Enero de 2019, de Caracterización química del aceite esencial de la especie rutaceae: <http://bit.ly/2Z0iCmI>
11. Bastias, J., & Cepero, Y. (2017). La vitamina C como un eficaz micronutriente en la fortificación de alimentos. *Redalyc*, 81-86.
12. Berrington, D., & Lall, N. (2012). Anticancer Activity of Certain Herbs and Spices on the Cervical Epithelial Carcinoma (HeLa) Cell Line. *Hindawi Publishing Corporation*.
13. Bueno, M. (2014). *Aditivos antioxidantes*. Recuperado el 26 de Noviembre de 2018, de Aditivos antioxidantes: <http://bit.ly/2Lu3XNI>
14. Carbonel, K., blanco, S., & Arnao, I. (2016). Características fisicoquímicas y capacidad antioxidante in vitro del extracto de *Gentianella nitida*. *Revistas de Investigación UNMSM*.
15. Carrión, V., & García, R. (2010). *Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia metódica*. Recuperado el 25 de Noviembre de 2018, de Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia metódica.: [//bit.ly/2ZMnV9g](http://bit.ly/2ZMnV9g)

16. Chaves, N., Sosa, T., & Valares, C. (Mayo de 2011). Variación del metabolismo secundario en plantas debido al genotipo y al ambiente. Badajoz, España. Recuperado el 17 de Enero de 2019, de Variación del metabolismo secundario en plantas debido al genotipo y al ambiente.: <http://bit.ly/2XYTStG>
17. Chávez. (2004). Capacidad antioxidante de compuestos bioactivos. *UNALM*.
18. Chávez, C. (26 de Noviembre de 2014). *Metabolismo de las plantas*. Recuperado el 17 de Enero de 2019, de Metabolismo de las plantas: <http://bit.ly/2O3Pydf>
19. Chipault, J. (1952). *The antioxidant properties of spices in foods*.
20. Contreras, G., Matamoros, R., & Venegas., R. (2012). *Guía de criterios Organoléuticos*. Recuperado el 12 de Enero de 2019, de Guía de criterios Organoléuticos: <http://bit.ly/32wnwKF>
21. Coronado, M. (Junio de 2015). *Antioxidantes: Perspectiva actual para la salud humana*. Recuperado el 27 de Noviembre de 2018, de Antioxidantes: Perspectiva actual para la salud humana: <http://bit.ly/2SnoZOE>
22. Cortés, M., & Guzmán, L. (2011). *Reconocimiento y separación de alcaloides presentes en hojas de borrachero*. Recuperado el 13 de Enero de 2019, de Reconocimiento y separación de alcaloides presentes en hojas de borrachero.: <http://bit.ly/2GhJ4kH>
23. Deng, J., Cheng, W., & Yang, G. (2011). A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. . *Food Chemistry*, 1430-1435.
24. Dermocosmetic Institute. (2017). *BHA. Butilhidroxianisol*. Recuperado el 12 de Enero de 2018, de BHA. Butilhidroxianisol: <http://bit.ly/2YZ6p1P>
25. Dominguez. (1982). *Química Orgánica Experimental*. México: Limusa.

26. Estrada, S. (2010). *Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de Romero (Rosmarinus officinalis L.) y Tomillo (Thymus vulgaris)*. Recuperado el 28 de Junio de 2019, de <http://bit.ly/2plKzIK>
27. Erkan, A. (2008). Antioxidant activities of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) extract (Blackseed (Nigella Sativa L.) essential oil, carnosic acid, rosmarínico acid and sesamol. *Food Chemistry*.
28. Escamilla, I., Cuevas, E., & Guevara, J. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Medigraphic*.
29. Flavorix. (2012). *Antioxidantes*. Recuperado el 26 de Noviembre de 2018, de Antioxidantes: <http://bit.ly/2Sluqh7>
30. Fonnegra, R. (2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Colombia: Universidad de Antioquia.
31. Foy-Valencia, E., Mac-Donald, D., Cuyos, M., & Dueñas, R. (2005). Extracción, identificación y evaluación de saponinas en Agaricus bisporus. *Biotempo*.
32. Gad, A., & Sayd, A. (Enero de 2015). *Antioxidant Properties of Rosemary and Its Potential Uses as Natural Antioxidant in dairy products*. Recuperado el 17 de Enero de 2019, de Antioxidant Properties of Rosemary and Its Potential Uses as Natural Antioxidant in dairy products: <http://bit.ly/2NZKOoT>
33. Genena, Hense, Smania, & Machado. (Junio de 2008). *Rosemary (Rosmarinus officinalis) a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtain with supercritical carbon dioxide*. Recuperado el 17 de Enero de 2019, de Rosemary (Rosmarinus officinalis) a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtain with supercritical carbon dioxide.: <http://bit.ly/2Lsctg4>



34. González, M. (2013). *Guía técnica del cultivo de romero (Rosmarinus officinalis L.)*. México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
35. Gutiérrez, D., Ortiz, A., & Mendoza., A. (24 de Octubre de 2008). *Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas*. Recuperado el 13 de Enero de 2019, de Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas.: <http://bit.ly/2xRa2ec>
36. Herráiz. (2009). Guía de plantas medicinales del Magreb. *Cuadernos de la fundación Dr. Antonio Esteve*.
37. Hicks, J., Torres, Y., & Sierra, M. (2006). Estrés Antioxidante. *Medigraphic*, 223-226.
38. Hidalgo, C. (2015). *Métodos generales de extracción y purificación de principios activos de drogas*. Recuperado el 27 de Junio de 2019, de Métodos generales de extracción y purificación de principios activos de drogas: <http://bit.ly/2Y0639U>
39. Laber . (18 de Octubre de 2017). *Los efectos del aditivo E-321 y cómo nos afecta*. Recuperado el 12 de Enero de 2019, de Los efectos del aditivo E-321 y cómo nos afecta: <http://bit.ly/2YXQh0w>
40. Lin, & Chen. (2006). Emulsification characteristics of three and two phase emulsions prepared by the ultrasonic emulsification method. *Fuel Processing Technology*.
41. López, M. T. (Julio de 2008). El romero. Planta aromática con efectos antioxidantes. Brasil.
42. López, T. (2008). El romero. Planta aromática con efectos antioxidantes . *Elsevier*, 11-92.

43. Martínez. (2004). Actividad diurética y antipirética de un extracto fluido de un extracto fluido de *Rosmarinus officinalis*. *Revista Cubana de* .
44. Mezza, G., Borgarello, A., Grosso, N., Fernandez, H., Pramparo, M., & Gayola., M. (Marzo de 2018). *Antioxidant activity of rosemary essential oil fractions obtained by molecular distillation and their effect on oxidative stability of sunflower oil*. Recuperado el 17 de Enero de 2019, de Antioxidant activity of rosemary essential oil fractions obtained by molecular distillation and their effect on oxidative stability of sunflower oil: <http://bit.ly/2YZm2Gp>
45. Mierlici, I. (2009). *Phytochemical study of some active principles with antioxidant action from the Rosmarious officinalis and Salvia officinalis*. Italia: Analele stiintifice ale Universitatii AlexandruIoan.
46. Morales, R. (2014). Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. *Flora Ibérica*, 327-331.
47. Muñoz, L. (2002). *Plantas medicinales españolas, Rosmarinus officinalis L*. Madrid.
48. Musa, C. &. (2008). Composición química y actividad antifúngica del Romero. *Revista Internacional de ciencia y nutrición de alimentos*.
49. Noriega, P., Aldana, C., & Guayasamín, L. (Enero de 2014). *Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos (alcohólico y acuoso) de las hojas de ficus citrifolia y caracterización química de los polifenoles*. Recuperado el 18 de Junio de 2019, de Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos (alcohólico y acuoso) de las hojas de ficus citrifolia y caracterización química de los polifenoles.: <http://bit.ly/2JF2v97>

50. Ortiz, Y. (2016). Aprovechamiento de la actividad antioxidante de extractos y aceites esenciales de romero, tomillo y menta como aditivo funcional en aceites esenciales. Bogotá, Colombia.
51. Palacios, M. I. (2013). *Farmacognosia y Fitoquímica*. Recuperado el 13 de Enero de 2019, de Farmacognosia y Fitoquímica: <http://bit.ly/2LsJXv0>
52. Pastene. (2009). Estado actual de la búsqueda de plantas con actividad antioxidante. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*.
53. Peñarrieta, M., Tejada, L., Mollideno, P., Vila, J., & Bravo., J. (31 de Diciembre de 2014). *PHENOLIC COMPOUNDS IN FOOD*. Recuperado el 12 de Enero de 2019, de PHENOLIC COMPOUNDS IN FOOD: <http://bit.ly/2Lt4peZ>
54. Pérez. (2015). *Alcaloides y compuestos nitrogenados*. Recuperado el 09 de Febrero de 2019, de Alcaloides y compuestos nitrogenados: <http://bit.ly/2Z0iROL>
55. Piña, E. (2007). *Los radicales libres*. Recuperado el 12 de Enero de 2019, de Los radicales libres: <http://bit.ly/2Y9LzQ6>
56. Pires, Munekata, Villanueva, Tonin, Baldin, Rocha, y otros. (2017). *The Antioxidant Capacity of Rosemary and Green Tea Extracts to Replace the Carcinogenic Antioxidant (BHA) in Chicken Burgers*. Recuperado el 17 de Enero de 2019, de The Antioxidant Capacity of Rosemary and Green Tea Extracts to Replace the Carcinogenic Antioxidant (BHA) in Chicken Burgers: <http://bit.ly/2LsaGaU>
57. Quispe, R. (2001). *Obtención del extracto de romero (Rosmarinus Officinalis L.) y su aplicación como antioxidante en chuleta de cerdo.* . Recuperado el 18 de

- Junio de 2019, de Obtención del extracto de romero (*Rosmarinus Officinalis L.*) y su aplicación como antioxidante en chuleta de cerdo. : <http://bit.ly/2nWQV10>
58. Quizhpe, A. (27 de Septiembre de 2016). *Metabolismo primario y secundario*. Recuperado el 26 de Junio de 2019, de Metabolismo primario y secundario: <http://bit.ly/2Y07bua>
59. Rašković, A., Milanović, I., Pavlović, N., Čebović, T., Vukmirović, S., & Mikov, M. (07 de Julio de 2014). *Antioxidant activity of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) essential oil and its hepatoprotective potential*. Recuperado el 17 de Enero de 2019, de Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) essential oil and its hepatoprotective potential: <http://bit.ly/2Ygl7Ei>
60. Sánchez, V., Villalobos, V., Arguedas, E., & Monge., A. (2018). *ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DEL ÁCIDO CAFEICO* . Recuperado el 12 de Enero de 2019, de ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DEL ÁCIDO CAFEICO : <http://bit.ly/2LpCs7O>
61. Santamaría, C., Astorga, F., & Martín-González, A. (2015). Extractos vegetales: uso en la reducción del estrés. *Nutrinews*, 75-78.
62. Scartezzini, P., Antognoni, F., Raggi, M., Poli, F., & Sabbioni., C. (2006). Vitamin C content and antioxidant activity of the fruit and of the Ayurvedic preparation of *Emblica officinalis Gaertn.* *Journal of Ethnopharmacology*.
63. Silva, M., & Noriega, P. (Enero de 2018). *Valoración de las especies Ilex guayusa (GUAYUSA) y Plukenetia volubilis L. (SACHA INCHI), como una materia prima cosmética antioxidante*. Recuperado el 16 de Junio de 2019, de Valoración de las especies *Ilex guayusa (GUAYUSA)* y *Plukenetia volubilis L. (SACHA INCHI)*, como una materia prima cosmética antioxidante.: <http://bit.ly/2oBJ5d4>

64. Sociedad Española de Medicina Estética. (01 de Octubre de 2013). *Cosméticos ocasionarían daños en la piel*. Recuperado el 18 de Enero de 2019, de Cosméticos ocasionarían daños en la piel: <http://bit.ly/2LqWpLx>
65. Sousa, D., Talita, & Conceição., M. (2007). *Atividade antibacteriana do alecrim (Rosmarinus officinalis L.)*. Brasil.
66. UMSNH. (23 de Agosto de 2008). *Metabolitos primarios de las plantas*. Recuperado el 17 de Enero de 2019, de Metabolitos primarios de las plantas.: <http://bit.ly/2JDyvu3>
67. UNESCO. (2014). *Alimentos: Historia, presente y futuro*. Recuperado el 26 de Noviembre de 2018, de Alimentos: Historia, presente y futuro.: <http://bit.ly/2Yd4mtK>
68. Vergara, Cueva, Loor, Pomagualli, & López. (07 de Agosto de 2016). *Evaluación del Extracto de Romero con el Aceite de Oliva como conservante natural en una mortadela especial*. Recuperado el 17 de Enero de 2019, de Evaluación del Extracto de Romero con el Aceite de Oliva como conservante natural en una mortadela especial: <http://bit.ly/2LXR8dP>
69. Vitafor, L. (s.f.). *Antioxidantes*. Recuperado el 26 de Noviembre de 2018, de Antioxidantes: <http://bit.ly/2XNEx45>
70. Viteri, S., & Nuñez, A. (23 de Abril de 2016). *El Ecuador es el hogar de más de 25 mil distintas especies de flores*. Recuperado el 17 de Enero de 2019, de El Ecuador es el hogar de más de 25 mil distintas especies de flores: <http://bit.ly/2GhESkQ>
71. Wandersleben, B. (2016). *Técnicas de separación*. Recuperado el 17 de Enero de 2019, de Técnicas de separación: <http://bit.ly/30yAq8W>

72. Williamson, R. (03 de Octubre de 2014). *La Oxidación Química*. Recuperado el 12 de Enero de 2019, de La Oxidación Química: <http://bit.ly/32AH7sU>
73. Zaccarelli, F., & Galhardi, A. (01 de Agosto de 2006). *Extracto de Romero*. Recuperado el 17 de Enero de 2019, de Extracto de Romero: <http://bit.ly/2xRloPd>

# ANEXOS

## Anexo 1. Lista de abreviaturas

<b>AG</b>	Ácido Gálico
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
<b>g</b>	Gramos
<b>mL</b>	Mililitro
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>uL</b>	Micro litro
<b>°C</b>	Celsius
<b>ROS</b>	Especies Reactivas del Oxígeno
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración necesaria para disminuir en un 50% la actividad antioxidante

## Anexo 2. Elaboración de extractos



*Figura 9.* Pesaje de romero (*Rosmarinus Officinalis L.*)

Fuente: Autora



*Figura 10.* Extractos de Romero (*Rosmarinus Officinalis L.*)

Fuente: Autora





*Figura 11.* Extracto etanólico en rotavapor

Fuente: Autora



*Figura 12.* Extracto etanólico de Romero (*Rosmarinus officinalis* L.)

Fuente: Autora



*Figura 13. Extracto acuoso de Romero (Rosmarinus officinalis L.)*

Fuente: Autora

### Anexo 3. Preparación de diluciones.



*Figura 14.* Dilución de ácido ascórbico.

Fuente: Autora



*Figura 15.* Dilución del extracto acuoso.

Fuente: Autora

## Anexo 4. Método DPPH



*Figura 16.* Celdas con muestras para método DPPH

Fuente: Autora



*Figura 17.* Espectrofotómetro UV

Fuente: Autor

