



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

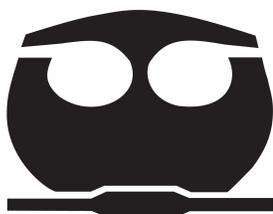
OBTENCIÓN DE COMPUESTOS ANTIMICOBACTERIANOS A
PARTIR DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Rosmarinus*
officinalis

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

RICARDO ALFONSO GONZÁLEZ HERNÁNDEZ



México, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MISAEL GONZÁLEZ IBARRA

VOCAL: Profesor: ROGELIO GREGORIO PEREDA MIRANDA

SECRETARIO: Profesor: MARÍA ADELINA JIMÉNEZ ARELLANES

1er. SUPLENTE: Profesor: ROSALÍA GUEVARA LEONEL

2° SUPLENTE: Profesor: JOSÉ CORDERO HERNÁNDEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN FARMACOLOGÍA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES. CMN SIGLO XXI, IMSS

ASESOR DEL TEMA: **DRA. MARÍA ADELINA JIMÉNEZ ARELLANES**

SUSTENTANTE (S): **RICARDO ALFONSO GONZÁLEZ HERNÁNDEZ**

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Ma. Adelina Jiménez Arellanes**; por todo su apoyo, paciencia, enseñanzas, exigencias, sus consejos y por todo el tiempo dedicado para la realización de este trabajo, le estoy profundamente agradecido.

A los miembros del H. Jurado: **Dr. Misael González Ibarra**, **Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda** por su tiempo y atinadas observaciones para corregir este trabajo, así como también a la **Dra. Rosalía Guevara Leonel** y al **Q.F.B. José Cordero Hernández**.

Un agradecimiento especial a la **Dra. Julieta Luna** por su ayuda para llevar a cabo la evaluación de actividad antimicrobiana y a la **Dra. Liliana Yépez** por su colaboración en la evaluación de la actividad antiprotzoaria.

A **mis padres Ricardo González Arredondo y Carmen Hernández Leonides**, por su cariño, comprensión, por su apoyo incondicional y todas sus enseñanzas, ya que todo lo que he logrado es gracias a ellos. No encuentro palabras suficientes para expresarles lo agradecido que estoy y el inmenso cariño que tengo por ustedes. Les dedico esta Tesis, ya que a ustedes les debo todo. ¡Muchas Gracias por todo!

A **mi hermana Brenda** que siempre me ha demostrado que cuento con ella, y que siempre hace mis días alegres con sus ocurrencias, ¡eres la mejor hermana del mundo!

Muchas gracias **Cristal** por tu compañía todo este tiempo, por ayudarme a superar las situaciones difíciles y compartir conmigo los momentos alegres. Tu sabes lo importante que eres para mí, ¡Te quiero mucho!

A mis mejores amigos **Allan e Ismael**, con quienes he pasado momentos memorables, y me han apoyado en los momentos difíciles dentro y fuera de la facultad. Les agradezco mucho por brindarme su amistad y sé que cuento con ustedes incondicionalmente.

ÍNDICE

	Página
ANTECEDENTES	1
Antecedentes botánicos y etnobotánicos de <i>R. officinalis</i>	1
Antecedentes de investigaciones biológicas y químicas de <i>R. officinalis</i>	2
La tuberculosis como problema de salud	7
Las plantas medicinales como fuente de compuestos antimicobacterianos.	9
JUSTIFICACIÓN	12
OBJETIVOS GENERALES	13
OBJETIVOS PARTICULARES	13
METODOLOGÍA	14
Procedimiento General	14
Extracciones del extracto crudo	14
Fraccionamiento primario del extracto CHCl ₃ por Cromatografía en Columna Fase Normal	16
Purificación de la mezcla de triterpenos AU/AO	17
Purificación de la mezcla α y β -amirina	18
Hidrólisis del extracto MeOH	18
Fraccionamiento primario del producto de hidrólisis del extracto MeOH Cromatografía en Columna Fase Normal.	19

Evaluación de la actividad antimicobacteriana	20
Evaluación de la actividad antiprotozoaria	22
Determinación del contenido de polifenoles totales	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	26
CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS	42
ANEXO	50

LISTA DE ABREVIATURAS.

°C	grados Celsius	DPPH	2, 2-difenil-1-picrilhidrazilo
%	porcentaje	EtOH	etanol
λ	longitud de onda	g	gramo
AADC	amino ácido descarboxilasa	h	hora
AcCh	acetil colina	H ₂ O	agua
AcOEt	acetato de etilo	H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
AO	ácido oleanólico	H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
AU	ácido ursólico	HCl	ácido clorhídrico
BHT	butilhidroxitolueno	Hex	hexano
CC	cromatografía en columna	HPLC	cromatografía de líquidos de alta eficiencia
ccf	cromatografía capa fina	IC ₅₀	concentración inhibitoria media
CHCl ₃	cloroformo	L	litro
CH ₂ Cl ₂	diclorometano	IL-1 β	ínter leucina 1-beta
CH ₃ CN	acetonitrilo	IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
CH ₃ OH	metanol	M	concentración Molar
c/u	cada uno	MABA	micrométodo colorimétrico de alamar azul.
cm	centímetro	MeOH	metanol
CM ₁₀₀	concentración mínima cien	MFR	multifármaco resistente
CMI	concentración mínima inhibitoria	μ g	microgramo
CO ₂	dióxido de carbono	mg	miligramo
COX1	ciclooxigenasa-1	μ g/mL	microgramo por mililitro
COX2	ciclooxigenasa-2	mg/L	miligramos por litro
DM	<i>diabetes mellitus</i>		
DMSO	dimetilsulfóxido		

min	minutos	R _f	factor de retención
μL	microlitro	RMN- ¹ H	resonancia magnética nuclear de protones
mL	mililitro	ROS	especies reactivas de oxígeno
mm	milímetros	R _T	Tiempo de retención
msnm	metros sobre nivel del mar	SIDA	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
m/v	masa/volumen	TAES	Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado
nm	nanómetros	Tb	tuberculosis
Na ₂ CO ₃	Bicarbonato de sodio	TNF-α	factor de necrosis tumoral alfa
NO	óxido nítrico	TH	tirosin hidroxilasa
NOS	óxido nítrico sintasa	UICTEP	Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Pulmonares
NP	difenilboriloxietilamina	UFC	unidades formadoras de colonias
OMS	Organización Mundial de la Salud	UV	ultravioleta
PEG	polietilenglicol	VIH	virus de inmunodeficiencia humana
p.f.	punto de fusión	XFR	extremadamente fármaco resistente
PMA	acetato de 4β-forbol-12-miristato		
PNT	Programa Nacional para la prevención y control de la tuberculosis		
PT	Polifenoles totales		
Q3r	quercetina 3 ramnósido		
RA	reactivo analítico		
R-I	resistente a isoniazida		
R-S	resistente a estreptomina		
R-R	resistente a rifampicina		

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1.- Fraccionamiento primario de extracto clorofórmico de <i>Rosmarinus officinalis</i> .	17
Tabla 2.- Fraccionamiento primario de la hidrólisis del lavado metanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> .	20
Tabla 3.- Curvas patrón para determinación de polifenoles totales.	23
Tabla 4.- Rendimiento de los lavados del extracto MeOH de las partes aéreas de <i>R. officinalis</i>	26
Tabla 5.- Compuestos detectados en las fracciones primarias del lavado CHCl ₃ por CC-FN	27
Tabla 6.- Cromatografía en capa fina para la detección de compuestos flavonoides en las fracciones polares	28
Tabla 7.- Compuestos detectados en fraccionamiento primario del producto de hidrólisis del lavado MeOH.	32
Tabla 8.- Resultados de actividad antimicobacteriana contra cepas tuberculosas	35
Tabla 9.- Resultados de actividad antimicobacteriana contra cepas no tuberculosas.	37
Tabla 10.- Resultados de actividad antiprotozoaria.	38
Tabla 11.- Absorbancia de las muestras evaluadas para actividad antioxidante.	40
Tabla 12.- Resultado de cuantificación de polifenoles totales en las muestras.	40

ÍNDICE GRÁFICAS.

	Página
Gráfica 1.- Curva patrón quercetina.	23
Gráfica 2.- Curva patrón catequina.	24
Gráfica 3.- Curva patrón epicatequina.	24
Gráfica 4.- Curva patrón catecol.	24

ÍNDICE FIGURAS.

	Página
Figura 1.- Compuestos identificados en el fraccionamiento primario del residuo de los lavados clorofórmicos	29
Figura 2.- Compuestos identificados en el fraccionamiento del producto de hidrólisis	33

ÍNDICE ESPECTROS.

	Páginas.
Espectro 1.- Resonancia magnética nuclear protónica (RMN- ¹ H) de la mezcla de referencia AU/AO 1:1 (SIGMA).	50
Espectro 2.- Resonancia magnética nuclear protónica (RMN- ¹ H) de la mezcla de AU/AO 2:1 obtenida de <i>R. officinalis</i> .	51
Espectro 3.- Resonancia magnética nuclear protónica (RMN- ¹ H) de la mezcla de AU/AO/ β -sitosterol obtenida de <i>R. officinalis</i> .	52
Espectro 4.- Cromatograma de HPLC de la fracción 58-70, para detección de flavonoides.	53

ANTECEDENTES.

Antecedentes botánicos y etnobotánicos de *Rosmarinus officinalis*.

Rosmarinus officinalis es una planta de la familia Lamiaceae, que tiene su origen en la región de la cuenca del mediterráneo, en climas cálidos, semicálidos, semiseco y templado, capaz de crecer en suelos arcillosos y semiáridos desde los 899 a los 3900 msnm y no es muy exigente para su desarrollo. En México se encuentra ampliamente distribuida dentro de todo el territorio nacional, pero principalmente en la zona central del país. Es un arbusto de 1 a 1.5 metros de altura, perenne, es ramificado y tiene el tallo cuadrado. Las hojas son opuestas y sin soporte (sésiles), angostas como agujas, color verde en el anverso y blanquecinas en el reverso (**Gúzman, 2011; Villegas, 2011**).

El romero es empleado tradicionalmente como una especia para condimentar alimentos. Sin embargo, también ha sido utilizado en la medicina tradicional desde la antigüedad para el tratamiento de malestares del aparato digestivo como dolor de estómago, diarrea, gastritis y colitis. En Oaxaca, se emplea para tratar casos en los que la placenta es retenida después del parto, así como para realizar lavados después de éste para evitar infecciones. También, se emplea para los cólicos menstruales. En la región central del país (Hidalgo, Michoacán, Morelos, Puebla), de igual manera se emplea para tratar infecciones vaginales, así como de padecimientos respiratorios como catarros, tos, bronquitis y tos ferina. Otros usos medicinales que se le dan a esta planta son: en casos de várices, hemorroides, problemas cardiacos, agotamiento, calentura, cicatrización de heridas, mareos, jaqueca, caída de mullera, ataques epilépticos, enfriamiento de ojos, cólicos y contra parásitos intestinales. Las partes mayormente empleadas son las ramas (**Gúzman, 2011; Villegas, 2011**).

Antecedentes de investigaciones químicas y biológicas.

En la literatura se describe que la familia Lamiaceae está compuesta por especies que biosintetizan una gran variedad de compuestos fenólicos, los cuales representan una fuente importante de antioxidantes naturales, compuestos que están involucrados en el control de especies reactivas de oxígeno. En especial *R. officinalis* biosintetiza muchas de estas sustancias, principalmente, ácido caféico y derivados de éste, como el ácido rosmarínico, además de diterpenos como ácido carnósico, carnosol que son los principales compuestos involucrados con su actividad antioxidante y antimicrobiana (**Moreno et al., 2006**); también se ha demostrado actividad sobre diversas líneas celulares para este tipo de compuestos (**Yesil-Celiktas et al., 2010**).

Se han realizado numerosas investigaciones sobre la composición química de diversos extractos de *R. officinalis*, tales como extractos obtenidos mediante el uso de fluido supercrítico con metanol (MeOH) y mezclas hidroalcohólicas, así como, del aceite esencial de esta planta. Del aceite esencial de las ramas, se han identificado varios compuestos siendo mayoritarios: α -pineno; 1, 8-cineol, alcanfor, borneol; α -tirpeneol, limoneno, acetato de bornilo, verbenona entre otros (**Jiang et al., 2011; Leal et al., 2003; Martínez-Velázquez et al., 2011; Pintore et al., 2009; Zaouali et al., 2010**). De los extractos polares de las partes aéreas se han aislado triterpenos como el ácido betulínico, ácido micromérico, ácido oleanólico y ácido ursólico (**Abe et al., 2002; Altinier et al., 2007; Bernardes et al., 2010; Guzmán, 2011; Ibarra et al., 2010; Martínez et al., 2012; Mulinacci et al., 2011**) y diversos compuestos fenólicos de los cuales una buena parte son flavonoides: 6''-O-(E)-feruloilhomoplantaginina, 6''-O-(E)-feruloilnepitrina, 6''-O-(E)-p-coumaroilnepitrina; 6-metoxiluteonina 7-O- β -D-glucopiranosido, lutionina-3'-O- β -D-glucorónido, lutionina-3'-O-(3''-O-acetil)- β -D-glucorónido, lutionina-3'-O-(4''-O-acetil)- β -D-glucorónido, hesperidina, hispidulina, campferol, luteolina, genkwanina y ladaneina, y otros compuestos fenólicos como carnosol, ácido carnósico, ácido rosmarínico, 1-O-feruloil- β -D-glucopiranososa detectados en extractos obtenidos con etanol (EtOH) al

96%, MeOH y acetona (**Bai et al., 2010; Moreno et al., 2006; Mulinacci et al., 2011; Okamura et al., 1994, Yesil-Celiktas et al., 2007**). Además, se ha detectado la presencia de α y β -amirina, apigenina, diosmetina, ácido caféico, ácido clorogénico, rosmadial, rosmanol, genkwanina, homoplantaginina, escutellareina y cirsimaritina (**Borrás-Linares et al., 2011; Villegas, 2011**).

La especie *R. officinalis* ha sido objeto de diversas investigaciones biológicas, destacando entre ellas la actividad antimicrobiana tanto de extractos polares (MeOH) como del aceite esencial (**Bernardes et al., 2010; Bozin et al., 2007; Centeno et al., 2010; Genena et al., 2008; Höfling et al., 2010; Jiang et al., 2011; Moreno et al., 2006; Oluwatuyi et al., 2004; Pintore et al., 2009; Toroglu, 2011; Weerakkody et al., 2011a, 2011b; Yesil-Celiktas et al., 2005; Zaouali et al., 2010**). La actividad antimicrobiana que presentan los extractos de *R. officinalis* ha propiciado que cobre relevancia en la actualidad debido a que es necesario conocer nuevas alternativas para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos, sobre todo para aquellos que han desarrollado resistencia a diversos antibióticos. **Oluwatuyi** y colaboradores (**2004**) evaluaron la actividad antibacteriana del extracto clorofórmico (CHCl_3) de *R. officinalis*, en el cual los ácido carnósico, ácido rosmarínico y carnosol fueron los compuestos responsables de la actividad antibacteriana mostrada por el extracto, cuya concentración mínima inhibitoria (CMI) fue en el rango de 16 a 64 $\mu\text{g/mL}$ contra *Staphylococcus aureus* (RN4220) y *S. aureus* (XU212). Estos compuestos también resultaron activos contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis* (CMI = 60 $\mu\text{g/mL}$), *Staphylococcus aureus* (CMI = 2 $\mu\text{g/mL}$) y *Candida albicans* (CMI = 4 $\mu\text{g/mL}$) (**Moreno et al., 2006; Oluwatuyi et al., 2004**). Asimismo, se ha evaluado el efecto sinérgico y/o antagonista que presenta el aceite esencial de romero en presencia de tres antibióticos (gentamicina, cefalotina y ceftriaxona) contra 13 especies de bacterias (**Toroglu, 2011**), el estudio revela que con 2 μl del aceite esencial se inhibe el crecimiento de todas las bacterias ensayadas y presenta un efecto antagonista cuando se combina con gentamicina; además, observaron un efecto sinérgico contra *S. aureus* cuando se combina cefalotina y el aceite

esencial; también presenta un efecto aditivo cuando se combina aceite esencial de romero con ceftriaxona. En este estudio evaluaron el efecto del aceite esencial contra *Mycobacterium smegmatis* (bacteria de rápido crecimiento), en este caso, 2 µl del aceite inhibe el crecimiento de las micobacterias presentando un halo de inhibición de 8 mm. Otro trabajo describe el efecto antimicobacteriano del extracto EtOH de las partes aéreas de *R. officinalis*, el cual presentó una CMI = 128 µg/mL contra *M. tuberculosis* H37Rv, al ser evaluado por el ensayo MABA (**Leal et al., 2003**).

El extracto MeOH de *R. officinalis* inhibió el crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (CM₁₀₀ = 1000 µg/mL), del extracto activo aislaron la mezcla de ácido ursólico (AU), y ácido oleanólico (AO), los cuales mostraron actividad contra estos epimastigotes, con una CM₁₀₀ = 40 y 250 µg/mL, respectivamente (**Abe et al., 2002**).

Otra actividad biológica que se ha explorado en *R. officinalis* es el efecto antiinflamatorio, en este caso se han evaluado extractos de diversas polaridades y el aceite esencial. Por ejemplo, el extracto EtOH presenta buena actividad antiinflamatoria en modelo de edema plantar inducido con formaldehído y modelo de edema en oreja de ratón (**Borrás-Linares et al., 2011; Cheung y Tai, 2007; Genena et al., 2008; Leal, et al., 2003; Mengoni et al., 2011**), alguno de estos autores atribuyen al carnosol, isocarnosol y ácido carnósico como los compuestos responsables de esta actividad. Por otro lado, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado una potente actividad antiinflamatoria de los extractos de *R. officinalis*, atribuida a compuestos fenólicos y triterpenos (**Altinier et al., 2007; Sinkovic et al., 2011**). Del extracto CHCl₃ se aislaron ácido ursólico, ácido oleanólico y ácido micromérico, los cuales fueron los responsables del efecto antiinflamatorio observado en el extracto, cuyo efecto fue similar a la indometacina en modelo de edema en oreja de ratón inducido con aceite de croton. Otros autores describen que la actividad antiinflamatoria de los extractos alcohólicos de *R. officinalis*, se debe a la presencia de ácido carnósico y carnosol, los cuales son los diterpenos

más abundantes en la planta (**Mengoni et al., 2011**). Estos autores encontraron que estos compuestos reducen la expresión de interleucina 1beta (IL-1 β), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), e inhibe la ciclooxigenasa 2 (COX-2) pero no a la ciclooxigenasa 1 (COX-1) al inducir el proceso inflamatorio con acetato de 4 β -forbol-12-miristato (PMA) en la oreja de ratón y en la línea celular de macrófagos de ratón (RAW 264.7)

Otras actividades biológicas que se describen son: hepatoprotectora al inducir daño con tetracloruro de carbono (CCl₄) y un efecto gastroprotector debido al ácido carnósico. Este efecto es comparable al que mostró el ferruginol, el cual es un diterpeno que presenta un fuerte efecto protector a nivel gastrointestinal (**Altinier et al., 2007; Theoduloz et al., 2011**), antiulcerogénica, diurética (**Borrás-Linares et al., 2011**), antiparasitaria (**Abe et al., 2002**), neuroprotectora en caso de enfermedades neurodegenerativas provocadas por estrés oxidativo y apoptosis (**Park et al., 2010**), antifúngica contra *Aspergillus flavus* y *Aspergillus ochraceus*, siendo útil para el control de estas plagas en alimentos (**Centeno et al., 2010**), antiproliferativa e inhibidores de la angiogénesis (antiangiogénica) *in vitro* e *in vivo* donde el carnosol y ácido carnósico inhiben el crecimiento de células endoteliales y tumorales, por lo que recomiendan el uso de estos dos compuestos en la prevención y tratamiento del cáncer (**Cheung y Tai, 2007; López-Jiménez et al., 2011; Ngo et al., 2011; Yesil-Celiktas et al., 2010**) y antioxidante (**Genena et al., 2008; Sinkovic et al., 2011**). Para los triterpenos aislados de *R. officinalis*, se ha descrito actividad analgésica, el efecto que presentaron los triterpenos es similar al ketorolaco, fármaco empleado como referencia (**Martínez et al., 2012**).

Otro trabajo hecho con la especie es el de **Ventura-Martínez** y colaboradores (**2011**), quienes reportaron la actividad espasmolítica del extracto EtOH significativa sobre ileon de cobayo; este efecto es dependiente de la concentración, al inducir la contracción con cloruro de potasio y acetilcolina (AcCh), obteniendo una concentración inhibitoria 50 (IC₅₀), de 661.06 \pm 155.91 μ g/mL y 464.05 \pm 16.85 μ g/mL, respectivamente.

Recientemente, la unión europea recomendó el uso de extractos y compuestos puros extraídos de romero como antioxidante en alimentos, para erradicar el uso de antioxidantes sintéticos que generan daños a largo plazo. Cabe mencionar que este tipo de compuestos juegan un papel importante en la prevención de una variedad de enfermedades crónico-degenerativas ocasionadas por la presencia de radicales libres y al estrés oxidativo, el cual es resultado del desbalance entre la producción celular de especies reactivas de oxígeno (ROS), y los mecanismos antioxidantes encargados de la remoción de dichos compuestos (**Genena et al., 2008; López-Jiménez et al., 2011; Moreno et al., 2006; Mulinacci et al., 2011; Posadas et al., 2009**). **Genena et al., en el 2008**, realizó una serie de extracciones con fluido supercrítico (CO₂) del romero, modificando las condiciones de temperatura y presión y evaluó la actividad antioxidante mediante el método de captación de radicales, obteniendo como resultado que en las condiciones de 200 bar/40 °C y 300 bar/40 °C del fluido supercrítico, se obtiene la mejor actividad antioxidante (IC₅₀ = 12.85 µg/mL).

Los principales compuestos involucrados en la actividad antioxidante de *R. officinalis* son el ácido carnósico, carnosol y ácido caféico, estos son los más abundantes y están presentes en extractos polares (hidroalcohólicos y acuosos). En este caso, el rosmanol resultó más potente que α-tocoferol (Vitamina E) y BHT. En otro estudio, se evaluó la capacidad antioxidante del extracto etanólico 70% del romero, realizando diluciones 1/10 y 1/5 con agua, estos extractos fueron equivalentes a disoluciones 8.1 y 12.6 µM de Trolox, respectivamente. Los extractos obtenidos de *R. officinalis* presentan mayor efecto antioxidante que los extractos obtenidos de jengibre (*Zingiber officinale*) y cúrcuma (*Curcuma longa*). (**Cheung et al., 2007; Leal et al., 2003; Moreno et al., 2006 ; Posadas et al., 2009**). **Posadas et al., (2009)** realizó un estudio sobre la protección que aportan los extractos de *R. officinalis* frente a radicales libres, empleando ratas Wistar macho con una edad de 20-21 meses. Los extractos fueron obtenidos mediante extracción con fluido supercrítico y las concentraciones empleadas para cada estudio fueron 0.2 y 0.02 % del extracto con 20 % de ácido carnósico cada una de

éstas. Los resultados obtenidos demuestran que los extractos brindan protección sobre la peroxidación lipídica en corteza cerebral e hipocampo. En el corazón disminuye la actividad de la catalasa en los animales tratados con los extractos en comparación a los controles, y también disminuye la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS), y como consecuencia disminuyendo la producción de óxido nítrico (NO).

En un estudio realizado por **Park** y su equipo de trabajo (**2010**), reportan la evaluación del extracto MeOH al 70% de romero para conocer su acción en la protección de células neuronales; como resultado del estudio se observó que el extracto suprime la alta regulación de Bax, Bak, Caspasa-3 y Caspasa-9; y disminuyó la regulación de Bcl-2; además que presentó efecto sobre la regulación de los genes de la tirosin hidroxilasa (TH), y aminoácido aromático decarboxilasa (AADC) en líneas celulares SH-SY5Y, mejorando la regulación sobre dichos genes. Lo que indica que dicho extracto es capaz de proteger a las células neuronales de lesiones inducidas por la oxidación (en el estudio el daño se indujo con H₂O₂), y concluyeron que el uso del extracto de *R. officinalis* puede ser una opción para prevenir el daño neurodegenerativo causado por el estrés oxidativo y apoptosis.

La tuberculosis como problema de salud.

En la actualidad la tuberculosis (Tb) es una enfermedad que ha cobrado gran importancia debido a que aproximadamente una tercera parte de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis* y con riesgo de desarrollar la enfermedad, aproximadamente 10 millones de nuevos casos son reportados cada año y mueren al año aproximadamente 2 millones. Lo que representa una verdadera emergencia y lo que ha centrado la mira en esta enfermedad actualmente, es el incremento en la incidencia de casos multifármacoresistentes (MFR) y extremadamente fármacoresistentes (XFR), siendo los periodos de tratamiento para los casos MFR hasta de 30 meses y para los casos XFR no

existe alternativa de tratamiento y para los casos sensibles el periodo de tratamiento es de 8 meses. Los fármacos de primera y segunda línea empleados para tratar la Tb provocan diversos y severos efectos colaterales, algunos causan hepatotoxicidad y nefrotoxicidad. Los casos MFR son resistentes a rifampicina e isoniazida, dos de los fármacos básicos en el tratamiento de la Tb y el porcentaje de curación es de entre el 50 y 70%, lo que da origen a la aparición de los casos XFR. Los casos XFR son resistentes tanto a los medicamentos de primera (rifampicina e isoniazida) y segunda línea (fluoroquinolonas y a fármacos inyectables –amikacina, kamanicina y capreomicina), y no existe tratamiento específico para estos casos. Estimaciones recientes describen que el 5.4% de casos MFR son XFR (**Adhvaryu y Vakharia, 2011; Koul et al., 2011**). Por otro lado, existen diversos factores de riesgo para desarrollar la Tb como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), diabetes mellitus (DM), artritis reumatoide, cáncer, drogadicción, desnutrición, tratamiento con inmunosupresores, entre otros (**García et al., 2012; Swindells, 2012; Zazueta-Beltrán et al., 2011**). Debido a esto, la Organización Mundial de la Salud (OMS), y la Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Pulmonares (UICTEP) lanzaron el Proyecto Global Antituberculosis y vigilancia de farmacorresistencia en 1994. En México, se han identificado casos de cepas MFR, a pesar de los esfuerzos del Programa Nacional para la prevención y control de la Tb (PNT), basados en la aplicación del programa tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES). Se ha reportado en una encuesta nacional una alta proporción de Tb MFR, que abarca principalmente tres estados de México: Baja California, Oaxaca y Sinaloa (**Zazueta-Beltrán et al., 2011**). La diabetes es uno de los principales factores de riesgo para desarrollar Tb pulmonar. Estudios recientes demuestran que las personas que padecen diabetes tienen 3.1 veces más probabilidad de desarrollar esta enfermedad (**Pérez-Guzmán et al., 2011**) y, debido a que en la actualidad, México se encuentra a la cabeza de los países que presentan elevados casos de diabetes en la población es de suma importancia el desarrollo de nuevas alternativas para el tratamiento de la Tb.

Las plantas medicinales como fuente de compuestos antimicobacterianos.

En la literatura científica se describen numerosos trabajos que describe la actividad antimicobacteriana de extractos y compuestos puros obtenidos de plantas medicinales, muchos de los cuales muestran importante actividad antimicobacteriana (**Cantrell et al., 2001; Copp y Pearce, 2007; García et al., 2012; Pauli et al., 2005**). Algunos metabolitos secundarios con CMI ≤ 25 $\mu\text{g/mL}$ se describen a continuación

Terpenoides:

- Sesquiterpenos activos contra *M. tuberculosis* H37Rv: dihidro- β -agarofurano sesquiterpeno (CMI = 6.2 $\mu\text{g/mL}$); partenólido (CMI = 16 $\mu\text{g/mL}$); dehidrocostuslactona (CMI = 2 $\mu\text{g/mL}$); aromaticina (CMI = 16 $\mu\text{g/mL}$); encelina (CMI = 16 $\mu\text{g/mL}$); 6-*epi*-deacetillaurenobiolido (CMI = 16 $\mu\text{g/mL}$); curcufenol (CMI = 16 $\mu\text{g/mL}$); salasol A (CMI = 28.2 μM); celahina C (CMI = 30.6 μM); orbiculina (CMI = 14.6 μM); triptogelina G-2 (CMI = 26 μM); ramiferina (CMI = 12.7 μM); α -humuleno (CMI = 6.25 $\mu\text{g/mL}$); activos contra cepas de *M. tuberculosis* H37Ra: goyazensolido (CMI = 3.1 $\mu\text{g/mL}$); centraterina (CMI = 3.1 $\mu\text{g/mL}$); licnoforolida B (CMI = 6.2 $\mu\text{g/mL}$); isogoyazensolido (CMI = 1.5 $\mu\text{g/mL}$); isocentraterina (CMI = 3.1 $\mu\text{g/mL}$); 5-*epi*-isogoyazensolido (CMI = 3.1 $\mu\text{g/mL}$); 5-*epi*-isocentraterina (CMI = 3.1 $\mu\text{g/mL}$).
- Diterpenos activos contra *M. tuberculosis* H37Rv: 6 β ,7 α -dihidroiroileanona (CMI = 25 $\mu\text{g/mL}$); horminona (CMI = 25 $\mu\text{g/mL}$); 6,7-dehidroiroilanona (CMI = 25 $\mu\text{g/mL}$); 7 α -acetoxi-6 β -hidroiroileanona (CMI = 25 $\mu\text{g/mL}$); sandracopimara-8(14)-15-dieno-7 α ,18-diol (CMI = 25 $\mu\text{g/mL}$); ácido sandracopimarico (CMI = 15 $\mu\text{g/mL}$); 12-demetilmulticaulina (CMI = 0.46 $\mu\text{g/mL}$); multicaulina (CMI = 5.6 $\mu\text{g/mL}$); 12-demetilmultiortoquinona (CMI = 1.2 $\mu\text{g/mL}$); multiortoquinona (CMI = 2 $\mu\text{g/mL}$); 12-metil-5-dehidrohorminona (CMI = 1.2 $\mu\text{g/mL}$); 12-metil-5-dehidroacetilhorminona (CMI = 0.89 $\mu\text{g/mL}$); salvipimarona (CMI = 7.3 $\mu\text{g/mL}$); salvipimarona (CMI = 7.3 $\mu\text{g/mL}$); 9,12-

ciclomulin-13-ol (CMI = 20 µg/mL); ácido juriperexcelsico (CMI = 14.4 µg/mL); azorellanona (CMI = 6.25 µg/mL); azorellanol (CMI = 12.5 µg/mL); 17-acetoxi-13 α -hidroxiazorellano (CMI = 25 µg/mL); mulinol (CMI = 12.5-25 µg/mL); *ent*-trachiloban-17-al (CMI = 24 µg/mL); ácido kurenoico (CMI = 25 µg/mL); caniojano (CMI = 25 µg/mL); geranilgeraniol (CMI = 1.56 µg/mL); *E*-fitol (CMI = 2 µg/mL); escobarina A (CMI = 25 µg/mL); escobarina B (CMI = 12.5 µg/mL).

- Triterpenos activos contra *M. tuberculosis* H37Rv: ácido bonianico A (CMI = 34.8 µM); ácido bonianico B (CMI = 9.9 µM); 12 β - hidroxikulactona (CMI = 16 µg/mL); 6 β -hidroxikulactona (CMI = 4.0 µg/mL); kulonato (CMI = 16 µg/mL); (24*R*)-24,25-epoxycicloartan-3-ona (CMI = 8.0 µg/mL); (3 β ,24*R*)-24,25-epoxycicloartan-3-ol (CMI = 8.0 µg/mL); zeorina (CMI = 8.0 µg/mL); ácido 3-epioleanolico (CMI = 16 µg/mL); eritodiol (CMI = 16 µg/mL); ácido oleanonico (CMI = 16 µg/mL); lupeol (CMI= 16 µg/mL) contra cepas H37Ra: azdiradiona (CMI = 25 µg/mL); epoxiazadiradiona (CMI=25 µg/mL); hopazo-6 β ,11 α ,22,27-tetraol (CMI = 52µM); azadiradiona (CMI = 6.25 µg/mL); epoxyzadiradiona (CMI = 25 µg/mL); aegicerina (CMI = 25 µg/mL).

Esteroides activos contra la cepa H37Rv: peróxido de ergosterol (CMI = 3.5 µM); β -sitostenona(CMI = 39.5 µM); ergosterol-5,8-endoperóxido (CMI = 1.0 µg/mL); epidioxisterol (CMI = 16 µg/mL); paguesterol A (CMI = 7.8 µg/mL); paguesterol B (CMI = 11.2 µg/mL), aunque los últimos dos muestran una considerable toxicidad en células Vero (IC₅₀ = 52 µg/mL)

Alcaloides activos contra *M. tuberculosis* H37Rv: Ambiguina K, L, M, N (CMI=6.6, 11.7, 7.5 y 46.7 µM, respectivamente); ambigüina C isonitrlo (CMI = 7 µg/mL); ambigüina E isonitrlo (CMI = 21 µg/mL); ambigüina I isonitrlo (CMI = 13.1 µg/mL); hapalindola G (CMI = 6.8 µg/mL); fishambigüina G (CMI = 2 µg/mL); monamfilectina A (CMI = 15.3 µg/mL); 8,15-diisociano-11(20)-amfilecteno (CMI = 2 µg/mL); neopetrosiamina A (CMI=7.5 µg/mL); ascididemina (CMI=0.35 µg/mL); diplamina (CMI = 17 µg/mL); isodiplamina (CMI = 17 µg/mL); lissoclinidina (CMI =

17 µg/mL); himenidina (CMI = 6.1 µg/mL); (-)-8-hidroxi manzamina A (CMI = 0.91 µg/mL); (-)-manzamina F (CMI = 12.5 µg/mL); manzamina A (CMI = 1.56 µg/mL); (+)-8-hidromanzamina A (CMI = 6.25 µg/mL); graveolinina (CMI = 16 µg/mL); kokusagina (CMI = 16 µg/mL); ciclosteletaminas A, B, C, D, E, F (CMI = 4, 4, 8, 11 y 8 µg/mL respectivamente); hirsutelona F (CMI = 3.12 µg/mL); 7-hidroxi muconal (CMI = 25 µg/mL); liriodenina (CMI = 12.5 µg/mL)

Flavonoides activos contra *M. tuberculosis* H37Ra: Khonkloginol H (CMI = 25 µg/mL); lupinifolinol (CMI = 25 µg/mL); dehidrolupinifolinol (CMI = 12.5 µg/mL); flemichina (CMI = 12.5 µg/mL); eriosemanona A (CMI = 12.5 µg/mL); lupinifolina (CMI = 12.5 µg/mL); pinatina (CMI = 12.5 µg/mL); pinocembrina (CMI = 12.5 µg/mL).

Lignanós y otros fenoles activos contra *M. tuberculosis* H37Rv: beilschmina A (CMI = 2.5 µg/mL); beilschmina B (CMI = 7.5 µg/mL); feruloiltiramina (CMI = 1.6 µg/mL); metil ester del ácido caféico (CMI = 25 µg/mL); licarina A (CMI = 25 µg/mL); licarina B (CMI = 50 µg/mL); eupomatenoide-7 (CMI = 25 µg/mL).

Policetidos activos contra *M. tuberculosis* H37Rv: ehreti quinona (CMI = 25 µg/mL); rumexneposido A (CMI = 20.7 µM); toracrisona-8-O-β-D-glucopiranosido (CMI = 8.9 µM); engelharquinona (CMI = 20 µg/mL); 3-metoxijuglona (CMI = 3.125 µg/mL); α-tocoferilquinona (CMI = 25 µg/mL); benzoquinona globiferina (CMI = 6.2 µg/mL); cordiacromo C y B (CMI = 1.5 y 12.5 µg/mL, respectivamente). (**García et al., 2012**)

Recientemente nuestro grupo de trabajo encontró que la mezcla de ácido ursólico/ácido oleanólico obtenido de especies como *Thymus vulgaris*, *Bouvardia ternifolia*, muestra actividad antimicobacteriana y antituberculosa (**Alcaraz, 2010; Cornejo, 2012; Jiménez-Arellanes et al., 2006; Patente 273483**). Asimismo, se ha descrito que estos compuestos por separado inhiben el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. tuberculosis* H37Ra, mostrando CMI < 50 µg/mL al ser

evaluado mediante el ensayo MABA o radiorrespirométrico Bactec 460 (**Cantrell et al., 2001; Copp y Perce, 2007; Garcia et al., 2012; Gu et al., 2004a, 2004b; Higuchi et al., 2008; Wätcher et al., 1999**). Por otra parte, un estudio realizado por **Ge** y colaboradores (**2010**), revela que el AO presenta un efecto sinérgico al administrarse en conjunto con rifampicina, isoniazida y etambutol, incluso es activo en cepas resistentes a estos fármacos.

JUSTIFICACIÓN.

Dado el problema de salud que representa la Tb, en la actualidad, es necesario contribuir en la búsqueda de especies medicinales como fuente de compuestos antituberculosos. Tomando en cuenta que en la medicina tradicional de nuestro país la especie *R. officinalis* es empleada para tratar tos e infecciones de vías respiratorias; aunado a investigaciones químicas previas donde describen que la especie biosintetiza triterpenos como el ácido ursólico y ácido oleanólico, se decidió realizar la investigación química y biológica de esta planta medicinal para aislar la mezcla de triterpenos, los cuales han mostrado actividad antimicobacteriana y antituberculosas. Por lo que esta especie puede ser fuente para la obtención de esta mezcla de compuestos activos.

OBJETIVOS GENERALES:

- Realizar el fraccionamiento químico del extracto clorofórmico de *R. officinalis* mediante CC-FN para obtener la mezcla de AU/AO.
- Evaluar el efecto antimicrobiano del extracto metanólico, lavados clorofórmico, acetonitrílico y metanólico de éste y fracciones obtenidas por CC-FN del extracto clorofórmico *R. officinalis*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Obtención de triterpenos y compuestos adicionales presentes en los extractos clorofórmico y metanólico del extracto metanólico de *R. officinalis* e identificación de su estructura química.
- Determinar la cantidad de polifenoles totales (PT), de las fracciones y producto de hidrólisis del extracto metanólico del extracto de *R. officinalis*.
- Evaluación de la actividad antimicobacteriana *in vitro* del extracto y de las fracciones primarias de *R. officinalis* mediante el micrométodo de azul de alamar (MABA).
- Evaluación de la actividad antiprotozoaria *in vitro* de los extractos clorofórmico y metanólico del extracto, de las fracciones y de la mezcla de AU/AO de *R. officinalis* contra *E. histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginalis*.

METODOLOGÍA

Procedimiento general.

Los disolventes empleados (CH_3CN , CHCl_3 y MeOH), para las extracciones fueron grado HPLC y marca J. T. Baker, y los disolventes empleados para la cromatografía en columna fueron reactivo analítico (R.A., J. T. Baker)

La cromatografía en columna (CC), de fase normal se realizó utilizando sílica gel 60 (0.063 - 0.2 mm; marca Merck), como fase estacionaria y como fase móvil se emplearon diversos disolventes orgánicos (-Hex-, AcOEt , CH_2Cl_2 , CHCl_3 , MeOH y EtOH), y mezclas de éstos con grado creciente de polaridad y destilados en el sistema de presión reducida que incluye un rotaevaporador (Büchi RE111), acoplado a una bomba de vacío (Büchi Vac V-512), y un recirculador de agua (Eco 20). El seguimiento de la columna y detección de compuestos se llevó a cabo mediante el uso de cromatoplasmas de sílica gel 60, con indicador de fluorescencia F_{254} (Merck), con base de aluminio, para las cuales se utilizó una cámara de luz ultravioleta (UV), de onda corta y larga (Entela[®]), y se revelaron empleando H_2SO_4 al 10% y posterior calentamiento en parrilla eléctrica (90-100 °C). Para la detección de polifenoles (flavonoides), en las fracciones más polares, se utilizó difenilboriloxietilamina (NP) al 1% en metanol y polietilenglicol (PEG) al 5% en etanol. La identificación de compuestos se llevo a cabo mediante comparación del factor de retención (R_f) con muestras auténticas obtenidas previamente en el laboratorio, referencia comercial, y el R_f de los compuestos se determinó posteriormente al ser revelados con el agente revelador; o por el análisis en resonancia magnética nuclear de protones (RMN-¹H). Para la purificación de los compuestos se utilizaron placas de vidrio recubiertas con sílica gel 60 fase normal del tipo preparativa (2 mm de espesor, marca Merck).

Para detectar la presencia de compuestos con actividad antioxidante en los extractos y fracciones de columna se realizó ccf, y se reveló utilizando 2, 2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH; marca Sigma), con una concentración 1×10^{-4} M.

Los estándares empleados para la comparación fueron: ácido ursólico (Sigma), la mezcla AU/AO (obtenida de *Thymus vulgaris*), α y β - amirina, β -sitosterol, ácido caféico, ácido clorogénico, ácido gálico, apigenina, campferol, estigmasterol, galactosa, glucosa, quercetina, quercetina-3-ramnosido, quercetina-3-arabinosido, quercetina-3-glucosido, ramnosa y rutina.

Para pesar los extractos, y fracciones se utilizó una balanza analítica (Ohaus®)

Extracciones del extracto crudo.

En este trabajo se partió de un extracto metanólico obtenido mediante la maceración de partes aéreas de *R. officinalis* (extracto crudo). El extracto MeOH fue sometido a proceso de lavado con acetonitrilo (CH_3CN), cloroformo (CHCl_3) y metanol (MeOH), 3 veces cada uno, la fase orgánica de los lavados para cada disolvente se reunieron y se concentraron al vacío para eliminar el disolvente a una temperatura de 40 °C. Las extracciones se realizaron de la siguiente manera: Se pesaron aproximadamente 10 gramos de extracto MeOH crudo, y se adicionó 200 mL de CH_3CN y con ayuda de agitador de vidrio se trituró el extracto para incrementar la superficie de contacto y facilitar la penetración del disolvente, una vez que se desintegraron los grumos, se puso en agitación vigorosa durante 20 minutos. Posteriormente, se filtró al vacío repitiendo el proceso tres veces; las extracciones con CHCl_3 y MeOH se realizaron de igual manera por triplicado. A los extractos obtenidos con MeOH se adicionó carbón activado (5 mg/mL), y se puso en agitación por 10 minutos, proceso que se realizó por duplicado con la finalidad de eliminar clorofilas.

Cada uno de los extractos se concentró al vacío y posteriormente, se analizó mediante ccf empleando como sistema de elución CHCl_3 :MeOH (9:1) con la finalidad detectar la presencia de la mezcla de triterpenos AU/AO. Como resultado de la ccf se detectó la mezcla de los triterpenos en los extractos CHCl_3 y MeOH, por lo que se decidió iniciar el trabajo con el residuo de los extractos de CHCl_3 .

Fraccionamiento primario del extracto CHCl_3 por Cromatografía en Columna Fase Normal (CC-FN).

Se tomaron 10 g del residuo clorofórmico para someterlos a CC-FN, para ello se emplearon 200 gramos de sílice, los cuales se suspendieron en diclorometano (CH_2Cl_2) para empacar la columna, la muestra fue adsorbida en el 10% de la cantidad total de sílice (20 g). La elución de la columna se realizó con CH_2Cl_2 , MeOH, y mezclas de éstos, en orden creciente de polaridad. Se colectaron fracciones de 400 mL inicialmente; de la fracción 39 a la 58 las fracciones se colectaron de 800 mL; de la fracción 59 a la 80 se colectó volúmenes de 1200 mL; de la fracción 81 a la 106 se colectaron fracciones de 2000 mL. Los sistemas de elución, así como las fracciones colectadas y reunidas se describen en la Tabla 1. Dado que en la mayoría de fracciones primarias, se obtuvo la mezcla de triterpenos, sólo algunas de estas fracciones fueron enviadas a evaluación biológica con la finalidad de comprobar si presentaba actividad antimicrobacteriana y/o antiprotozoaria.

Tabla 1.- Fraccionamiento primario de extracto clorofórmico de *Rosmarinus officinalis*.

Sistema elusión en columna	Fracciones colectadas	Reuniones de fracciones	Peso (g)	Evaluación Biológica
Sistema elusión en columna CH ₂ Cl ₂ 100%	1-106	1-2	0.05	
		3	0.05	
		4-10	0.38	
		11-23	0.051	antimicobacteriana
		24-35	0.10	
		36-50	0.19	antimicobacteriana
		51-71	0.52	
		72-82	0.75	
		83-86	0.62	
		87-98	1.29	
CH ₂ Cl ₂ : MeOH 8:2	107-143	99-106	0.44	
		107	1.16	
		108	0.13	
		109-115	0.20	antimicobacteriana
		116-135	0.31	antimicobacteriana
		136-139	0.29	antimicobacteriana y antiprotozoaria
		140-142	0.04	
CH ₂ Cl ₂ : MeOH 1:1	144-149	143-144	0.04	antimicobacteriana y antiprotozoaria
		145	0.01	
CH ₂ Cl ₂ : MeOH 3:7	150-156	146-149	0.03	
		150	0.01	
EtOH 100%	157-158	151-158	0.11	antiprotozoaria
		---	---	
	159 ^a	159	0.01	antimicobacteriana

^{a.-} Se obtuvo por lavado de la sílica con EtOH 100% en agitación, posterior filtración y reconcentración.

Para la detección de compuestos flavonoides en las fracciones primarias obtenidas en la CC., se hizo un análisis mediante ccf a partir de la fracción 115, empleando diversos sistemas de elución y como agente revelador NP/PEG.

Purificación de la mezcla de triterpenos AU/AO.

Las fracciones en las que se detectó la presencia de la mezcla de triterpenos AU/AO semipura (fracciones 24-106), se sometieron a extracción con CH₃CN por quintuplicado, la fase orgánica se separó del sólido mediante filtración rápida; en el residuo sólido estaba presente la mezcla de AU/AO pura; las fases orgánicas se reunieron y se concentraron en sistema de presión reducida. El residuo se

suspendió nuevamente con Hex bidestilado por quintuplicado y, posteriormente, con mezcla Hex:CHCl₃ por quintuplicado, recuperando el sólido sin clorofilas en donde está presente la mezcla AU/AO para lavarla nuevamente con CH₃CN hasta obtener la mezcla de ácidos triterpénicos pura. Esta mezcla se obtuvo como un polvo blanco.

Del grupo de fracciones 36-106 se tomaron 46.98 mg del polvo obtenido de los extractos para realizar placa preparativa, con la finalidad de purificar los compuestos presentes en la muestra (para su posterior identificación mediante RMN-H¹), para lo cual se utilizó como sistema eluyente la mezcla CH₂Cl₂:MeOH 98:02. Las bandas de interés fueron raspadas y se suspendieron con el sistema CHCl₃:MeOH 1:1, para recuperar el compuesto y, posteriormente, se separaron por filtración rápida y se eliminó el disolvente utilizando sistema de presión reducida.

Purificación de la mezcla α y β -amirina.

En la fracción 3 del fraccionamiento primario de CHCl₃ (47.51 mg), se detectó un compuesto con R_f de 0.60 que coincide con la muestra comercial de α y β -amirina, parte de esta fracción se sometió a placa preparativa empleando como sistema de elución CH₂Cl₂:MeOH 96:04. La banda de interés se lavó por triplicado utilizando el sistema CHCl₃:MeOH 9:1 y separando por filtración rápida. Por último, se evaporó el disolvente a presión reducida.

Hidrólisis de extracto MeOH.

Debido a que se obtuvo poca cantidad de las fracciones más polares del fraccionamiento primario de los extractos CHCl₃, se procedió a realizar una ccf comparativa de estas fracciones con su respectivo lavado metanólico, con la finalidad de determinar si los flavonoides estaban presentes en estas últimas muestras.

En el extracto MeOH fue donde se detectó la presencia de flavonoides y glucoflavonoides similares a los presentes en las fracciones más polares del fraccionamiento primario del extracto CHCl₃, tras realizar la ccf de este extracto empleando como sistema de elución AcOEt:MeOH:H₂O (100:13.5:10) y revelando las ccf con NP/PEG. Para ello se emplearon diversos estándares comerciales de compuestos fenólicos (ácido caféico, ácido clorogénico, ácido gálico, apigenina, campferol, quercetina, quercetina-3-arabinosido, quercetina-3-glucosido, quercetina-3-ramnosido, rutina).

Para la identificación de azúcares y flavonoides presentes en estos lavados, se procedió a realizar una hidrólisis ácida, para ello se empleó 1.00 g del lavado MeOH del extracto de *R. officinalis*, el cual se sometió a reflujo con agitación vigorosa con 20 mL de HCl concentrado (36% m/v), durante 4 horas, transcurrido este tiempo, se tomó una alícuota para realizar el seguimiento de la hidrólisis mediante ccf y para la determinación de polifenoles totales, como se describe más adelante.

Posteriormente, del producto de hidrólisis se realizó la separación por par de disolventes, empleando 25 mL de AcOEt como fase orgánica realizando la extracción por quintuplicado. La fase orgánica fue reconcentrada al vacío obteniendo 435.64 mg que se sometieron a CC.

Fraccionamiento primario del producto de hidrólisis del extracto MeOH por Cromatografía en Columna Fase Normal (CC-FN).

La muestra obtenida de la hidrólisis del extracto MeOH (435.64 mg) se sometió a CC-FN, para lo cual se emplearon 20 g de sílice, y la muestra fue adsorbida en el 10% de la cantidad total de sílice (2 g). La elución de la columna se realizó con -Hex-, AcOEt, MeOH y mezcla de estos disolventes en orden creciente de polaridad. Las fracciones se colectaron de un volumen de 100 mL, el cual se modificó a 200 mL a partir de la fracción 60. Los sistemas de elución, así como las fracciones colectadas y reunidas se describen en la Tabla 2.

Tabla 2.- Fraccionamiento primario de la hidrólisis del extracto metanólico de *Rosmarinus officinalis*.

Sistema elución en columna	Fracciones colectadas	Reuniones de fracciones	Peso (mg)
Hexano 100%	1-7	1-8	36.49
Hex:AcOEt 9:1	8-26	9-11	31.77
		12	3.98
		13-19	29.33
		20-23	5.94
		24-26	5.90
Hex:AcOEt 8:2	27-38	27-29	26.75
		30-51	54.57
Hex:AcOEt 7:3	39-55	52-57	8.38
Hex:AcOEt 6:4	56-63	58-70	38.35
Hex:AcOEt 4:6	64-70	----	----
AcOEt 100%	71-79	76-80	7.78
		76-80	47.68
CHCl ₃ : MeOH 8:2	80-83	81-83	28.38
CH ₂ Cl ₂ :EtOH 1:1	84-85	84-85	14.45

La fase acuosa obtenida de la hidrólisis se reconcentró a presión reducida para realizar ccf con la finalidad de identificar los azúcares presentes, mediante el empleo de algunos estándares comerciales, para ello se empleó el sistema de elución n-butanol:AcOEt:H₂O:AcOH (4:3:2:1).

Evaluación de la actividad antimicobacteriana

Para evaluar la actividad antimicobacteriana se emplearon las siguientes cepas de micobacterias: *M. tuberculosis* H37Rv (cepa sensible a los cinco fármacos de primera línea; I, R, E, S y Z); cuatro cepas monorresistentes de *M. tuberculosis* H37Rv ATCC [resistentes a isoniazida (R-I), a estreptomycin (R-S), a rifampicina (R-R) y a etambutol (R-E)]; dos aislados clínicos de *M. tuberculosis* MFR [MMDO (resistente a isoniazida y etambutol), Sin4 (resistente a estreptomycin, isoniazida, rifampicina, etambutol, rifabutina, etionamida y ofloxacina)] y cinco especies de

micobacterias no tuberculosas (*M. fortuitum*, *M. avium*, *M. chelonae*, *M. smegmatis* y *M. abscessus*).

La evaluación de la actividad antimicobacteriana de las muestras (extracto, fracciones, aguas madres, compuestos puros) se determinó mediante el micrométodo colorimétrico de alamar azul (MABA). El ensayo biológico se llevó a cabo en microplacas estériles de 96 pozos con tapa y de fondo plano. Se adicionó 100 µL de agua bidestilada a los pozos de la orilla, con la finalidad de mantener la humedad de la placa durante el proceso de incubación. Los 60 pozos restantes de la placa (10 hileras de 6 pozos cada una) sirven para evaluar seis concentraciones seriadas de los compuestos (de 100 a 3.13 µg/mL) y los controles. En cada caso, se incluyeron tres controles: uno de microorganismo, uno de disolvente y un control positivo. En cada pozo se colocaron 100 µL de medio Middlebrook 7H9, 100 µL de la muestra a evaluar (extracto, fracción o compuesto), a partir de este pozo se realizan las diluciones seriadas, por último se agregan 100 µL de la suspensión bacteriana (6×10^6 UFC/mL). Una vez inoculadas las placas, se taparon, sellaron e incubaron a 37 °C durante cinco días, después de este tiempo se adicionó 20 µL de tween 80 y 20 µL de alamar azul (indicador redox) al control sin compuesto, prolongando la incubación durante 24 horas más. Si el crecimiento de la micobacteria es óptimo en este control, se observa un cambio de color, de azul (estado oxidado) a rosa (estado reducido). Al observar este cambio de coloración, se agregó el alamar azul (20 µL) y el tween 80 (20 µL) al resto de los pozos, incluyendo el resto de los controles, nuevamente las placas fueron reincubadas a 37 °C durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se determina la CMI con base en el cambio de coloración del indicador redox. Se consideran compuestos activos aquellos cuya CMI sea < 50 µg/mL.

Evaluación de la actividad antiprotozoaria.

Los protozoarios empleados en el ensayo fueron *Entamoeba histolytica* (HM1-IMSS) y *Trichomona vaginalis* (GT9), las cuales se cultivaron en medio TYI-S-33 adicionado con 10% de suero de ternera. Ambas cepas se mantuvieron

axénicamente y para el ensayo se utilizaron en la fase *Log* de crecimiento. Además, se empleó *Giardia lamblia* (IMSS:0989:1), que fue mantenido en medio TYI-S-33 suplementado con 10% de suero de ternera y bilis de bovino.

Las muestras se disolvieron en 1 mL de DMSO y 19 mL de medio TYI-S-33 y se prepararon diluciones seriadas de las fracciones y lavados del extracto evaluado. Posteriormente, se adicionó el inóculo de trofozoitos de prueba; para el caso de *G. lamblia* la concentración del inóculo fue 5×10^4 trofozoitos para cada dilución de las fracciones a evaluar, se incubó durante 48 h con una temperatura de 37 °C, una vez transcurrida la incubación, los trofozoitos fueron lavados y subcultivados en medio fresco durante 48 h más. En el caso de *E. histolytica* y *T. vaginalis*, el inóculo fue de 6×10^3 trofozoitos y se incubó durante 72 h con 37 °C de temperatura. Se empleó metronidazol como control positivo, y los parásitos de prueba sin tratamiento como control negativo. Se realizó el conteo de los trofozoitos de *G. lamblia*, *T. vaginalis* y *E. histolytica* y se determinó la IC_{50} , mediante análisis Probit. El ensayo se realizó por triplicado para cada cepa de prueba.

Determinación del contenido de polifenoles totales (PT).

Para realizar la determinación de PT se empleó el método espectrofotométrico desarrollado por Folín y Ciocalteu (1927) (*Kuskoski et al., 2005*), el cual se fundamenta en una reacción redox, en la cual los fenoles son muy reactivos frente a agentes oxidantes. El reactivo de Folín-Ciocalteu contiene una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico en medio básico, el cual al entrar en contacto con los compuestos polifenólicos origina óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}) de color azul, el cual es proporcional a la cantidad de fenoles presentes, los compuestos resultantes absorben a una longitud de onda (λ) de 765 nm.

Para el estudio, se realizaron curvas patrón utilizando como estándares: quercetina, catequina, epicatequina y catecol, de las cuales se pesaron aproximadamente 1 mg de cada estándar y se disolvieron en 5 mL de agua destilada, y se realizaron diluciones para obtener las concentraciones de 200, 100,

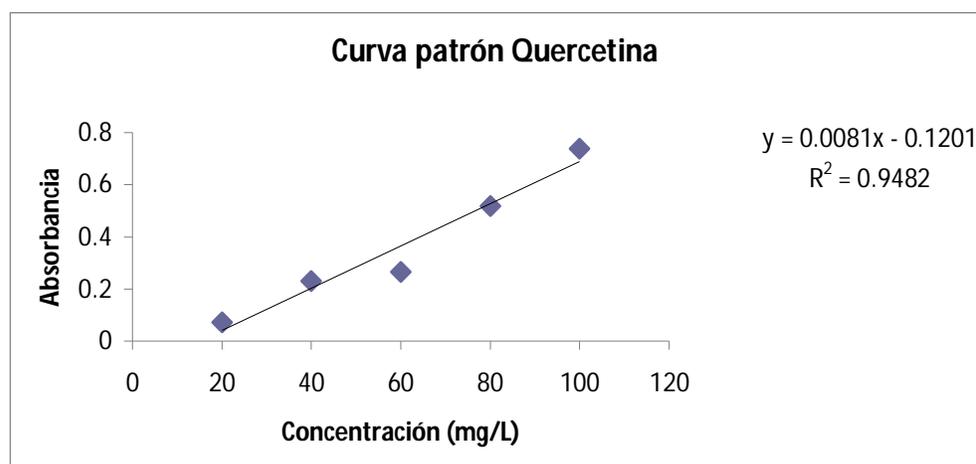
80, 60, 40 y 20 mg/L. Posteriormente, se tomaron 500 µL de las diluciones y se adicionaron 500 µL de reactivo de Folín-Ciocalteu al 10%, al cual se añadieron 4 mL de Na₂CO₃ 0.7 M, mezclando con ayuda de un vórtex, y se incubaron en oscuridad durante 90 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se realizó la lectura de absorbancia de las muestras en espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm con celda de plástico de 1 cm de longitud. Se utilizó como blanco la mezcla de reactivo de Folín-Ciocalteu, Na₂CO₃ 0.7 M y en lugar de la muestra se adicionaron 500 µL de agua destilada. La descripción de las curvas patrón se hace a continuación.

Tabla 3.- Curvas patrón para determinación de polifenoles totales.

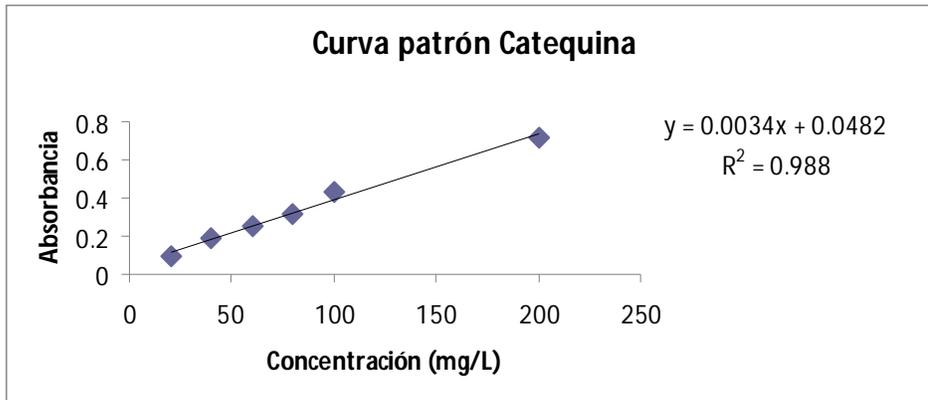
Referencia	Absorbancias					
	20 mg/L	40 mg/L	60 mg/L	80 mg/L	100 mg/L	200 mg/L
quercetina	0.082	0.240	0.274	0.527	0.747	- - -
catequina	0.102	0.196	0.265	0.363	0.444	0.724
epicatequina	0.250	0.392	0.521	0.682	0.742	0.930
catecol	0.325	0.582	0.761	0.835	0.825	- - -

Gráficas de curvas patrón.

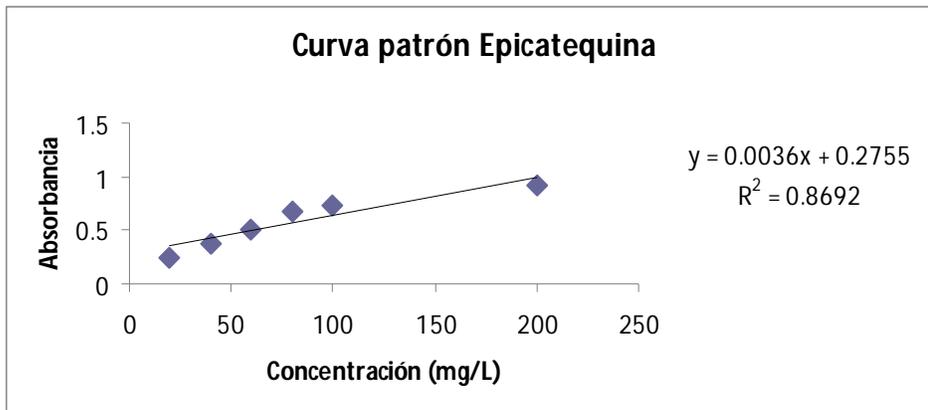
Gráfica 1.- Curva patrón quercetina



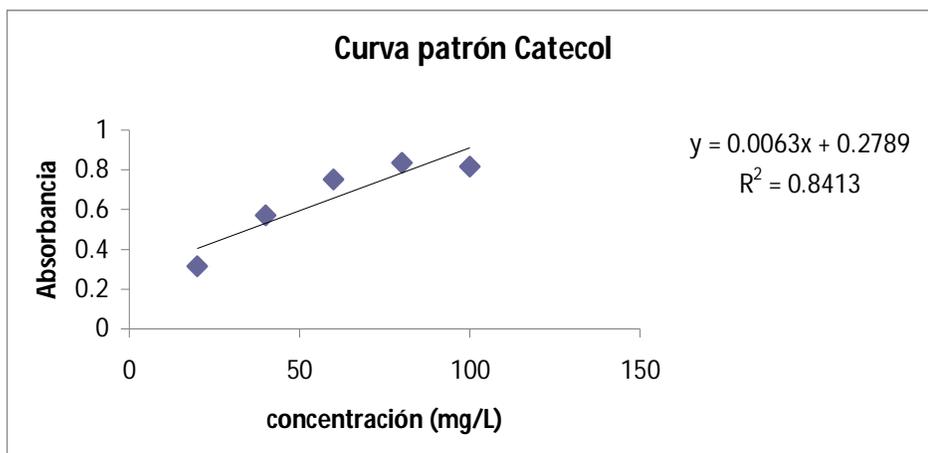
Gráfica 2.- Curva patrón catequina.



Gráfica 3.- Curva patrón epicatequina.



Gráfica 4.- Curva patrón catecol.



Preparación de la muestra problema.

Las muestras problema fueron: extracto MeOH del extracto crudo (L. MeOH), fracción 139 (primaria), el producto de hidrólisis del extracto MeOH y las fracciones secundarias 46 y 64 obtenidas de la CC del hidrolisado.

Las muestras fueron pesadas, aproximadamente 5 mg y se disolvieron en 2 mL de ácido acético al 4% en CH₃CN, esta mezcla se colocó en baño maría con agitación constante durante 30 minutos, posteriormente la muestra se aforó a 10 ml con la misma solución. Enseguida se realizaron diluciones 1:2 en el ácido acético al 4% en CH₃CN. Posteriormente, se tomaron 500 µL de las diluciones y se realizó el mismo tratamiento que se describe para las curvas patrón.

Los resultados se expresan como mg de referencia (según corresponda)/g de muestra (extracto crudo); calculados con la siguiente ecuación:

$$\frac{\left(\frac{A-b}{m}\right)}{C} [=] \frac{\text{mg de referencia}}{\text{g de muestra}}$$

Ecuación 1. Determinación de polifenoles Totales.

A = absorbancia después de agregar la muestra o referencia

m = pendiente de la curva patrón de la referencia*

b = ordenada al origen de la curva patrón de la referencia*.

C = concentración de la muestra problema (g/L).

*Se utilizan los datos de la curva patrón de la referencia (quercetina, catequina, epicatequina y catecol).

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS.

El interés por realizar el estudio químico-biológico del extracto metanólico de *R. officinalis* se debe a que en dicho extracto se describió la presencia de triterpenos como los ácidos ursólico y ácido oleanólico (**Abe et al., 2002**). Estos compuestos son de interés debido a que muestran actividad antimicrobiana, antituberculosa y antiprotozoaria (**Abe et al., 2002; García et al., 2012; Jiménez-Arellanes et al., 2006 y 2007**). Por lo que se procedió a preparar el extracto MeOH de las partes aéreas de *R. officinalis* vía maceración, una vez obtenido el extracto crudo, éste se sometió a extracciones consecutivas con CH₃CN, CHCl₃ y MeOH (Tabla 6), para ello se tomaron 5 muestras de aproximadamente 10 g c/u, mediante este proceso se obtuvieron en promedio 4.63 g del lavado con CH₃CN, 2.61 g del lavado con CHCl₃ y 1.75 g del lavado con MeOH. Cada lavado fue concentrado al vacío y al realizar ccf de cada uno, se detectó que en los extractos CHCl₃ y MeOH estaban presentes los triterpenos antes mencionados.

Tabla 4.- Rendimiento de los lavados del extracto MeOH de las partes aéreas de *R. officinalis*.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Promedio	
Extracto romero (g)	10.04	10.13	9.92	10.00	10.14	10.05	
CH ₃ CN	masa (g)	4.81	4.80	3.80	5.33	4.40	4.63
	rendimiento(%)	47.95	47.45	38.27	52.62	44.03	46.06
CHCl ₃	masa (g)	1.74	2.08	2.33	3.03	3.85	2.61
	rendimiento(%)	17.35	20.55	23.34	30.28	38.00	25.90
CH ₃ OH	masa (g)	1.77	0.96	2.20	1.80	2.01	1.75
	rendimiento(%)	17.66	9.50	22.16	18.01	20.07	17.48

Fraccionamiento primario del extracto CHCl₃ por CC-FN.

Para este proceso se tomaron 10 g del residuo obtenido del lavado con CHCl₃ y se sometieron a CC-FN, mediante este proceso se obtuvieron 159 fracciones primarias, las cuales fueron reunidas según su perfil cromatográfico en ccf (Tabla 1, metodología). En la fracción 3-10, se detectó la presencia de α y β amirina (Figura 1), compuestos identificados por comparación del R_f (R_f = 0.6) con un estándar previamente aislado en el laboratorio (**Martínez, 2006**), y en la fracción 4–106, se identificó β -sitosterol (R_f de 0.51) (Figura 1) por comparación del R_f con referencia comercial (Sigma).

La mezcla de triterpenos AU/AO (Figura 1) se detectó a partir de la fracción 24 hasta la 135. Esta mezcla fue detectada mediante el empleo de una referencia comercial (Sigma), el cual presentó un R_f de 0.34 utilizando como sistema elución CH_2Cl_2 : MeOH 96:04 y como agente cromogénico H_2SO_4 al 10%. En la Tabla 5 se muestran los compuestos detectados en las fracciones reunidas.

Tabla 5.- Compuestos detectados en las fracciones primarias del extracto CHCl_3 por CC-FN

Reuniones de fracciones	Sistema de elución en ccf	Compuesto detectado	R_f
1-2	CH_2Cl_2 : MeOH 96:04	---	
3		α y β amirina	0.60
4-10		β -sitosterol ;	0.51
		α y β amirina	0.60
11-23		β -sitosterol;	0.51
24-35		Mezcla de AU/AO detectado por comparación con estándar;	0.34
36-50			
51-71			
72-82			
83-86			
87-98		Ácido rosmarínico y otro	0.21 0.46
99-106		Mezcla de AU/AO detectado por comparación con estándar	0.34
107			
108			
109-115			
116-135			

Desde la fracción 136 hasta la 139 se identificó la presencia de Q3r. Este compuesto presentó un R_f igual a la referencia comercial (Q3r) ($R_f = 0.40$), empleando el sistema de elución CH_2Cl_2 :MeOH (3:1) y revelando con NP/PEG, también se detectó al emplear el sistema de n-butanol:AcOH:H₂O (4:1:5) donde presenta un $R_f = 0.69$.

En las fracciones 136-142 se detecta la presencia de dos compuestos que presentan un R_f idéntico con las referencias de ácido caféico (0.62), y ácido clorogénico (0.43) al emplear el sistema de elución CH_2Cl_2 :acetona (1:1). Estos

compuestos también fueron detectados al emplear el sistema *n*-butanol: AcOH: H₂O (4:1:5).

Cabe mencionar que se detectaron otras flavonas a partir de la fracción 107 hasta la 159, las cuales no fueron identificadas. La presencia de estas flavonas se detectó al eluir las ccf con los sistemas de elución antes mencionados y al revelar con NP/PEG.

Tabla 6.- Cromatografía en capa fina para la detección de compuestos flavonoides en las fracciones polares.

Fracciones.	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (75:25)		CH ₂ Cl ₂ :acetona (1:1)		BAW (n-butanol: AcOH: agua 4:1:5)	
	compuesto	R _f	compuesto	R _f	compuesto	R _f
136- 139	Banda que corresponde con Q3r	0.40	Banda que revela con coincide con estándar ácido caféico	0.62	Banda que corresponde con ác. Caféico	0.75
			Banda que coincide con estándar ácido clorogénico	0.43	Banda que corresponde con Q3r	0.69
140 – 142					Banda que corresponde con ácido clorogénico.	0.57
					Banda que corresponde con ác. Caféico	0.75
					Banda que corresponde con ácido clorogénico	0.57

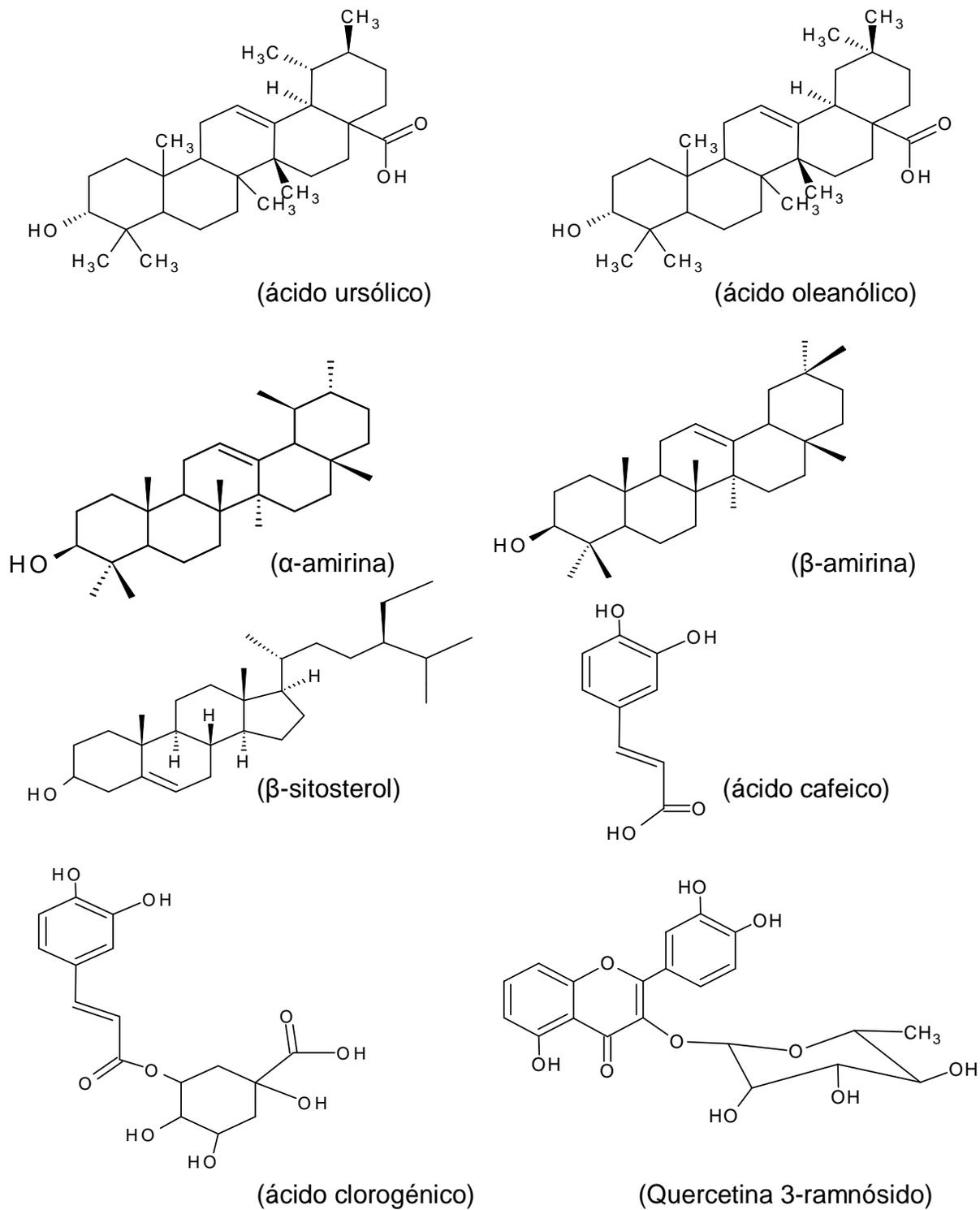


Figura 1.- Compuestos identificados en el fraccionamiento primario del residuo del extracto clorofórmico.

Purificación de la mezcla de triterpenos AU/AO.

De la fracción 24 a la 106 se obtuvo la mezcla de triterpenos en forma semipura (polvo color crema, soluble en mezcla de CHCl_3 :MeOH 8:2), por lo que este grupo de fracciones (3.90 g) fueron sometidos a cinco extracciones sucesivas con CH_3CN (ver metodología). De la fracción 24-35 (99 mg) se obtuvieron 20.4 mg de un polvo blanco con R_f 0.34 (sistema de elución CHCl_2 :MeOH 96:4), con p.f. >300, este R_f es idéntico a la mezcla del estándar comercial, y representa el 20.6% de rendimiento, este compuesto al realizar el análisis de RMN-1H (Espectro 1), indica que corresponde a la mezcla comercial (Sigma) de ácido ursólico y ácido oleanólico (Espectro 2) . El polvo obtenido de la fracción 36 a la 106 (3.80 g) y después de las extracciones sucesivas con CH_3CN se obtuvieron 2.74 g (72.1% de rendimiento), de un polvo color blanco con p.f. 240-242 °C, este polvo es la mezcla de al menos dos compuestos con R_f 's 0.34 y 0.51, el primero corresponde a la mezcla de ácido ursólico/ácido oleanólico y el segundo al β -sitosterol, estos compuestos fueron purificados por placa preparativa empleando el sistema CH_2Cl_2 :MeOH 98:02. La cantidad obtenida de la mezcla de AU/AO representa el 27.33% de la muestra fraccionada en CC-FN de los lavados CHCl_3 , y al compararla con la cantidad total del extracto metanólico de las partes aéreas de *R. officinalis* sometido a lavados, representa el 5.49% de éste, lo cual es un rendimiento considerable. Cabe mencionar que en este grupo de fracciones (36-106) muy probablemente esta presente el ácido betulínico y el ácido rosmarínico, sin embargo estos compuestos no fueron aislados. Al realizar ccf comparativa se observa que estas fracciones presentan un perfil similar al de la mezcla de ácido ursólico/ácido oleanólico/ácido betulínico y ácido rosmarínico (proporcionada por el Dr. Mariano Martínez del Instituto de Química, UNAM).

Purificación de la mezcla α y β -amirina.

A partir de la fracción 3 (ver Tabla 1, metodología) y después de realizar placa preparativa de esta fracciones se obtuvo 3.12 mg de la mezcla de α y β -amirina, esta mezcla presento un R_f de 0.60 en sistema de elución CH_2Cl_2 :MeOH 96:04.

Lo cual corresponde al 6.57% de rendimiento con respecto a la fracción de la cual se purificó. Esta mezcla esta presente también en la fracción 4-10, en la cual aun falta purificarlo.

Fraccionamiento primario del producto de hidrólisis del lavado de MeOH-CC-FN.

Por fraccionamiento primario del producto orgánico de la hidrólisis se obtuvieron 85 fracciones primarias, las cuales fueron reunidas según su perfil cromatográfico en ccf. Se detectó la presencia de β -sitosterol desde la fracción 12 hasta la 19. De la fracción 12 hasta la 23 se identificó la presencia de la mezcla de ácidos triterpénicos AU/AO (32 mg).

En las fracciones 32 a la 57 se detectó ácido clorogénico y ácido caféico (Figura 1) De la fracción 58-70 se detectó una mancha que reveló amarillo con NP/PEG, y al parecer corresponde a varios compuestos, por lo cual se decidió realizar el análisis de la muestra mediante el uso de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), empleando como fase móvil el sistema isocrático de ácido fosfórico 85.3%: MeOH (9:1), con un flujo de 0.3 mL/min, en columna Spherisorb® 10 μ m ODS2 (4.6X250 mm, Waters), en la cual se identificaron 3 flavonoides mayoritarios que corresponden a la acacetina cuyo tiempo de retención (R_T) fue de 9.175 min (Figura 2), campferitrina con R_T de 9.55 (Figura 2) y vitexina con R_T = 10.40 (Figura 2) (Espectro 4), estas flavonas fueron identificadas por comparación con una librería de flavonoides que se tienen disponible en el equipo de HPLC. Los compuestos están en procesos de separación y purificación para su posterior identificación química y corroborar así su R_T en HPLC. En la Tabla 7 se describen los compuestos detectados, así como el sistema de elución de las fracciones colectadas.

Tabla 7.- Compuestos detectados en fraccionamiento primario del producto de hidrólisis del extracto MeOH.

Reuniones de fracciones	Sistema de elución en ccf	Compuesto detectado	R _f
1-8	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 98:02	-----	---
9-11		-----	---
12		β-sitosterol por comparación con un estándar	0.39
		Mezcla de AU/AO por comparación con un estándar	0.19
13-19			
20-23	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 96:04	Mezcla de AU/AO por comparación con un estándar	0.19
24-26			
27-29			
30-51	AcOEt: MeOH:H ₂ O 100:13.5:10	Banda que corresponde con la referencia de ácido caféico.	0.60
52-57		Banda que corresponde con la referencia de ácido clorogénico	0.29
58-70		se aprecian varias bandas juntas no definidas que revelan con NP/PEG	---

En la ccf comparativa empleando como sistema de elución n-butanol:AcOEt:H₂O:AcOH (4:3:2:1), se detectó en la fase acuosa la presencia de ramnosa (R_f = 0.24), al comparar con el R_f de la referencia comercial. Lo cual confirma la presencia de glucoflavonoides, en especial Q3r, que fue identificado anteriormente.

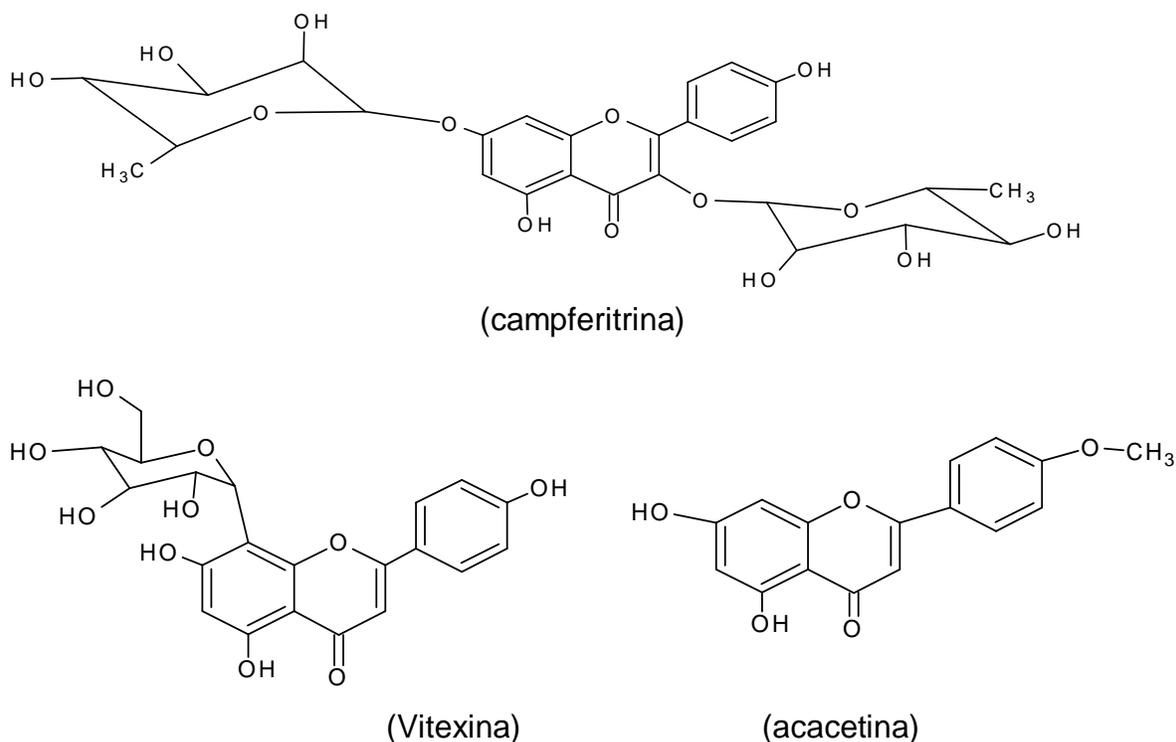


Figura 2.- Compuestos identificados en el fraccionamiento del producto de hidrólisis.

Evaluación de la actividad antimicrobacteriana.

Del fraccionamiento primario del residuo del extracto CHCl_3 , se decidió enviar a ensayo biológico algunas fracciones (11-23, 36-50, 116-121, 122-127, 130-133, 136-139, 143-144 y 159), las cuales fueron seleccionadas con base en el perfil cromatográfico que presentaron en ccf. De igual manera, se envió a evaluación el extracto crudo original. Los resultados de la evaluación antimicrobacteriana se describen en la Tabla 8. El ensayo biológico se llevó a cabo mediante el método MABA. El extracto crudo de *R. officinalis* resultó moderadamente activo contra el aislado clínico Sin4 (CMI = 50 $\mu\text{g/mL}$) y poco activo contra MMDO (CMI = 100 $\mu\text{g/mL}$), y contra el resto micobacterias fue inactivo (CMI > 100 $\mu\text{g/mL}$). Por su parte, la fracción Ro 11-23, fracción en la cual se detectó la presencia de la mezcla de triterpenos AU/AO, presenta actividad contra la cepa de referencia H37Rv (CMI= 25 $\mu\text{g/mL}$), contra el aislado clínico Sin4 (CMI = 6.25 $\mu\text{g/mL}$), también fue activa contra la cepa H37Rv monorresistente a estreptomicina CMI =

25 µg/mL) y mostró actividad marginal contra el aislado MMDO y H37Rv resistente a rifampicina (CMI = 50 µg/mL). La fracción 36-50 presenta una actividad similar a la fracción anterior, es activa contra las cepas H37Rv (CMI = 25 µg/mL), Sin4 (CMI = 6.25 µg/mL), y contra la cepa monorresistente a estreptomicina H37Rv-SR (CMI = 25 µg/mL). La fracción 116-121 es inactiva contra las cepas de micobacterias probadas (CMI > 50 µg/mL), pero la fracción 122-127 es activa únicamente contra el aislado clínico MMDO (CMI = 6.25 µg/mL). Debido a la similitud del perfil cromatográfico de las fracciones primarias 116 hasta la 135, en la cual se aisló β-sitosterol y la mezcla de ácido ursólico/ácido oleanólico, se decidió reunir las, y se evaluó nuevamente observando que esta fracción mostró una CMI = 25 µg/mL contra *M. tuberculosis* H37Rv, y fue más activo contra el aislado SIN4 (CMI = 12.5 µg/mL) y mostró actividad marginal contra tres cepas monorresistentes de *M. tuberculosis* (resistente a estreptomicina, resistente a izonizida y resistente a rifampicina) cuya CMI = 50 µg/mL (Tabla 8). La actividad antimicobacteriana observada en la fracción 36-50 varía con respecto a la actividad observada para la fracción 116-121, muy probablemente esto se debe a que en estas últimas fracciones están presentes otros compuestos aparte de la mezcla AU/AO, como el ácido botulínico y el ácido rosmarínico, en mayor cantidad, los cuales pueden interferir con la actividad antimicobacteriana de la mezcla AU/AO. Cabe mencionar que está en proceso la purificación del ácido rosmarínico y ácido betulínico para determinar la actividad antimicobacteriana de cada uno de estos compuestos.

Tabla 8.- Resultados de actividad antimicobacteriana contra cepas tuberculosas.

muestra	H37Rv	MMDO ^a	Sin 4 ^b	H37Rv-RR	H37Rv-SR	H37Rv-IR	H37Rv-ER
Extracto crudo	>200	100	50	200	200	200	>200
Ro 11-23	25	50	6.25	50	25	>50	>50
Ro 36-50	25	50	6.25	50	25	>50	>50
Ro 116-121	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
Ro 122-127	>50	>50	6.25	>50	>50	>50	>50
Ro 130-133	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
Ro 136-139	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
Ro 143-144	50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
Ro 159	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
Ro116-135	25	>50	12.5	50	50	50	>50

a.- resistente a isoniazida y etambutol

b.- resistente a estreptomycin, isoniazida, rifampicina, etambutol, rifabutina, etionamida y ofloxacina

Investigaciones previas describen que los triterpenos muestran actividad antimicobacteriana, el ácido ursólico muestra una CMI = 15 µg/mL ó 32 µM y el ácido oleanólico de 30 µg/mL ó 64 µM al ser evaluados por el método radorrespirométrico y de 41.9 y 28.7 µg/mL, respectivamente, al evaluarlos por MABA (**Cantrell et al., 2001; Copp y Perce, 2007; Garcia et al., 2012; Gu et al., 2004a, 2004b; Wätcher et al., 1999**). Por otro lado, la mezcla de estos triterpenos obtenido de *Thymus vulgaris* presentó una CMI = 12.5 µg/mL contra *M. tuberculosis* H37Rv (**Jimenez-Arellanes et al., 2006; Martínez et al., 2006**). Es importante mencionar que la actividad contra *M. tuberculosis* H37Rv del ácido ursólico está determinado por la pureza del compuesto, a mayor pureza se reduce la actividad antimicobacteriana (**Jaki et al., 2008**). Efecto que debe también influir en la actividad biológica de la mezcla de triterpenos, ya que en un trabajo previo se describe que la mezcla presentó una CMI de 12.5 µg/mL contra *M. tuberculosis* H37Rv y en el trabajo previo se encontró que presenta una CMI = 25 µg/mL. Cabe mencionar que **Leal et al., 2003** reportó que el extracto EtOH de *R. officinalis* presentó una CMI = 138 µg/mL contra *M. tuberculosis* H37Rv al ser evaluado por ensayo MABA.

Por otro lado, se ha descrito que el AO muestra efecto sinérgico *in vitro* cuando se combina con fármacos de primera línea (isoniazida, rifampicina o etambutol), por

ejemplo encontraron que la mezcla de estos fármacos con AO es más potente que la mezcla Isoniazida/Rifampicina sola contra cepas de *M. tuberculosis* monorresistentes y MFR (**Ge et al., 2010**). Esto es sumamente importante, ya que, al potenciar el efecto de los fármacos mencionados para el tratamiento de la Tb, se disminuye la dosis que debe administrarse y por consecuencia se previene y/o disminuye la aparición de efectos adversos derivados de la administración de estos fármacos.

Por otro lado, es de suma importancia la obtención de estos compuestos que sean activos contra *M. tuberculosis*, debido a que los casos MFR y XFR están aumentando y responden pobremente ante los fármacos de primera y segunda línea aunado a que ocasionan severos efectos secundarios.

Recientemente, nuestro grupo de trabajo realizó la evaluación *in vivo* de la actividad antituberculosa de los compuestos puros en un modelo murino de TB induciendo la enfermedad con *M. tuberculosis* H37Rv, encontrándose que los compuestos por separado reducen la carga bacilar y el porcentaje de neumonía, pero la mezcla de AU/AO presentó un mejor efecto antituberculoso en los animales tratados (**Cornejo, 2012; Patente 273483**)

Los resultados de la actividad del extracto crudo y fracciones primarias de la CC del residuo CHCl₃ contra cepas de micobacterias no tuberculosas se describen en la Tabla 9. El extracto crudo resultó activo contra *M. smegmatis* (CMI = 12.5 µg/mL) y ligeramente activo contra *M. absessus* (CMI = 50 µg/mL). La fracción 11-23 nuevamente presentó una mayor actividad contra la mayoría de las micobacterias no tuberculosas: *M. fortuitum* y *M. smegmatis* (CMI = 6.25 µg/mL), *M. avium* y *M. absessus* (CMI = 25 µg/mL). La fracción 36-50 presentó mayor actividad contra *M. chelonae* (CMI = 6.25 µg/mL) y moderada actividad contra *M. fortuitum* y *M. absessus* (CMI = 25 µg/mL). La fracción 116-121 no presentó actividad contra ninguna de las cepas en estudio. La fracción 122-127 sólo resultó activo contra *M. chelonae* (CMI = 6.25 µg/mL). El resto de fracciones evaluadas no

presentaron actividad contra las micobacterias no tuberculosas empleadas en el ensayo biológico.

Tabla 9.- Resultados de actividad antimicobacteriana contra cepas no tuberculosas.

muestra	CMI ($\mu\text{g/mL}$)				
	<i>M. fortoitum</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. absessus</i>
Extracto crudo	100	100	100	12.5	50
Ro 11-23	6.25	25	50	6.25	25
Ro 36-50	25	50	6.25	50	25
Ro 116-121	>50	>50	>50	>50	>50
Ro 122-127	>50	>50	6.25	>50	>50
Ro 130-133	>50	>50	>50	>50	>50
Ro 136-139	>50	>50	>50	>50	>50
Ro 143-144	>50	>50	>50	>50	>50
Ro 159	>50	>50	>50	>50	>50

Encontrar compuestos y/o extractos que puedan ser fuente de moléculas activas contra micobacterias no tuberculosas es relevante debido a que estas micobacterias (*M. chelonae*, *M. fortoitum*, *M. abscessus*, *M. avium*, *M. smegmatis*), causan infección en personas inmunocomprometidas y no responden ante los fármacos de primera y segunda línea, por lo que no se cuenta con fármacos específicos para tratar los casos de micobacteriosis provocados por estas micobacterias como es el caso de personas con SIDA/VIH (**Flores et al., 2005; Rodrigues et al., 2008; Cassidy et al., 2009**). Además, algunas de estas micobacterias han generado resistencia a los tratamientos convencionales, por lo que es de suma importancia realizar la evaluación de la actividad de nuevos compuestos contra éstas, para tener así nuevas alternativas de tratamiento. En la medicina herbolaria, se tiene una fuente potencial de compuestos que pueden ser útiles para la terapéutica contra las micobacterias no tuberculosas, como se encontró para *R. officinalis* que biosintetiza metabolitos secundarios que son activos contra diversos microorganismos. Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, se demostró que existen compuestos activos contra las cepas

micobacterianas no tuberculosas en los extractos orgánicos preparados a partir de la droga cruda en estudio.

Evaluación de la actividad antiprotozoaria

Este ensayo se realizó empleando trofozoitos de *E. histolytica* (HM1-IMSS), *T. vaginalis* (GT9) y *G. lamblia* (IMSS:0989:1) y fueron evaluadas las fracciones 108, 136-139, 143-144, las cuales fueron seleccionadas con base en el perfil cromatográfico; además, se evaluó el residuo de las extracciones con CHCl₃ y MeOH. Los resultados se describen en la Tabla 10. Las muestras evaluadas fueron disueltas en 1 mL de DMSO y se llevaron a un volumen total de 20 mL empleando medio TYI-S-33, y a partir de esta solución se prepararon diluciones seriadas para la determinación de CI₅₀ de cada una, como control positivo se empleó metronidazol, y como control negativo los protozoarios de prueba sin tratamiento. Los datos obtenidos muestran que ninguna de las fracciones, ni los extractos CHCl₃ y MeOH inhibieron el crecimiento de los parásitos ensayados, los valores obtenidos de IC₅₀ fueron mayores a 140 µg/mL.

Tabla 10.- Resultados de actividad antiprotozoaria del extracto y fracciones de *R. officinalis*.

Muestras	<i>Giardia lamblia</i> (IMSS:0989:1)	<i>Entamoeba histolytica</i> (HM1-IMSS)	<i>Trichomonas vaginalis</i> (GT9)
Extracto CHCl ₃	155.14 µg/mL	144.85 µg/mL	186.20 µg/mL
Extracto MeOH	211.81 µg/mL	194.19 µg/mL	285.74 µg/mL
Ro 108	194.70 µg/mL	183.69 µg/mL	225.32 µg/mL
Ro 136-139	163.79 µg/mL	149.19 µg/mL	194.40 µg/mL
Ro 143-144	197.50 µg/mL	184.34 µg/mL	193.35 µg/mL
RoHx*	157.35 µg/mL		
Metronidazol	0.210 µg/mL	0.06 µg/mL	0.037

*fase orgánica de la hidrólisis

G. lamblia y *E. histolytica* son dos de los protozoarios anaerobios con mayor importancia clínica, causantes de desórdenes diarreicos en el mundo. El metronidazol es el fármaco de elección para el tratamiento de estas parasitosis; sin embargo, existen varios inconvenientes con el uso de dicho fármaco, como los efectos adversos que provoca (cefalea, náuseas, diarrea, vómito, boca seca, urticaria, además es teratogénico y carcinogénico), el elevado costo y

recientemente el surgimiento de protozoarios que han generado resistencia hacia el metronidazol (**Jiménez-Arellanes et al., 2012b; Pérez et al., 2012**). Por tal razón, resulta importante evaluar especies medicinales, las cuales pueden constituir fuentes alternas de compuestos para el tratamiento de la giardiasis y amibiasis. A la fecha, no existe un reporte que describa el efecto de los triterpenos sobre *G. lamblia*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*. Sin embargo, **Abe** y colaboradores (**2002**) describe que los ácidos triterpénicos AU y AO aislados de *R. officinalis* fueron activos contra epimastigotes de *T. cruzi*, el AU presentó una $CM_{100} = 40 \mu\text{g/mL}$ ($88 \mu\text{M}$) y el AO resultó menos activo mostrando una $CM_{100} = 250 \mu\text{g/mL}$. Por otro lado, también se describe la actividad del AU (aislado de *Calophyllum inophyllum*) contra *Plasmodium falciparum* mostrando una $IC_{50} = 24.48$ y $46.28 \mu\text{g/mL}$ al ser evaluados por el método radioisotópico y HRP-2, respectivamente (**Mesa-Venegas et al., 2011**). La fracción 136-139 mostró una $CI_{50} = 163.79 \mu\text{g/mL}$ y $149.19 \mu\text{g/mL}$ contra *G. lamblia* y *E. histolytica*, respectivamente en este grupo de fracciones se detectó la presencia de ácido caféico y ácido clorogénico). Se ha descrito que estos compuestos poseen actividad contra amastigotes de leishmania (*L. major*, CMI = 4.4 nM; *L. donovani*, CMI = 6.1 nM; *L. guyanensis*, CMI = 6.6; *L. killicki*, CMI = 3.9 nM), en células RAW 264.7 (**Radtko et al., 2003**).

Determinación del contenido de polifenoles totales.

De manera adicional a la obtención de los principios activos de interés y evaluación de sus actividades antimicobacterianas y antiprotozoarias, se procedió a determinar el contenido de PT en el extracto MeOH, la fracción F139 del CC-FN del residuo CHCl_3 , la fase orgánica del producto de hidrólisis y las fracciones FHx46 y FHx64 de la CC-FN del producto de hidrólisis, empleando el método de Folin-Ciocalteu, utilizando como estándares quercetina, catequina, epicatequina y catecol. Los resultados se expresan en mg de estándar/g de muestra. Tal y como se esperaba el producto de hidrólisis del extracto MeOH, posee la mayor concentración de polifenoles totales, ya que la finalidad de realizar la hidrólisis fue separar la unión glicosídica de los glucoflavonoides para obtener por separado las flavonas presentes en el extracto MeOH, dando como resultado las siguientes

equivalencias con los estándares: 312.31 mg quercetina/g de muestra; 598.44 mg de catequina/g de muestra; 379.50 mg de epicatequina/g de muestra; 215.27 mg de catecol/g de muestra; seguida de la fracción FHx64: 85.01 mg quercetina/g de muestra; 158.72 mg de catequina/g de muestra; 94.03 mg de epicatequina/g de muestra; 53.25 mg de catecol/g de muestra (Tabla 12). Ambas muestras son ricas en polifenoles en especial de flavonas, previamente detectados por ccf en estas muestras. Estos valores nos indican que en la fase orgánica del producto de hidrólisis y en la fracción 64 (polar) se concentra el mayor contenido de polifenoles. En el extracto MeOH, el contenido de polifenoles fue menor, esto puede deberse a que en este extracto están presentes las flavonas glicosiladas y que al momento de realizar la hidrólisis se liberan, y por lo tanto, dan un contenido de PT mayor. Estos resultados están en concordancia con lo previamente reportado, donde se describe que la especie *R. officinalis* se emplea como fuente de compuestos antioxidantes (**Cheung et al., 2007; Genena et al., 2008; Leal et al., 2003; López-Jiménez et al., 2011; Moreno et al., 2006; Mulinacci et al., 2011; Posadas et al., 2009**). Los resultados de absorbancia obtenidos para cada muestra se detallan en la siguiente Tabla.

Tabla 11.- Absorbancia de las muestras evaluadas para actividad antioxidante.

muestra	concentración g/L	absorbancia
L. MeOH	2.51	0.640
F139	2.49	0.473
HxRo	0.34	0.740
FHx 46	1.30	0.276
FHx 64	1.13	0.658

Tabla 12.- Resultado de cuantificación de polifenoles totales en las muestras.

	mg de referencia /g de muestra			
	quercetina	catequina	epicatequina	catecol
L. MeOH	37.46	69.48	40.42	22.88
F139	29.46	50.28	22.08	12.40
HxRo	312.31	598.44	379.50	215.27
FHx 46	37.62	51.54	0.11	-----
FHx 64	85.01	158.72	94.03	53.25

CONCLUSIONES.

- Se obtuvo una cantidad considerable de la de la mezcla de triterpenos AU/AO (2.74 g) identificado por ccf y confirmada con el análisis de RMN-H¹.
- En la evaluación contra micobacterias las fracciones 11-23 y 36-50 de la CC-FN del residuo CHCl₃ son las más activas, tanto contra cepas de *M. tuberculosis*, como para micobacterias atípicas, lo cual se esperaba por tener mayor cantidad de la mezcla de triterpenos AU/AO.
- *Rosmarinus officinalis* es una buena fuente de compuestos con actividad antimicobacteriana.
- El extracto de *R. officinalis*, así como lavados y fracciones obtenidas no son activos contra *E. histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginalis*.
- *R. officinalis* es una fuente potencial de compuestos polifenólicos, los cuales son responsables de su actividad antioxidante.

REFERENCIAS.

- Abe, F; Yamauchi, T; Nagao, T; Kinjo, K; Okabe, H ; Higo, H; Akahane, H. Ursolic Acid as a Trypanocidal Constituent in Rosemary. *Biol. Pharm. Bull.* 2002, 25: 1485-1487.
- Adhvaryu, M; Vakharia B. Drug resistant tuberculosis emerging treatment options. *Clin Pharmacol.* 2011, 3: 51-67.
- Alcaraz, MC. *Bouvardia ternofila* Como fuente de compuestos antituberculosos y determinación de la toxicidad subaguda de una mezcla de triterpenos activos contra *M. tuberculosis* H37Rv. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM. 2010
- Altinier, G; Sosa, S; Aquino, R; Mencherini, T; Della-Loggia, R; Tubaro A. Characterization of Topical Antiinflammatory Compounds in *Rosmarinus officinalis*. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55: 1718-1723.
- Bai, N; He, K; Roller, M; Lai, C; Shao X; Pan, MH; Ho, C. Flavonoids and Phenolic Compounds from *Rosmarinus officinalis*. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58: 5363-5367.
- Bernardes, WA; Lucarini, R; Tozatti, MG; Silva, ML; Filho, AA; Martins, CH; Crotti, AE; Pauletti, PM; Groppo, M; Cunha, WR. Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* against oral pathogens: relevances of carnosic acid and carnosol. *J Med Food.* 2010, 13: 1167-1175.
- Borrás-Linares, I; Arráez-Román, D; Herrero, M; Ibáñez, E; Segura-Carretero, A; Fernández-Gutiérrez, A. Comparison of different extraction procedures for the comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in *Rosmarinus officinalis* by reversed-phase high performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2011, 1218: 7682-7690.
- Bozin, B; Mimica-Dukic, N; Samojlik, I; Jovin E. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and sage (*Salvia officinalis* L. Lamiaceae) essential oils. *J Agric Food Chem.* 2007, 55: 7879-7885.

- Cantrell, L; Franzblau, SG; Fischer, NH. Antimycobacterial Plant terpenoids. *Planta Med.* 2001, 67: 685-694.
- Cassidy, PM; Hedberg, K; Saulson, A; McNelly, E; Winthrop, KL. Nontuberculous mycobacterial disease prevalence and risk factors: a changing epidemiology. *Clin Infect Dis.* 2009. 49: e124-e129.
- Centeno, S; Calvo, MA; Adelantado, C; Figueroa, S. Antifungal activity of extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* against *Aspergillus flavus* and *A. ochraceus*. *Pak J Biol Sci.* 2010, 13: 452-455.
- Cheung, S; Tai, S. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. *Oncol Rep.* 2007, 17: 1525-1531.
- Copp, BR; Pearce, AN. Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Prod Rep.* 2007, 24: 278-297.
- Cornejo, J. Aislamiento, identificación y evaluación toxicológica y antimicobacteriana de ácido ursólico y ácido oleanólico. Tesis de doctorado, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. 2012
- Flores, AR; Parsons, LM; Pavelka, MS. Genetic analysis of the β -lactamases of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* and susceptibility to β -lactam antibiotics. *Microbiol.* 2005, 151: 521-532.
- García, A; Bocanegra-García, V; Palma-Nicolás, JP; Rivera, G. Recent advances in antitubercular natural products. *Eur J Med Chem.* 2012, 49: 1-23
- Ge, F; Zeng, F; Liu, S; Guo, Na; Ye, H; Song, Y; Fan, J; Wu, X; Wang, X; Deng, X; Jin, Q; Lu, Y. *In-vitro* synergistic interactions of oleanolic acid in combination with isoniazid, rifampicin or ethambutol against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol.* 2010, 59: 567-572
- Genena, A; Hense H; Smânia Junior, A; de Souza, SM. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2008, 28:463-469.

- Gu, JQ; Wang, Y; Franzblau, S; Montenegro, G; Yang, D; Timmermann, B. Antitubercular constituents of *Valeriana laxiflora*. *Planta Med.* 2004a, 70: 509-514.
- Gu, JQ; Wang, Y; Franzblau, S; Montenegro, G; Yang, D; Timmermann, B. Constituents of *Quinchamalium majus* with potential antitubercular activity. *Z Naturforsch.* 2004b, 59c: 797-802
- Guzmán, MY. Fraccionamiento biodirigido del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. en modelos de nocicepción en roedores Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM. 2011
- Higuchi, C; Pavan, F; Fujimura, C; Sannomiya, M; Vilegas, W; de Andrade, S; Sacramento, L; Nakamura, D. Triterpenes and antitubercular activity of *Byrsonima crassa*. *Quim Nova.* 2008, 31: 1719-1721
- Höfling, JF; Anibal, PC; Obando-Pereda, GA; Peixoto, IA; Furletti, VF; Foglio, MA; Gonçalves, RB. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. *Braz J Biol.* 2010, 70: 1065-1068
- Ibarra, A; Cases, J; Roller, M; Chiralt-Boix, A; Coussaert, A; Ripoll, C. Importance of extracts standardization and in vitro /ex vivo assay selection for the evaluation of antioxidant activity of botanicals: a case study on three *Rosmarinus officinalis* L. extracts. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2010, 74: 1350-1354.
- Jaki, BU; Franzblau SG; Chadwick LR; Lankin DC; Zhang F; Wang Y; Pauli GF. Purity-activity relationships of natural products: the case of anti-TB active ursolic acid. *J Nat Prod.* 2008, 71: 1742-1748.
- Jiang, Y; Wu, N; Fu, YJ; Wang, W; Luo, M; Zhao, CJ; Zu, YG; Liu, XL. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Plant Foods Hum Nutr.* 2011, 66: 196-202.
- Jiménez-Arellanes A; Martínez R; García, R; León-Díaz R; Luna- Herrera J; Molina-Salinas, GM; Said-Fernández, S. *Thymus vulgaris* as a potencial source of antituberculous compounds. *Pharmacol online.* 2006, 3: 569-574

- Jiménez-Arellanes A; Meckes M.; Torres J., Luna-Herrera J. Antimycobacterial triterpenoids from *Lantana hispida* (verbenacea). *J Ethnopharmacol.* 2007, 111: 202-205.
- Jiménez-Arellanes, A; León-Díaz, R; Meckes, M; Tapia, A; Molina-Salinas, GM; Luna-Herrera, J; Yépes-Mulía, L. Antiprotozoal and antimycobacterial activity of pure compounds from *Aristolochia elegans* rizomas. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012, 2012: 593403.
- Koul, A; Arnoult, E; Lounis, N; Guillemont, J; Andries, K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature.* 2011, 469: 483-490.
- Kuskoski, EM; Asuero, AG; Troncoso, AM; Mancini-Filho, J; Fett, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2005, 25: 726-732.
- Leal, PF; Braga, ME; Sato, DN; Carvalho, JE; Marques, MO; Meireles, MA. Functional properties of Spices Extracts Obtained via Supercritical Fluid Extraction. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51: 2520-2525
- López-Jiménez, A; García-Caballero, M; Medina, MA; Quesada, AR. Anti-angiogenic properties of carnosol and carnosic acid, two major compounds from rosemary. *Eur J Nutr.* 2011.
- Martínez, AL; González-Trujano, ME; Chávez, M; Pellicer, F. Antinociceptive effectiveness of triterpenes from rosemary in visceral nociception. *J. Ethnopharmacol.* 2012, 142: 28-34.
- Martínez-Velázquez, M; Rosario-Cruz, R; Castillo-Herrera, G; Flores-Fernández, JM; Álvarez, AH; Lugo-Cervantes, E. Acaricidal effect of essential oils from *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales:Liliaceae) against *Rhipicephalus (Boophilu) microplus* (Acari: Ixodidae). *Environ Toxicol Pharmacol.* 2011, 32: 296-305.
- Mengoni ES; Vichera, G; Rigano, LA; Rodriguez-Puebla, ML; Galliano, SR; Cafferata, EE; Pivetta, OH; Moreno, S; Vojnov, AA. Suppression of COX-2, IL-1 β and TNF- α expression and leukocyte infiltration in inflamed skin by

- bioactive compound from *Rosmarinus officinalis* L. *Fitoter.* 2011, 82: 414-421.
- Mesa-Venegas, AM; Pabon, AL; Blair-Trujillo, S. Actividad antiplasmodial in vitro de *Calophyllum inophyllum*. *Quím. Viva.* 2011, 2
 - Moreno, S; Scherey, T; Romano, CS; Vojnov, AA. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radic Res.* 2006, 40: 223-231
 - Mulinacci, N; Innocenti, M; Bellumori, M; Giaccherini, C; Martini, V ; Michelozzi, M. Storage method, drying processes and extraction procedures strongly affect the phenolic fraction of rosemary leaves: An HPLC/DAD/MS study. *Talanta.* 2011. 85: 167-176
 - Ngo, SN; Williams, DB; Head, RJ. Rosemary and cancer prevention: preclinical perspectives. *J Ethnopharmacol.* 2011, 137: 1528-1532
 - Oluwatuyi, M; Kaatz, GW; Gibbons, S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochem.* 2004, 65: 3249-3254.
 - Okamura, N; Haraguchi, H; Hashimoto, K; Yagi, A. Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. *Phytochem.* 1994, 37: 1463-1466.
 - Patente No 273483, autores: Jiménez-Arellanes, A; Meckes-Fischer, M; Luna-Herrera, J; Torres, J; Hernández-Pando, R. Composición farmacéutica que comprende ácido ursólico y ácido oleanólico útil para el tratamiento de tuberculosis. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, 2010.
 - Park, SE; Kim, S; Sapkota, K; Kim, SJ. Neuroprotective effect of *Rosmarinus officinalis* extract on human dopaminergic cell line, SH-SY5Y. *Cell Mol Neurobiol.* 2010, 30: 759-767.
 - Pauli, GF; Case, RJ; Inui, T; Wang, Y; Cho, S; Fischer, NH; Franzblau, SG. New perspectives on natural products in TB research. *Life Sci.* 2005, 78: 485-494.
 - Pérez, S; Ramos-López, MA; Sánchez-Miranda, E; Fresán-Orozco, MC; Pérez-Ramos J. Antiprotozoa activity of some essential oils. *J Med Plants Res.* 2012, 6: 2901-2908

- Pérez-Guzmán, C; Vargas, MH. Diabetes, anging, and tuberculosis. *Lung India*. 2011, 28: 191-192
- Pintore, G; Marchetti, M; Sechi, B; Scanu, N; Mangano, G; Tirillini, B. *Rosmarinus officinalis* L.: chemical modifications of the essential oil and evaluation of antioxidant and antimicrobial activity. *Nat Prod Commun*. 2009, 4: 1685-1690.
- Posadas, SJ; Cruz, V; Largo, C; De la Gándara, B; Matallanas, B; Reglero, G; De Miguel, E. Protective effect of SF rosemary extract, *Rosmarinus officinalis*, on antioxidant of major organs of aged rats. *Exp Gerontol*. 2009, 44: 383-389.
- Radtke, OA; Foo, LY; Lu, Y; Kinderlen, AF; Kolodziej, H. Evaluation of sage phenolics for their antileishmanial activity and modulator effects on interleukin-6, interferon and tumor necrosis factor factor- α -release in RAW 264.7 cells. *Z Naturforsch*. 2003, 58c: 395-400
- Rodrigues, L; Wagner, D; Viveiros, M; Sampaio, D; Couto, I; Vavra, M; Kern, WV; Amaral, L. Thioridazine and chlorpromazine inhibition of ethidium bromide efflux in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium smegmatis*. *J Antimicrob Chemother*. 2008, 61: 1076-1082
- Sinkovic, A; Suran, D; Lokar, L; Fliser, E; Skerget, M; Novak, Z; Knez, Z. Rosemary extracts improve flow-mediated dilatation of the brachial artery and plasma PAI-1 activity in healthy young volunteers. *Phytother Res*. 2011, 25: 402-407.
- Swindells, S. New drug to treat tuberculosis. *F1000 Med Rep*. 2012, 4:12.
- Theoduloz, C; Pertino, MW; Rodríguez, JA; Schmeda-Hirschmann, G. Gastroprotective effect and cytotoxicity of carnosic acid derivatives. *Planta Med*. 2011, 77: 882-887
- Toroglu, S. *In-vitro* antimicrobial activity and synergistic/antagonistic effect of interactions between antibiotic and some spice essential oils. *J Med Entomol*. 2011, 48: 822-827.

- Ventura-Martínez, R; Rivero-Osorno, O; Gómez, C; González-Trujano, ME. Spasmolytic activity of *Rosmarinus officinalis* L. Involves calcium channels in the guinea pig ileum. *J Ethnopharmacol.* 2011, 137: 1528-1532
- Villegas, AG. Aislamiento, identificación y modificaciones químicas de metabolitos secundarios con actividad antiproliferativa y antiinflamatoria de *Rosmarinus officinalis* L. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM. 2011.
- Wätcher, GA; Valcic, S; Flagg, ML; Franzblau, SG; Montenegro, G; Suárez, E; Timmermann, BN. Antitubercular activity of pentacyclic triterpenoids from plants of Argentina and Chile. *Phytomed* 1999, 6: 341-345
- Wätcher, GA; Valcic, S; Franzblau, SG; Suárez, E; Timmermann, BN. Antitubercular activity of triterpenoids from *Lippia turbinata*. *J Nat Prod.* 2001, 64: 37-41.
- Weerakkody, NS; Caffin, N; Dykes, GA; Turner, MS. Effect of antimicrobial spice and herb extract combinations on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, and spoilage microflora growth on cooked ready-to-eat vacuum-packaged shrimp. *J Food Prot.* 2011a, 74: 1119-1125
- Weerakkody, NS; Caffin, N; Lambert, LK; Turner, MS; Dykes, GA. Synergistic antimicrobial activity of galangal (*Alpinia galanga*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and lemon ironbark (*Eucalyptus staigeriana*) extracts. *J Sci Food Agric.* 2011b, 91: 461-468.
- Yesil-Celiktas, O; Hames-Kocabas, EE; Bedir, E; Vardar-Sukan, F; Ozek, T; Baser, KHC. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.* 2005, 100: 553-559
- Yesil-Celiktas, O; Nartop, P; Gurel, A; Bedir, E; Vardar-Sukan, F. Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from *Rosmarinus officinalis*' calli. *J Plant Physiol.* 2007, 164: 1536-1542
- Yesil-Celiktas, O; Sevimli, C; Bedir, E; Vardar-Sukan, F. Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. *Plant Food Hum Nutr.* 2010, 65: 158-163.

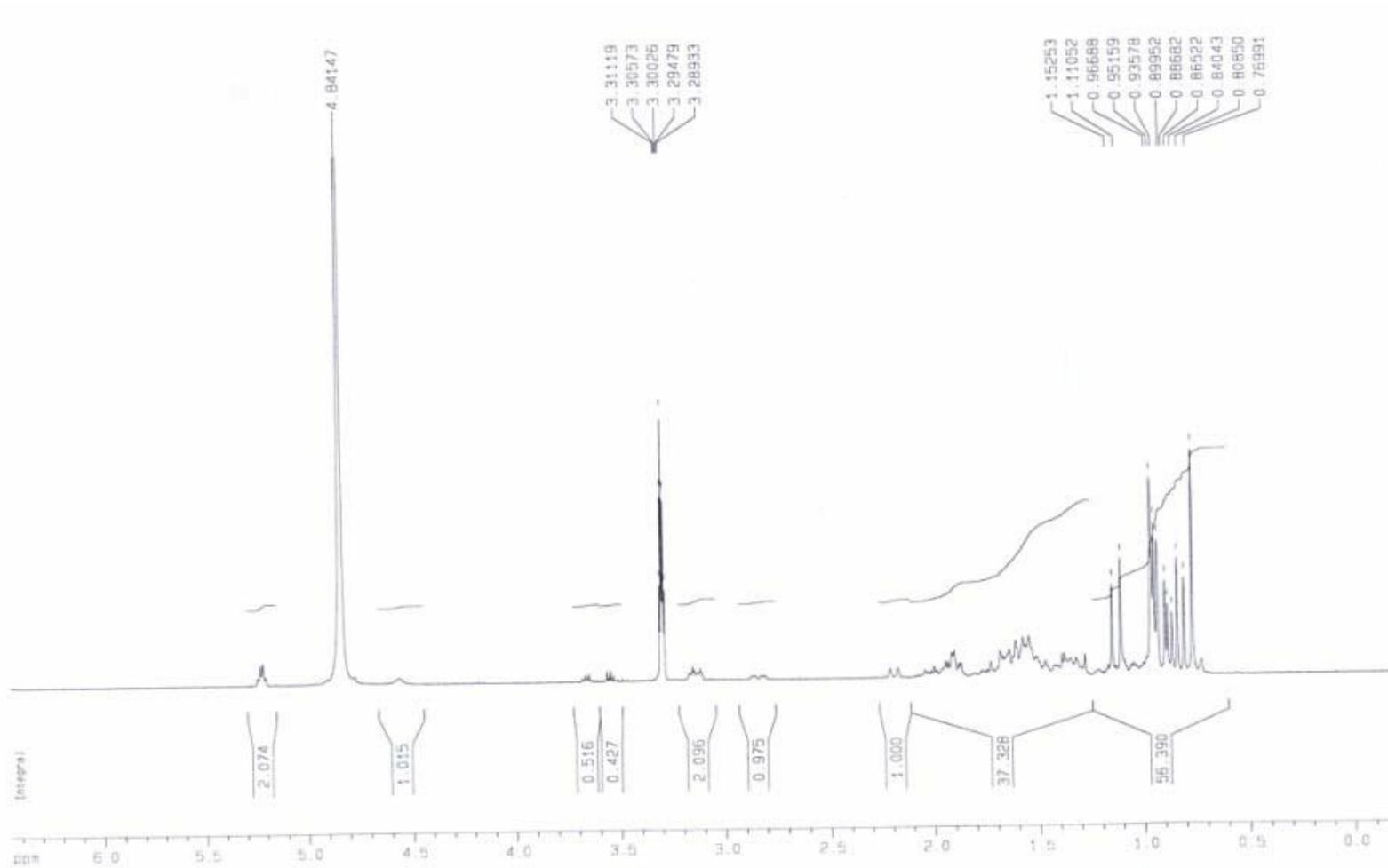
- Zaouali, Y; Bouzaine, T; Boussaid, M. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. Varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem Toxicol.* 2010, 48: 3144-3152.
- Zazueta-Beltrán, J; León-Sicarios, N; Muro-Amador, S; Flores-Glaxiola, A; Velázquez-Roman J; Flores-Villaseñor, H; Canizalez-Roman, A. Increasing drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Sinaloa Mexico, 1997-2005. *Int J Infect Dis.* 2011, 15: 272-276 .

PÁGINAS ELECTRÓNICAS CONSULTADAS.

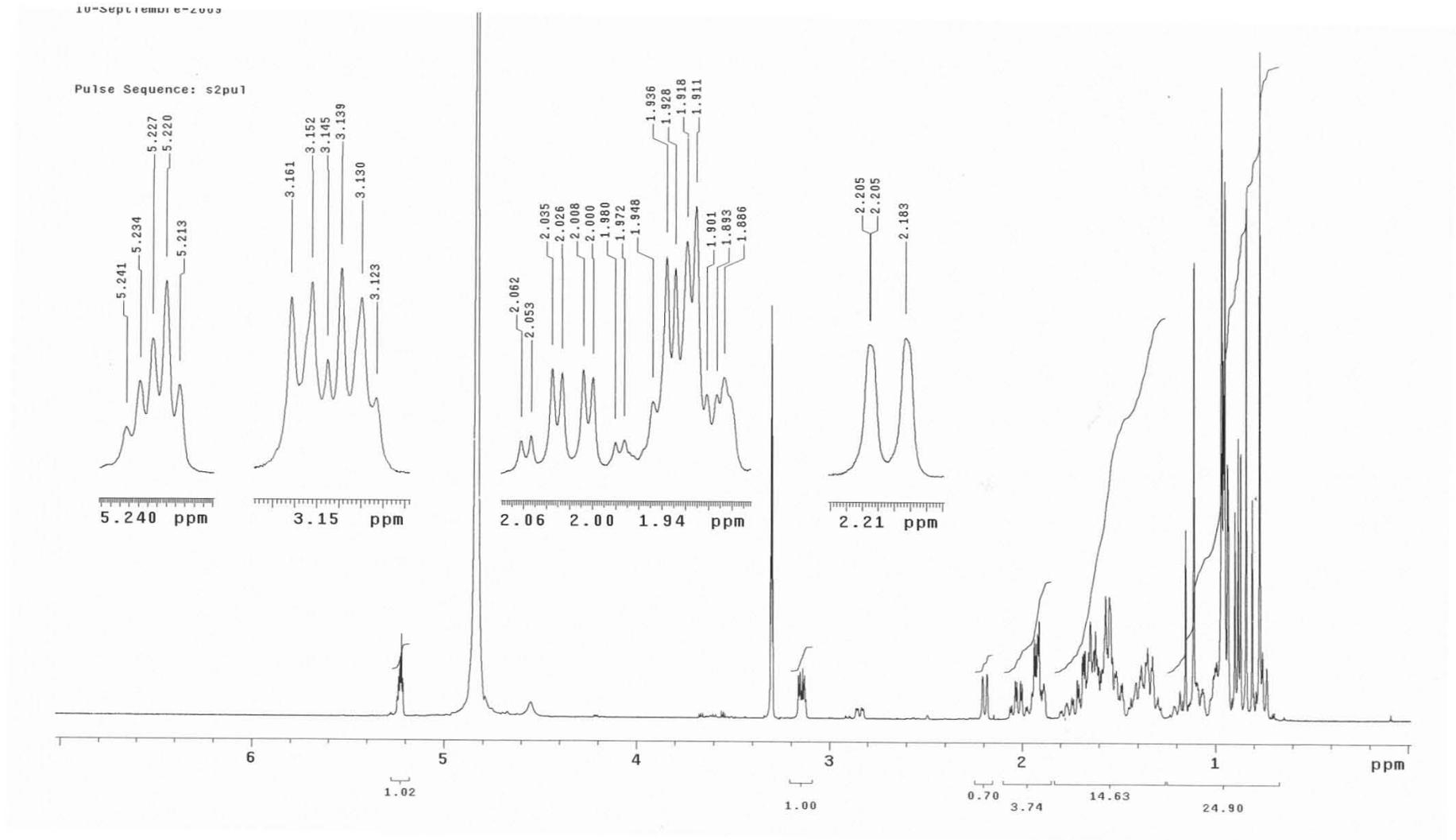
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Romero&id=7455>. Consultada el 17 de septiembre del 2012.

Anexo

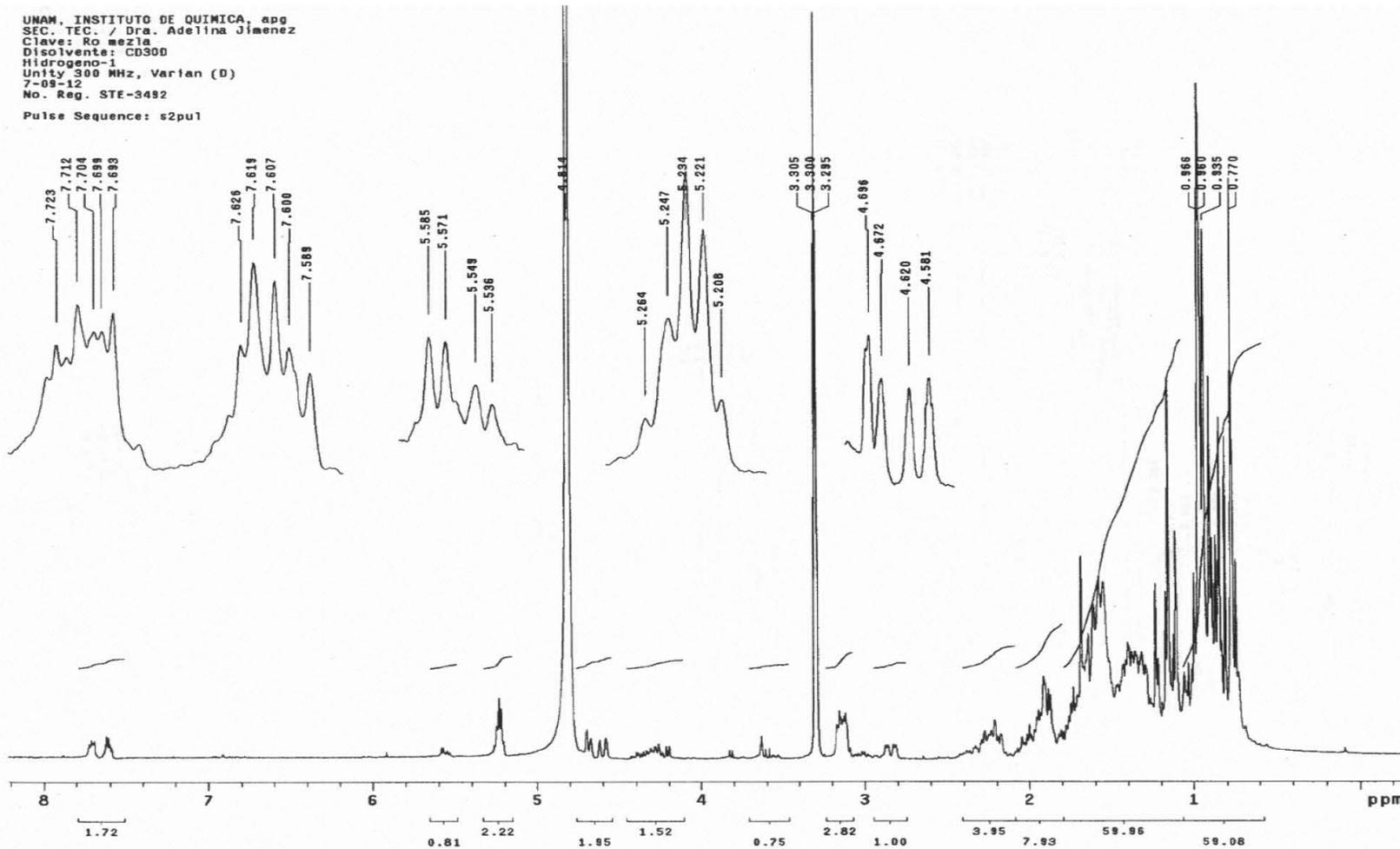
Espectro 1.- Resonancia magnética nuclear protónica (RMN- ^1H) de la mezcla de referencia AU/AO 1:1 (SIGMA).



Espectro 2.- Resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H) de la mezcla de AU/AO 2:1 obtenida de *R. officinalis*



Espectro 3.- Resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H) de la mezcla de AU/AO/ β -sitosterol obtenida de *R. officinalis*.



Espectro 4.- Cromatograma de HPLC de la fracción 58-70, para detección de flavonoides.

Fase móvil fue el sistema de elución isocrático de ácido fosfórico 85.3%:MeOH (9:1, Mallincrot), flujo 0.3 mL/min, volumen de inyección 20 µL, columna Spherisorb ® 10 µm ODS2 (4.6X250 mm, Waters).

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: RO 141
Sample Type: Unknown
Vial: 2:B,1
Injection #: 1
Injection Volume: 10.00 ul
Run Time: 25.0 Minutes
Sample Set Name: Fracciones

Acquired By: marco
Date Acquired: 3/5/12 10:04:51 AM
Acq. Method Set: flavonoides ms
Date Processed: 3/5/12 11:22:32 AM
Processing Method: romero340
Channel Name: WWin Ch1
Proc. Chnl. Descr.: PDA 340.0 nm

