

Información Importante

La Universidad Santo Tomás, informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del catálogo en línea, página web y Repositorio Institucional del CRAI-USTA, así como en las redes sociales y demás sitios web de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan **finalidad académica**, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor, nunca para usos comerciales.

De conformidad con lo establecido en el Artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, la Universidad Santo Tomás informa que “los derechos morales sobre documento son propiedad de los autores, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.”

Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación, CRAI-USTA

Universidad Santo Tomás, Bucaramanga

Determinación de la actividad antibacteriana y fitotoxicidad de los aceites esenciales de Anís (*Pimpinella anisum*) y Romero (*Rosmarinus officinalis*)

Laura Valentina Duarte Velandia

Trabajo de grado para optar por el título de Química Ambiental

Director

Martha Cervantes Díaz

Química M. Sc.

Codirector(es)

Laura Viviana Herrera Sandoval

Bact. Y L. C, M. Sc.

Ricardo Restrepo Manrique

Biólogo, Espec.

Universidad Santo Tomás, Bucaramanga

División de Ingenierías y Arquitectura

Facultad de Química Ambiental

2020

Este proyecto está dedicado a mis padres por ser el pilar más importante, por demostrarme siempre su cariño y por ser ejemplo de perseverancia, esfuerzo, lucha constante y apoyo incondicional.

Agradecimientos

Agradezco principalmente a Dios, por haberme dado la vida y la oportunidad de haber llegado a este momento tan significativo de mi formación profesional.

Agradezco a mi directora Martha Cervantes, y a mis codirectores Ricardo Restrepo y Laura Herrera, por su apoyo y dedicación durante la realización de este proyecto.

Agradezco a mis padres que con esfuerzo y dedicación me ayudaron a culminar mi carrera universitaria, y con su constante apoyo impidieron que me rindiera cuando todo parecía complicado.

Tabla de contenido

1. Determinación de la actividad antibacteriana y fitotoxicidad de los aceites esenciales de Anís (<i>Pimpinella anisum</i>) y Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	15
1.1 Planteamiento del problema.....	15
1.2 Justificación	17
1.3 Objetivos.....	20
1.3.1 Objetivo General.....	20
1.3.2 Objetivos Específicos.....	20
2. Marco Referencial.....	21
2.1 Marco conceptual.....	21
2.1.1 Generalidades de los aceites esenciales.	21
2.1.2 Métodos de obtención y caracterización de los aceites esenciales.	23
2.1.3 Especies vegetales de interés	24
2.1.4 Actividad biológica de los aceites esenciales.	28
2.2 Marco de antecedentes	40
3. Metodología	44
3.1 Obtención y caracterización de los aceites esenciales	45
3.2 Actividad antibacteriana de los aceites esenciales.....	47
3.2.1 Tratamiento de cepas de referencia.....	48
3.2.2 Compuestos de referencia.	49
3.2.3 Rangos de concentración de aceites esenciales y compuestos de referencia.....	50
3.2.4 Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antibacteriana de aceites esenciales.	51
3.3 Determinación de la fitotoxicidad de aceites esenciales.....	53
3.3.1 Preparación de soluciones.....	53
3.3.2 Toxicidad de aceites esenciales en semillas de repollo (<i>Brassica oleracea</i>) y tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	53
3.3.3 Toxicidad de aceites esenciales en bulbos de cebolla (<i>Allium cepa</i>).....	54
4. Consideraciones éticas	56
5. Resultados y análisis	57
5.1 Obtención y caracterización de aceites esenciales.....	57
5.2 Determinación de actividad antibacteriana de aceites esenciales	66
5.2.1 Compuestos de referencia.	66
5.2.2 Evaluación <i>in vitro</i> de actividad antibacteriana de aceites esenciales.	68
5.3 Determinación de fitotoxicidad de aceites esenciales.....	72
5.3.1 Determinación de toxicidad aguda.....	72
5.3.2 Determinación de genotoxicidad.	75
6. Conclusiones	80
7. Recomendaciones	81
Referencias Bibliográficas	82
Apéndices.....	95

Lista de tablas

Tabla 1. Composición química general y actividad biológica de los AE	22
Tabla 2. Información reportada de compuestos mayoritarios del AE de romero	26
Tabla 3. Información reportada de componentes mayoritarios de AE de anís	28
Tabla 4. Condiciones y características de crecimiento de microorganismos a evaluar	49
Tabla 5. Rangos de concentración evaluados para determinación de actividad antibacteriana.	51
Tabla 6. Condiciones de crecimiento para determinación de la actividad antibacteriana de AE de anís y romero frente a <i>P. gingivalis</i> y <i>S. mutans</i>	51
Tabla 7. Porcentaje de rendimientos teóricos y experimentales de los AE obtenidos por hidrodestilación asistida por microondas	58
Tabla 8. Composición química del AE de anís determinada mediante CG-MS	58
Tabla 9. Composición química del AE de romero determinada mediante GC-MS	60
Tabla 10. Resultados de evaluación de actividad antimicrobiana de AE de anís y romero frente a <i>S. mutans</i>	69
Tabla 11. Resultados de evaluación de actividad antimicrobiana de AE de anís y romero frente a <i>P. gingivalis</i>	71
Tabla 12. Determinación de la toxicidad aguda de AE de anís y romero en semillas	73
Tabla 13. Determinación de la toxicidad aguda de AE de anís y romero en bulbos de cebolla ..	74
Tabla 14. Aberraciones cromosómicas presentadas en células de cebolla expuestas a diferentes concentraciones de AE de anís y romero, y a DMSO 0,38% (C+: control positivo)	78

Lista de figuras

Figura 1. <i>Rosmarinus officinalis</i>	25
Figura 2. <i>Pimpinella anisum</i>	27
Figura 3. Ensayo de susceptibilidad por difusión en disco de Kirby-Bauer en <i>Staphylococcus aureus</i> cultivado en agar Mueller-Hinton con tetraciclina, cefalotina, eritromicina, cloranfenicol, vancomicina, penicilina, estreptomycin y novobiocina.	30
Figura 4. Ensayo de bioautografía del extracto de acetato de etilo tubérculos <i>Drynaria quercifolia</i> en <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	31
Figura 5. <i>Streptococcus mutans</i>	33
Figura 6. <i>Porphyromonas gingivalis</i>	34
Figura 7. Estructura química de la vancomicina.	36
Figura 8. Estructura química del metronidazol.	37
Figura 9. Etapas principales de la metodología experimental para la determinación de la actividad antibacteriana y fitotoxicidad de aceites esenciales de <i>Pimpinella anisum</i> y <i>Rosmarinus officinalis</i>	45
Figura 10. Obtención de AE de anís y romero mediante hidrodestilación asistida por microondas.	46
Figura 11. Determinación de la CIM y la CBM de los aceites esenciales de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) y las semillas de anís (<i>Pimpinella anisum</i>).	48
Figura 12. Diseño de siembra en placa Elisa de 96 pozos.	52
Figura 13. Semillas de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>) y repollo (<i>Brassica oleracea</i>) empleadas para la determinación de la fitotoxicidad de los AE de anís y romero.	54
Figura 14. Montaje de semillas de repollo (<i>Brassica oleracea</i>) y tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>) para la evaluación de la toxicidad aguda de los AE de anís y romero.	54
Figura 15. Ensayo de toxicidad aguda y genotoxicidad de AE de anís y romero en <i>A. cepa</i>	55
Figura 16. Espectro IR del metronidazol.	66
Figura 17. Espectro IR de la vancomicina.	67
Figura 18. Elongación de embriones y raíces en los bioindicadores a) repollo (<i>Brassica oleracea</i>) y b) tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>) expuestos a los AE de romero y anís.	73
Figura 19. Elongación del sistema radicular de bulbos de cebolla (<i>Allium cepa</i>) expuestos a diferentes concentraciones de los AE de anís (a) y romero (b).	73
Figura 20. Diagrama del efecto de las soluciones de diferentes concentraciones de AE de anís y romero evaluadas frente al % IM en el sistema radicular de bulbos de cebolla.	75
Figura 21. Diagrama del índice de Aberraciones Cromosómicas causadas en células de cebolla por los AE de anís y romero.	77

Lista de apéndices

Apéndice A. Efecto antibacteriano de compuestos fenólicos (ej. Carvacrol).....	95
Apéndice B. Métodos de determinación de susceptibilidad antimicrobiana.	96
Apéndice C. Aberraciones Cromosómicas presentadas en células de cebolla (<i>Allium cepa</i>).	97
Apéndice D. Diseño experimental de diluciones realizadas para evaluación de actividad antibacteriana de AE.	98
Apéndice E. Corriente iónica total reconstruida (cromatograma) del AE de anís analizado por GC-MS operado en el modo <i>full scan</i>	99
Apéndice F. Corriente iónica total reconstruida (cromatograma) del AE de romero analizado por GC-MS operado en el modo <i>full scan</i>	100
Apéndice G. Fragmentación propuesta para eucaliptol.	101
Apéndice H. Fragmentación propuesta para α -pineno.....	101
Apéndice I. Fragmentación propuesta para borneol.	102
Apéndice J. Fragmentación propuesta para linalool.	102
Apéndice K. Fragmentación propuesta para geraniol.....	103
Apéndice L. Fragmentación propuesta para acetato de bornilo.....	103
Apéndice M. Fragmentación propuesta para <i>trans</i> -anetol.....	104
Apéndice N. Regresión lineal de Dosis-Respuesta de AE de anís y romero frente a bulbos de cebolla.	105

Glosario

Aberraciones Cromosómicas: Cambios cromosomales que pueden sufrir las estructuras genéticas o el total de cromosomas (Restrepo, *et. al*, 2012).

Aceite Esencial: Fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas (Cerutti y Neumayer, 2004).

Actividad antibacteriana: Capacidad de un agente para destruir microorganismos bacterianos (Hernández y Rengel, 2002).

Concentración Bactericida Mínima: Mínima concentración de antimicrobiano que elimina a más del 99,9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación, generalmente 24 horas (Horna, *et. al*, 2005).

Concentración Efectiva Media: Concentración calculada estadísticamente, de una sustancia en el medio, que se espera que produzca un determinado efecto en el 50% de los organismos de experimentación de una población dada, bajo un conjunto de condiciones definidas (Ramírez, 2017).

Concentración Inhibitoria Mínima: Mínima concentración de antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C (Horna, *et. al*, 2005).

Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas: Técnica analítica usada para separar compuestos orgánicos basada en sus volatilidades y diferencias de partición entre las fases móvil y estacionaria, identificar, cuantificar compuestos y elucidar su estructura (Olguín y Rodríguez, 2004; Plascencia, 2003).

Genotoxicidad: Efecto deletéreo generado por la exposición a un agente capaz de interactuar con el ADN u otros blancos celulares que controlan la integridad y el funcionamiento del material genético (Aissa y Boch, 2015).

Hidrodestilación: Método de extracción usado para obtener aceites esenciales de una suspensión acuosa de un material vegetal aromático, esta suspensión se lleva a estado de ebullición de tal manera que los vapores generados pueden ser condensados y recolectados. El aceite, que es inmisible en agua, se separa posteriormente (Albarracín y Gallo, 2003).

Índice Mitótico: Número de células por unidad que sufren mitosis durante un determinado periodo de tiempo de exposición (Restrepo, *et. al*, 2012).

Patógeno: Organismo que tiene la capacidad de causar enfermedad. Esa capacidad depende de factores como la dosis infectante del germen, puerta de entrada al organismo y la susceptibilidad del huésped (Torres, 2002).

Resumen

La resistencia de microorganismos patógenos a los antimicrobianos ha llevado a buscar alternativas para disminuir su acción y los efectos adversos que su uso produce sobre la salud, al aumentar las infecciones y la contaminación en ecosistemas terrestres y acuáticos.

Los Aceites Esenciales (AE) inhiben la acción de los microorganismos por sus propiedades biológicas que dependen de su composición química. Por otra parte, la determinación de la fitotoxicidad de los AE podría aplicarse a otras especies vegetales y animales pudiendo establecer su efecto ecotoxicológico.

Los aceites esenciales de Anís (*Pimpinella anisum*) y Romero (*Rosmarinus officinalis*) se obtuvieron mediante hidrodestilación asistida por microondas y se caracterizaron por CG-MS. La actividad antibacteriana se determinó mediante microdilución en placa, estableciendo la CIM y CBM para dichos aceites frente a *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. La fitotoxicidad se determinó mediante la CE_{50} , usando bioindicadores como semillas de repollo (*Brassica oleracea*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) y bulbos de cebolla (*Allium cepa*); y la identificación de Aberraciones Cromosómicas (AC) en esta última.

Frente a *P. gingivalis*, para el AE de romero, cuyo compuesto mayoritario es eucaliptol (24,7%) se determinó una CIM de 750-1000 $\mu\text{g/mL}$ y CBM de 375-750 $\mu\text{g/mL}$; y para el AE de anís, cuyo máximo componente es *trans*-anetol (92,1%) una CIM de 2000-3000 $\mu\text{g/mL}$ y CBM de 1500 $\mu\text{g/mL}$. Por otra parte, los AE no presentaron actividad frente a *S. mutans* (CIM>2000 $\mu\text{g/mL}$) ni fitotoxicidad en repollo y tomate (CE_{50} >1000 ppm). En cebolla, se determinó una CE_{50} de 5,24 ppm de AE de romero y 27,41 ppm de AE de anís; y se identificaron AC como cromosomas vagabundos y puente en anafase.

Palabras Clave: Aberraciones Cromosómicas (AC), Aceite Esencial (AE), antimicrobiano, bioindicador, genotoxicidad, fitotoxicidad, Concentración Efectiva Media (CE₅₀), Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

Abstract

The resistance of pathogenic microorganisms to antimicrobials has led to find alternatives to reduce its action and the adverse effects that its use produces on health, by increasing infections and pollution in terrestrial and aquatic ecosystems.

Essential Oils (EO) inhibits the action of microorganisms by its biological properties that depend on its chemical composition. On the other hand, the determination of the phytotoxicity of EO could be applied to other plant and animal species and can establish its ecotoxicological effect.

The essential oils of Anise (*Pimpinella anisum*) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) were obtained by microwave-assisted hydrodistillation and characterized by GC-MS. Antibacterial activity was determined by broth microdilution, establishing the MIC and MBC for these EO against *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*. Phytotoxicity was determined by EC₅₀, using bioindicators such as cabbage seeds (*Brassica oleracea*), tomato seeds (*Lycopersicon esculentum*) and onion bulbs (*Allium cepa*); and the identification of Chromosomal Aberrations (CA) on onions.

Against *P. gingivalis*, for rosemary EO, whose majority compound is eucalyptol (24.7%), an MIC of 750-1000 µg/mL and MBC of 1500-2000 µg/mL was determined; and for anise EO, whose maximum component is *trans*-anethole (92.1%) an MIC of 2000-3000 µg/mL and MBC of 3000 µg/mL. On the other hand, EO did not show activity against *S. mutans* (MIC > 2000 µg/mL) or phytotoxicity in cabbage and tomato (EC₅₀ > 1000 ppm). On onion, an EC₅₀ of 5.24 ppm of rosemary EO and 27.41 ppm of anise EO was determined; and CA were identified as vagrant chromosomes and bridge in anaphase.

Key words: Antimicrobial, bioindicator, Chromosomal Aberration, Effective Concentration, Essential Oil, genotoxicity, Minimum Inhibitory Concentration, phytotoxicity.

1. Determinación de la actividad antibacteriana y fitotoxicidad de los aceites esenciales de Anís (*Pimpinella anisum*) y Romero (*Rosmarinus officinalis*)

1.1 Planteamiento del problema

El uso inadecuado de compuestos sintéticos que inhiben la actividad microbiana en el ser humano ha causado una problemática ambiental. Han surgido contaminantes emergentes, que se propagan en los ecosistemas terrestre y acuático. Por un lado, las sustancias metabolizadas de dichos compuestos pueden alcanzar las aguas subterráneas, contaminar acuíferos o quedar retenidas en el suelo, acumulándose y afectando los distintos eslabones de la cadena trófica hasta llegar nuevamente a los seres humanos (Tejada, *et. al*, 2014). Por otro lado, aumentan la contaminación en el recurso hídrico, generando efectos como desequilibrio hormonal en peces (feminización) (OMS, 2017), variación en la composición de los cuerpos de agua, afectación del óptimo funcionamiento de procesos biológicos, efectos tóxicos (estrogénicos, genotóxicos, cancerígenos y teratogénicos), y resistencia antimicrobiana (Tejada, *et. al*, 2014). Esta última, es la causante de una emergencia de salubridad en el ámbito mundial debido a que los microorganismos patógenos causantes de distintas enfermedades agudas, graves y crónicas han mejorado su mecanismo de resistencia frente a agentes antimicrobianos que regulan su proliferación, por consiguiente, convirtiendo el tratamiento de infecciones y enfermedades, e intervenciones quirúrgicas en procedimientos de muy alto riesgo (OMS, 2018).

Según los informes presentados por la OMS, entre los principales microorganismos fármaco-resistentes se encuentran bacterias del género *Enterococcus*, *Helicobacter*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*, y otras de la familia Enterobacteriaceae (OMS, 2017). Actualmente, se les ha dado

mayor importancia a *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia* y *Proteus* que a menudo pueden causar infecciones graves y ser letales (OMS, 2017).

Ahora bien, las bacterias anaerobias son motivo de interés dentro de la microbiología y las enfermedades infecciosas debido a que se han visto afectados por la presión selectiva que ejercen los antimicrobianos usados de manera inadecuada en terapéutica y profilaxis. Entre estas especies se encuentran *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* que actúan en conjunto y son las principales causantes de las lesiones cariosas y otras infecciones orales más graves (Vera, 2014).

Teniendo en cuenta esta problemática, recientemente ha surgido la necesidad de generar opciones enfocadas en el uso sostenible de sustancias de origen vegetal. Dichas alternativas están relacionadas con el uso de Aceites Esenciales (AE), es decir, metabolitos secundarios de las plantas aromáticas (Lizcano y Vergara, 2008). Los AE están constituidos principalmente por terpenos con composición y actividad variada, entre las que se encuentra la capacidad de actuar como agentes antimicrobianos, inhibiendo la acción de microorganismos patógenos (Vega y López, 2009).

Actualmente, la búsqueda de plantas con actividad antimicrobiana ha despertado el interés para evaluar las propiedades de dos especies vegetales muy usadas en la medicina tradicional gracias a sus efectos como anticonvulsivos, relajantes y antiespasmódicos, entre otros (Pino, *et. al*, 2012) (Castaño, *et. al*, 2010). Se trata de anís (*Pimpinella anisum*) y romero (*Rosmarinus officinalis*), especies ricas en metabolitos activos. Sus aceites esenciales son considerados como potenciales antimicrobianos naturales contra diferentes cepas infecciosas (Pino, *et. al*, 2012) (Castaño, *et. al*, 2010). Sin embargo, la susceptibilidad de microorganismos patógenos como *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* frente a los AE de anís y romero, ha sido escasamente estudiada, y es importante debido a que, a pesar de la amplia disponibilidad de antibióticos de uso clínico, estas bacterias han presentado resistencia frente a agentes antimicrobianos entre los que se encuentran,

metronidazol, amoxicilina, clindamicina (Bonilla, *et. al*, 2016) y vancomicina, utilizada como último recurso para el combate de infecciones provocadas por estos microorganismos (Quijano, 2016). Además, el efecto fitotóxico de dichos AE frente a bioindicadores como repollo, tomate y cebolla también es poco estudiado.

1.2 Justificación

Hoy en día, la crisis mundial relacionada con la ineficacia de los agentes antimicrobianos sintéticos frente a microorganismos patógenos ha conducido a los investigadores a buscar alternativas de origen natural que inhiban o afecten el crecimiento de estos, pudiendo ser promisorios como antimicrobianos. Tales investigaciones se han basado en los AE obtenidos de plantas medicinales y aromáticas debido a sus distintas propiedades biológicas entre las que se encuentran antibacteriana, antifúngica y antiviral (Kumara, *et. al*, 2016).

Entre los AE más estudiados se encuentran los obtenidos a partir de las plantas de *Pimpinella anisum* y *Rosmarinus officinalis* pertenecientes a las familias Lamiaceae y Apiaceae, debido a que exhiben diferentes actividades biológicas relacionadas con la variedad de componentes presentes en cada uno de ellos. Una de las propiedades más estudiadas en los AE de anís y romero, es el potencial antimicrobiano que pueden ejercer frente a diferentes especies microbianas.

Estudios preliminares han confirmado que el AE de romero inhibe fuertemente la actividad de todas las cepas clínicas de *E. coli*, y otras bacterias como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Aeromonas hydrophila* y *Salmonella choleraesuis* (Nieto, *et. al*, 2018). En adición, numerosos autores han destacado la importancia de la composición química y la proporción entre los componentes del AE en su eficacia antimicrobiana frente a bacterias como *E.*

coli, *L. monocytogenes*, *S. aureus* (Nieto, *et. al*, 2018), *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermis* y *Bacillus subtilis*, y hongos: *Candida albicans* y *Aspergillus niger* (Bonilla, *et. al*, 2016).

Por otra parte, estudios preliminares acerca de la actividad antimicrobiana del AE de anís demostraron que este es activo frente a bacterias como *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *E. coli* (ATCC 8739) y *Micrococcus luteus* (ATCC 9341) (Khalil, *et. al*, 2018), *P. aeruginosa* y *B. subtilis*, exhibiendo su actividad frente a bacterias patógenas Gram-negativas y Gram-positivas (Foroughi, *et. al*, 2016).

Es promisorio realizar pruebas de los AE de anís y romero frente a *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* debido a la escasez de reportes acerca de la actividad de estos aceites y teniendo en cuenta, que en ambos están presentes diversos compuestos con actividad antibacteriana reconocida.

Cabe resaltar que el trabajo representa continuidad en la línea de investigación de Bio-orgánica y de Productos Naturales contribuyendo con datos relevantes para proyectos preliminares en los cuales también se ha estudiado su actividad antimicrobiana frente a distintos microorganismos y aportando conocimientos microbiológicos desde la perspectiva de la química ambiental (Quintero y Rangel, 2016) (Torres y Torres, 2018). Además, el uso de sustancias de origen natural podría contribuir con el control no solo de microorganismos patógenos sino también con el control de otras especies (plantas, hongos, animales) considerados como plagas disminuyendo el impacto sobre la salud y medio ambiente (Nava, *et. al*, 2012).

El efecto de los aceites esenciales sobre otras especies se debe a la presencia de aleloquímicos, sustancias químicas responsables de influir en el crecimiento, supervivencia o reproducción de otros organismos. Tal es el caso de la fitotoxicidad, en el cual un compuesto presente en una

planta tiene la capacidad de causar daños temporales o duraderos a otras plantas, cuando ocurre una interacción entre ellas.

Teniendo en cuenta esto, establecer la fitotoxicidad de los AE obtenidos a partir de las plantas aromáticas *Pimpinella anisum* y *Rosmarinus officinalis* es un estudio realmente prometedor, debido a que los aleloquímicos presentes en estos aceites generalmente presentan baja toxicidad y citotoxicidad, (Santana, *et. al*, 2018). Además, los bioensayos realizados en semillas han sido recomendados y aplicados por diferentes organismos de protección ambiental para la evaluación ecotoxicológica de muestras ambientales y la evaluación del efecto fitotóxico de diferentes sustancias sobre especies no blanco (Sobrero y Ronco, 2004).

Así mismo, el estudio es de gran relevancia debido a que informa las posibles alteraciones de cromosomas causadas por sustancias mutagénicas en la composición de estas o como resultado de su metabolismo. Estos mutágenos pueden detectarse citológicamente por inhibición celular, que además se verá reflejado en la inhibición de la elongación del sistema radicular de las plantas, interrupción en la metafase e inducción de aberraciones cromosómicas, hecho demostrado mediante el *test* de *Allium cepa*, cuyos resultados son similares y comparables con los datos registrados para las líneas celulares animales (Tedesco y Laughinghouse IV, 2012). Estos resultados también permiten la cuantificación del impacto ecotoxicológico que puede tener una sustancia sobre un ecosistema, a través de la evaluación del riesgo de los agentes genotóxicos presentes en el ambiente, cuya interacción con el material genético puede alterar la integridad del genoma humano (Vera, 2009).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Evaluar la actividad antibacteriana y fitotóxica de aceites esenciales obtenidos de Anís (*Pimpinella anisum*) y Romero (*Rosmarinus officinalis*) con el fin de determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) en *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans*; y la Concentración Efectiva Media (CE₅₀) en *Lycopersicon esculentum*, *Brassica oleracea* y *Allium cepa*, respectivamente.

1.3.2 Objetivos Específicos

- (Obtener y caracterizar los aceites esenciales de *P. anisum* y *R. officinalis* mediante hidrodestilación asistida por microondas y por cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (CG-MS), respectivamente.
- Determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) de los aceites esenciales obtenidos frente a los microorganismos patógenos *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* empleando el método de microdilución en placa.
- Evaluar la fitotoxicidad de los aceites esenciales de *P. anisum* y *R. officinalis* mediante la determinación de la CE₅₀ e Índice Mitótico (IM), así como también la identificación de Aberraciones Cromosómicas (AC), empleando como bioindicadores semillas de repollo (*Brassica oleracea*) y tomate (*Lycopersicon esculentum*) y bulbos de cebolla (*Allium cepa*).

2. Marco Referencial

2.1 Marco conceptual

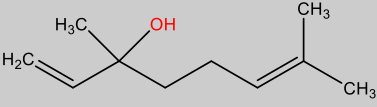
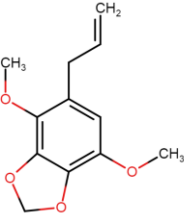
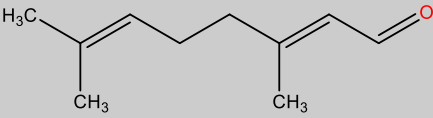
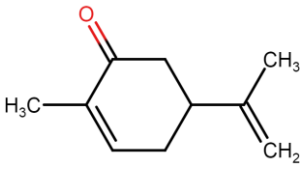
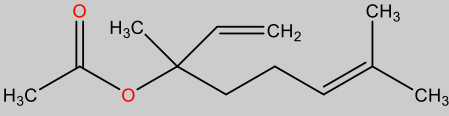
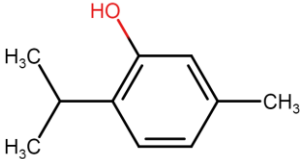
2.1.1 Generalidades de los aceites esenciales.

Los aceites esenciales son una mezcla de más de 300 de sustancias volátiles, producto del metabolismo secundario de las plantas (Flores, 2010). Son solubles en alcohol, éter y otros aceites, pero insolubles en agua. Son generalmente líquidos e incoloros a temperatura ambiente. Tienen un olor característico, una densidad inferior a la unidad, y un índice de refracción y actividad óptica muy alta (Dhifi, *et. al*, 2016).

Los AE son responsables del olor de distintas partes de la planta (flores y semillas) o de la planta completa, y pueden ser obtenidos de las flores, hojas, rizomas, raíces, corteza, semillas o cáscara del fruto de diferentes especies vegetales (Montoya, 2010). Estos son productos químicos ampliamente utilizados en las industrias cosmética, farmacéutica (principio activo de medicamentos) y alimenticia, perfumería y aromaterapia. En este último, los AE son utilizados en una técnica que incluye masajes, inhalaciones o baños (Dhifi, *et. al*, 2016).

Los aceites esenciales se localizan en el citoplasma de ciertas células secretoras vegetales (tricomas secretores), encontradas en uno o más órganos de la planta. Los AE consisten en compuestos orgánicos volátiles, generalmente de bajo peso molecular, pertenecientes a diferentes grupos químicos, principalmente terpenos, alcoholes, éteres u óxidos, aldehídos, cetonas, ésteres, aminas, amidas y fenoles (Dhifi, *et. al*, 2016). Así pues, los AE brindan una amplia variedad de aromas, relacionados con la presencia de los diferentes grupos químicos, que, a su vez, son responsables de sus propiedades biológicas (tabla 1).

Tabla 1. Composición química general y actividad biológica de los AE

Grupo funcional	Ejemplo	Estructura química ¹	Propiedad biológica reportada ²	Cita bibliográfica
Alcohol	Linalool		Antibacteriana, antioxidante, antiinflamatoria, citotóxica	¹ Dhifi, <i>et. al</i> , 2016 ² Duke, 2019
Éter	Apiol		Antiespasmódica, diurética, insecticida, pesticida	¹ Razzaghi-Abyaneh, <i>et. al</i> , 2007 ² Duke, 2019
Aldehído	Geranial		Antibacteriana, antitumoral, quimiopreventivo, fungicida, pesticida	¹ Dhifi, <i>et. al</i> , 2016 ² Duke, 2019
Cetona	Carvona		Carminativa, fungiestático, insecticida, perfumería, pesticida	¹ Demirci, <i>et. al</i> , 2004 ² Duke, 2019
Éster	Acetato de linalilo		Anestésica, antioxidante, antiespasmódica, perfumería	¹ Elsharif, <i>et. al</i> , 2015 ² Duke, 2019
Fenol	Timol		Acaricida, analgésica, antibacteriana, antiinflamatoria, fungicida	¹ Salehi, <i>et. al</i> , 2017 ² Duke, 2019

Nota: ¹ Cita bibliográfica de estructura química. ² cita bibliográfica de actividad biológica reportada de componentes presentes en los AE.

2.1.2 Métodos de obtención y caracterización de los aceites esenciales.

Los aceites esenciales son extraídos del material vegetal a través de distintos métodos como: la destilación por arrastre de vapor y la hidrodestilación asistida por microondas. A continuación, se realiza una breve descripción de cada método.

La *destilación por arrastre de vapor* se lleva a cabo mediante la vaporización selectiva del componente volátil de una mezcla formada por éste y otros compuestos no volátiles. Se realiza por medio de la inyección del vapor de agua (vapor de arrastre) en el seno de la mezcla, donde el componente volátil se condensa formando otra fase inmiscible que cederá su calor a la mezcla para lograr su evaporación. Durante la destilación hay la presencia de dos fases inmiscibles (orgánica y acuosa), por lo que cada líquido se comporta como si el otro no estuviera presente, cada uno ejerciendo su propia presión de vapor, permitiendo la separación del producto y del agua fácilmente (Peredo, *et. al*, 2009).

La *hidrodestilación asistida por microondas* consiste en sumergir en agua el material vegetal, donde el AE se encuentra en los tricomas glandulares de la planta (Ávalos y Pérez, 2009). Estos son irradiados por microondas que interactúan selectivamente en el líquido, causando un aumento de la temperatura dentro de la muestra y provocando la ruptura de las paredes glandulares donde se encuentra el AE, seguido de la evaporación del agua y el AE. Lo anterior permite que las tasas de extracción sean más altas y rápidas. En adición, otro factor importante en la rápida extracción del AE se debe al fenómeno de polarización relacionado con la orientación de los dipolos magnéticos de las moléculas de agua en presencia del campo electromagnético generado por la radiación microondas (Farhat, *et. al*, 2009). Además, ha demostrado ser química y ambientalmente eficiente debido a que mantiene la composición química de los compuestos volátiles, elimina el

uso de solventes tóxicos y disminuye la degradación térmica y pérdida de compuestos ocasionada por el tiempo extenso de extracción (Guarín y Barajas, 2015).

Una vez extraído el AE es necesario determinar sus propiedades físicas (solubilidad, densidad, olor y color, entre otras), biológicas (antioxidante y antimicrobiana, entre otras) y composición química con el fin de lograr una identificación única del aceite. La determinación de esta última, del AE se realiza comúnmente mediante la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-MS) puesto que combina el principio de estas dos técnicas, es decir, la capacidad de separación de compuestos junto con la identificación cualitativa y cuantitativa de cada uno de ellos debido a que proporciona un espectro característico de cada componente y mide su concentración (Gutiérrez y Droguet, 2002).

2.1.3 Especies vegetales de interés

A continuación, se describirán brevemente las especies vegetales de interés para el desarrollo de este trabajo de grado.

2.1.3.1 *Rosmarinus officinalis*

Rosmarinus officinalis (figura 1) conocido popularmente como romero, es una planta mediterránea, arbustiva aromática, perteneciente a la familia Lamiaceae, que puede alcanzar los 2 m de altura, tiene tallos prismáticos, hojas estrechas, perennes, agudas y pequeñas en forma de espigas de color verde brillante. Sus flores son de color blanco, azul o morado y están agrupadas en pequeños racimos axilares y terminales, y sus frutos son aquenios obovales, sésiles y de color marrón (Ávila, *et. al*, 2011).



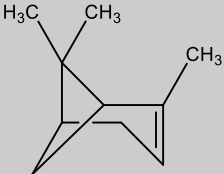
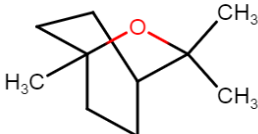
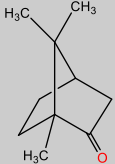
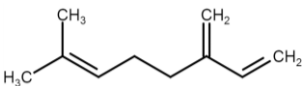
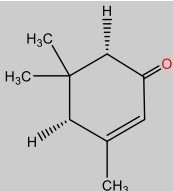
Figura 1. *Rosmarinus officinalis*.

Adaptado de: “Primer plano de floración Rosemary (*Rosmarinus officinalis*)”, por Chertok, 2005-2019.

El romero crece en zonas secas, áridas y soleadas, y se desarrolla sobre casi todos los suelos, aunque prefiere los calizos. Se distribuye por la cuenca del Mediterráneo, tanto en el Sur de Europa como en el Norte de África y Suroeste de Asia (Mendiola y Montalbán, 2009). El producto más estudiado de esta especie es su aceite esencial cuya composición depende del lugar geográfico donde crezca la planta bajo condiciones de tipo de suelo, clima y altura sobre el nivel del mar (Ávila, *et. al*, 2011).

En el AE de romero se han reportado diversos compuestos químicos presentes a diferentes concentraciones y agrupados de manera general en ácidos fenólicos, flavonoides, ácidos triterpénicos y alcoholes triterpénicos, cuya presencia le concede al AE diferentes propiedades biológicas, tal y como se observa en la tabla 2 (Ávila, *et. al*, 2011).

Tabla 2. Información reportada de compuestos mayoritarios del AE de romero

Composición química	Estructura química ¹	Concentración reportada (%) ²	Actividad biológica reportada ²	Citas Bibliográficas
α-pineno		7,9-25	Aleloquímico, antibacterial, herbicida, pesticida	¹ Rivas, <i>et. al</i> , 2012 ² Duke, 2019
Eucaliptol		14,5-15,3	Antibacterial, insecticida, fungicida, pesticida	¹ Bhowal y Gopal, 2016 ² Duke, 2019
Alcanfor		1,8-9,3	Alelopática, fungicida, herbicida	¹ Chen, <i>et. al</i> , 2013 ² Duke, 2019
Mirceno		17,9-29,5	Antibacterial, fungicida, pesticida	¹ Cunha y Gandini, 2010 ² Duke, 2019
Verbenona		0,6	Alelopática, fungicida, pesticida	¹ Melka, <i>et. al</i> , 2018 ² Duke, 2019

Nota: ¹ Cita bibliográfica de la estructura química, ² Cita bibliográfica de las concentraciones y actividades biológicas reportadas para cada componente.

2.1.3.2 *Pimpinella anisum*

Pimpinella anisum (figura 2) comúnmente conocido como anís, es una hierba aromática de la familia Apiaceae, originaria de Asia Suroccidental y la cuenca mediterránea oriental (Pino, *et. al*, 2012). Es una planta herbácea anual, de raíz fusiforme; tallo erecto, cilíndrico, ramificado de color verde claro, pubescente, que puede alcanzar una altura media de 60 cm. Sus flores son pequeñas y

de color blanco. Su fruto es un grano seco pequeño, pubescente, constituido por dos mitades de forma piriforme, puede ser de color castaño claro o castaño oscuro (Sánchez, 2013).



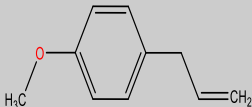
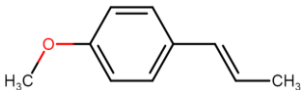
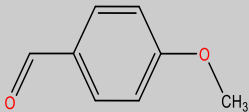
Figura 2. *Pimpinella anisum*.

Adaptado de: “*Pimpinella anisum*”, por Ecosostenible, 2017.

El anís es propio de las regiones templadas y cálidas. Se cultiva en países como España, Italia, Grecia, Siria, Egipto, Turquía, India, México y Argentina. Se adapta bien a diferentes tipos de suelo, preferentemente los profundos, permeables, bien drenados, livianos, de textura franco-arenosa. Las zonas aptas son las que presentan clima templado, cálido-seco, alta luminosidad y poca precipitación (Sánchez, 2013).

El AE de los frutos del anís contiene diferentes compuestos que se ven relacionados con diferentes propiedades biológicas. Tanto su aceite esencial como sus extractos etanólicos han demostrado una fuerte actividad bactericida y fungicida (Shojaii y Abdollahi, 2012). La información de sus componentes mayoritarios (cantidad relativa y actividad biológica) se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Información reportada de componentes mayoritarios de AE de anís

Composición química	Estructura química ¹	Concentración reportada (%) ²	Actividad biológica reportada ³	Citas bibliográficas
trans-anetol		80-95	Antigenotóxico, antioxidante	¹ Velasco, <i>et. al</i> , 2015 ² Leyton, <i>et. al</i> , 2016 ³ Duke, 2019
Metil-chavicol		2,4	Insecticida, antimutagénica	¹ Silva, <i>et. al</i> , 2018 ² Özcan y Chalchat, 2006 ³ Duke, 2019
Anisaldehído		0,1	Antimutagénica, fungicida, insecticida, pesticida	¹ Sigma-Aldrich, 2019 ² Özcan y Chalchat, 2006 ³ Duke, 2019

Nota: ¹ Cita bibliográfica de la estructura química, ² Cita bibliográfica de la concentración reportada, ³ Cita bibliográfica de la actividad biológica reportada.

2.1.4 Actividad biológica de los aceites esenciales.

Actualmente, se tienen en cuenta diferentes propiedades biológicas que presentan los aceites esenciales dependiendo de su composición química, entre las que se encuentran la citotoxicidad, fitotoxicidad, actividad antimutagénica, anticancerígena, antioxidante, antifúngica, antiinflamatoria y antibacteriana, entre otras (Pino, 2015).

2.1.4.1 Actividad antibacteriana de los aceites esenciales.

La actividad antibacteriana hace referencia a la habilidad específica o capacidad de un producto de lograr un efecto deseado frente a un determinado microorganismo: inhibición de la multiplicación bacteriana, cuando se trata de un efecto bacteriostático o muerte de estos microorganismos cuando se refiere a un efecto bactericida (Pedraza y Castellanos, 2009). La actividad antibacteriana de los AE se debe principalmente a la presencia de compuestos fenólicos en ellos. Los AE con mayor efecto antibacteriano son aquellos en los que la proporción de compuestos fenólicos es mayor. Sin embargo, en su mecanismo de acción se debe considerar la gran variedad de compuestos químicos presentes, cuyas actividades antibacterianas no presentan un mecanismo específico. En general, la acción de los AE tiene lugar en la membrana celular (apéndice A) al interferir en la bicapa de fosfolípidos, causando el incremento de su permeabilidad y pérdida de los constituyentes celulares, debido a que destruye el sistema de enzimas incluyendo las que implican la producción de energía celular y respiración bacteriana, cuando se trata de bajas concentraciones de AE. Por otra parte, a altas concentraciones, los AE pueden provocar daños severos de los componentes estructurales de la célula bacteriana, como la pérdida de homeóstasis o destrucción del material genético, dando lugar a la muerte celular (Torrenegra, *et. al*, 2017).

La actividad antibacteriana puede ser determinada mediante diferentes métodos (apéndice B) clasificados en difusión, bioautografía y dilución en caldo (macrodilución y microdilución). Sin embargo, estos no son igualmente sensibles ni se basan en los mismos principios, lo que afecta directamente los resultados obtenidos. A continuación, se explican brevemente cada uno de los métodos.

El *método de difusión* (figura 3) consiste en depositar en la superficie de una placa de agar previamente inoculada, discos de papel filtro impregnados con las sustancias a analizar. Tan pronto

el disco se pone en contacto con la superficie del agar, el filtro absorbe agua y la sustancia difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24h de incubación, se podrá observar o no una zona de inhibición de crecimiento bacteriano (Taroco, *et. al*, 2008).

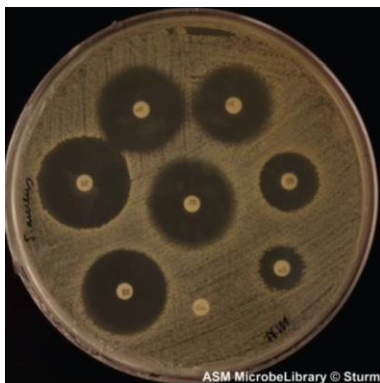


Figura 3. Ensayo de susceptibilidad por difusión en disco de Kirby-Bauer en *Staphylococcus aureus* cultivado en agar Mueller-Hinton con tetraciclina, cefalotina, eritromicina, cloranfenicol, vancomicina, penicilina, estreptomina y novobiocina.

Adaptado de: “Harnessing the Power of Microbes as Therapeutics: Bugs as Drugs: Report on an American Academy of Microbiology Colloquium held in San Diego, CA, in April 2014”, por Weiman, 2015.

El *método de bioautografía* (figura 4) es una herramienta para la purificación de sustancias antibacterianas. Consiste en colocar las muestras a evaluar en placas de cromatografía delgada, seleccionando la fase móvil más adecuada. A continuación, la placa se coloca de forma invertida sobre una caja Petri previamente inoculada con el microorganismo a evaluar, se deja 8-12h en la nevera para facilitar la difusión, se retira la placa y se lleva a incubación. Por último, se observa el halo de inhibición donde está el compuesto activo (Ramírez y Marín, 2009).

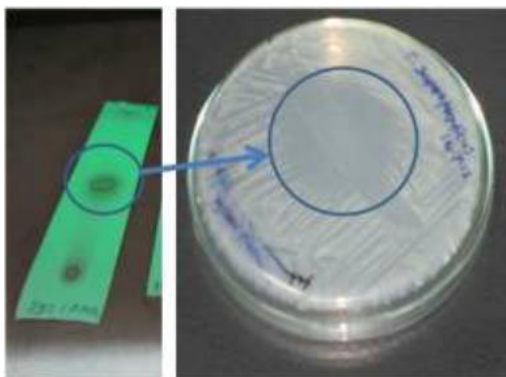


Figura 4. Ensayo de bioautografía del extracto de acetato de etilo tubérculos *Drynaria quercifolia* en *Staphylococcus saprophyticus*.

Adaptado de: “Cataractostatic Activity of *Drynaria quercifolia* Tuber Extract”, por Kobad, *et. al*, 2017.

El método de dilución en caldo se lleva a cabo por macrodilución o microdilución. Las dos técnicas consisten en inocular tubos de ensayo (13 x 100 mm) o microplacas (96 pocillos) exponiendo a las cepas a diferentes concentraciones de antimicrobianos, en diluciones a la mitad y observar el crecimiento de los microorganismos para luego definir la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) (Taroco, *et. al*, 2008).

Actualmente, el método de microdilución en caldo, como *test* de susceptibilidad microbiana es el más utilizado, debido a la reducción de la cantidad usada en el compuesto a evaluar, para establecer la CIM, definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) definida como la concentración más baja del bactericida que elimina más del 99,9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación (Acosta, *et. al*, 2011).

La determinación de la CIM se define por turbidez, el pozo que contenga la menor concentración del compuesto que inhibe completamente el crecimiento define la CIM. El método

presenta ventajas sobre otros métodos debido a que se necesitan pequeñas cantidades de aceite esencial, al ser utilizadas placas de 96 pocillos (12 mm x 8 mm), en las que se pueden evaluar varias de AE con concentraciones crecientes en cada pozo, y, además, evaluar controles de crecimiento y esterilidad. El método de microdilución en placa presenta una alta sensibilidad para cantidades pequeñas, aspecto muy importante a la hora de trabajar con productos naturales (Ramírez y Marín, 2009).

La determinación de la CBM se realiza posterior a la determinación de la CIM, y se comprueba sembrando cada una de las diluciones en agares selectivos y no selectivos, que dependen del microorganismo en estudio. El método estandarizado para establecer la CBM a través de microdilución en caldo se encuentra en el protocolo de NCCLS M7-A9 (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*, por su significado en inglés) (NCCLS, 2012). En los bioensayos de actividad antibacteriana es necesario tener en cuenta el tipo de microorganismo a evaluar, junto con sus características morfológicas y condiciones de crecimiento (Ramírez y Marín, 2009).

2.1.4.1.1 Microorganismos de interés.

Las bacterias son microorganismos unicelulares, capaces de reproducirse mediante fisión binaria, replicando al mismo tiempo su ADN, de forma que las células hijas contienen cada una un duplicado idéntico del genoma de la progenitora. Su tamaño oscila entre las 0,5 y 3 μm , pudiendo llegar en algunos tipos a 10 μm . Las bacterias de interés médico tienen un tamaño entre 0,4 y 2 μm por lo que solo son visibles, al microscopio óptico o electrónico (Pirez y Mota, 2008). Vistas al microscopio, presentan tres formas básicas: cocos, bacilos y espirilos, cada una de ellas con distintas características (Vargas, 2014). En cuanto a su respiración, las bacterias se pueden clasificar en aerobias, cuando el oxígeno es el aceptor final de electrones; anaerobias, cuando los

aceptores finales de electrones son nitratos o sulfatos; y facultativas, cuando pueden usar los dos tipos de respiración (Molina y Uribarren, 2017).

Actualmente, la resistencia de las bacterias anaerobias a los antimicrobianos es creciente, incluso frente a los más activos como metronidazol y carbapenémicos. (García, *et. al*, 2014). En el hombre, el hábitat de estas bacterias está limitado a zonas corporales donde la presencia de oxígeno es baja. Son particularmente frecuentes en la cavidad bucal, en donde generalmente predomina la presencia de los cocos Gram-positivos *Streptococcus mutans* y los bacilos Gram-negativos *Porphyromonas gingivalis* (Brescó, *et. al*, 2006). Dichas bacterias son causantes de enfermedades orales, sistémicas y graves. Las características morfológicas y condiciones de crecimiento de estos microorganismos se presentan en la tabla 4.

Streptococcus mutans (figura 5), es un coco Gram-positivo, dispuesto en cadena, no móvil, catalasa negativo, anaerobio facultativo. Su hábitat natural es la boca humana, aunque puede aislarse frecuentemente de heces en humanos y ratas (Ojeda, *et. al*, 2013).

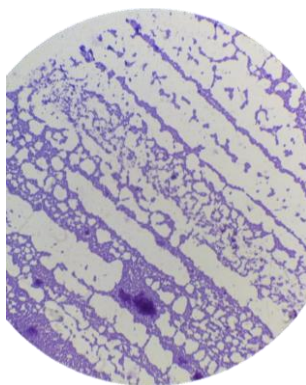


Figura 5. *Streptococcus mutans*.

Nota: Morfología de ATCC 25275 de *S. mutans* observada en microscopio (OLYMPUS CX23, modelo CX23LEDRFS1) a 100X disponible en el Laboratorio de Investigación y Ciencias Básicas de la Universidad Santo Tomás, seccional Bucaramanga.

En la cavidad oral, las colonias de *Streptococcus mutans* se adhieren muy cerca de la superficie del diente y constituyen la primera causa de caries dental (Ojeda, *et. al*, 2013). Además, se ve relacionado con infecciones graves tales como bacteriemia y endocarditis bacteriana (Porte, *et. al*, 2009). Con el fin de controlar las bacteriemias y prevenir las infecciones causadas por *S. mutans* se usan antimicrobianos tales como amoxicilina, clorhexidina, clindamicina, penicilina y vancomicina. Este último es uno de los antimicrobianos más utilizados para combatir la acción de este microorganismo (Palomer, 2006).

Por otra parte, *Porphyromonas gingivalis* (figura 6) es un cocobacilo Gram-negativo, anaerobio, no móvil, asacarolítico, es decir, que su nutrición depende de pequeños péptidos y aminoácidos y requiere de hemina como fuente de hierro (Moreno y Contreras, 2013). Ahora bien, *P. gingivalis* ha sido ampliamente asociada con el inicio, progresión y severidad de las enfermedades periodontales (Díaz, *et. al*, 2012). Además, puede entrar en el torrente sanguíneo, lo que contribuye con el desarrollo de enfermedades sistémicas. Estudios en animales han demostrado que *P. gingivalis* puede inducir y exacerbar una condición similar a la artritis reumatoide, y también se encuentra asociada con la función renal alterada (Anguiano y Zerón, 2015). En adición, investigaciones recientes han descubierto que *P. gingivalis* es capaz de invadir e inflamar las regiones cerebrales afectadas por Alzheimer (Dominy, *et. al*, 2019).

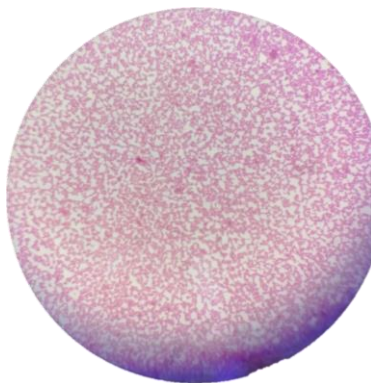


Figura 6. *Porphyromonas gingivalis*.

Nota: Morfología de ATCC 33277 DE *P. gingivalis* observada en microscopio (OLYMPUS CX23, modelo CX23LEDRFS1) a 100X disponible en el Laboratorio de Investigación y Ciencias Básicas de la Universidad Santo Tomás, seccional Bucaramanga.

El tratamiento de estas patologías se lleva a cabo mediante el uso de antibacterianos como clindamicina, amoxicilina, azitromicina, quinolona y metronidazol, entre otros. Este último, es uno de los agentes bactericidas más usados en el tratamiento de la periodontitis severa y otras infecciones provocadas por esta especie bacteriana (Gamboa, *et. al*, 2014). *P. gingivalis* ha presentado resistencia frente al uso de clindamicina y ciprofloxacina, y en algunos casos al metronidazol (Jaramillo, *et. al*, 2008) por lo que algunos investigadores han propuesto la combinación de metronidazol y amoxicilina para el tratamiento de periodontitis crónica asociada con *P. gingivalis*. Sin embargo, otros investigadores sugieren que este tratamiento podría afectar negativamente a los pacientes infectados con esta bacteria (Palmier, 2013).

2.1.4.1.2 Compuestos de referencia.

Los antibióticos betalactámicos son los de uso más frecuente en patología infecciosa debido a su eficacia, espectro y seguridad. Sin embargo, su descripción está limitada por la resistencia bacteriana y por la aparición de reacciones adversas (Feijoo, *et. al*, 2016). Por tal motivo, actualmente son usados antimicrobianos de otros grupos entre los que se encuentran glicopéptidos y nitroimidazoles, que actúan a través de la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana y del ADN, respectivamente, siendo activos frente a las bacterias de interés (Brandariz, *et. al*, 2018) (Pérez e Iglesias, 2003).

La vancomicina (figura 7), cuyo nombre IUPAC es (1S, 2R, 18R, 19R, 22S, 25R, 28R, 40S)-48-[(2S, 3R, 4S, 5S, 6R)-3-[(2S, 4S, 5S, 6S)-4-amino-5-hidroxi-4,6-dimetiloxan-2-il]oxi-4, 5-

dihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxi-22-(2-amino-2-oxoetil-5, 15-dicloro-2, 18, 32, 35, 37-pentahidroxi-19-[[[(2R)-4-metil-2-(metilamino)pentanoil]amino]-20, 23, 26, 42, 44-pentaoxo-7, 13-dioxa-21, 24, 27, 41, 43-pentazaotciclo[26. 14. 2. 23, 6. 214, 17. 18, 12. 129, 33. 010, 25. 034, 39]pentaconta-3, 5, 8 (48), 9, 11, 14, 16, 29 (45), 30, 32, 34 (39), 35, 37, 46, 49.pentadecaeno-40-ácido carboxílico; es un glicopéptido tricíclico con dos unidades de β -hidroxiclorotirosina, tres anillos de fenilglicina sustituidos y la amida del ácido aspártico (N-metil-leucina); tres anillos aromáticos y un disacárido formado por una molécula de glucosa y un aminoazúcar, la vancosamina. La presencia de estos grupos funcionales ionizables se relaciona con la capacidad de la vancomicina para unirse a iones metálicos y para formar complejos con ciertas secuencias de aminoácidos terminales de péptidos bacterianos presentes en la pared celular, pudiendo inhibir su síntesis (Revilla, 2009).

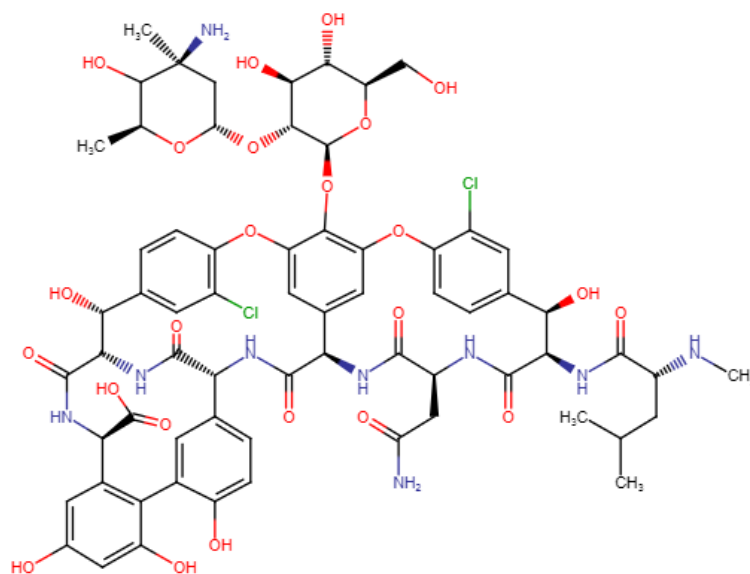


Figura 7. Estructura química de la vancomicina.

Adaptado de: “Analytical Techniques for Vancomycin – A Review”, por Sattur, *et. al*, 2000.

Por otra parte, el metronidazol (figura 8) cuyo nombre IUPAC es 2-(2-metil-5-nitroimidazol-1-il) etanol; es un agente sintético clasificado dentro de la clase de nitroimidazoles, es un compuesto 5-nitro-imidazol. Es un antimicrobiano con gran actividad bactericida frente a un gran número de bacterias anaerobias y algunas microaerófilas. El metabolito principal es el 2-hidroximetil metronidazol, que tiene cierta actividad antibacteriana y antiprotozoaria al causar desestructuración del ADN. Ingresa a la bacteria mediante difusión pasiva y es químicamente reducido por proteínas del metabolismo anaerobio produciendo la pérdida de la estructura helicoidal del ADN, rotura de la cadena e inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y muerte celular, generando compuestos tóxicos para la célula (Pérez e Iglesias, 2003).

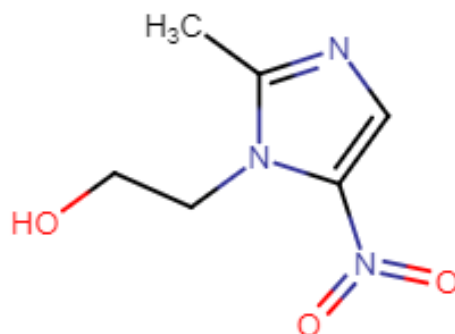


Figura 8. Estructura química del metronidazol.

Adaptado de: “Interactions of metronidazole with other medicines: A brief review”, por Miljkovic, *et. al*, 2014.

2.1.4.2 Fitotoxicidad de aceites esenciales.

Una vez evaluada la actividad antibacteriana de los aceites esenciales es necesario evaluar su posible fitotoxicidad mediante ensayos de toxicidad aguda y genotoxicidad en especies usadas como bioindicadores, entre las que se encuentran el tomate, el repollo y la cebolla.

Las pruebas de toxicidad aguda se realizan mediante el bioensayo de toxicidad con semillas, en la que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento, determinando la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocótilo. La prueba de toxicidad aguda en semillas es de gran relevancia a la hora de determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta. Durante la germinación y el desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos que pueden verse afectados por la presencia de sustancias tóxicas, alterando la supervivencia y desarrollo normal de la planta, siendo una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos (Sobrero y Ronco, 2004).

Por otra parte, las pruebas de genotoxicidad evalúan las mutaciones genéticas, cambios en los cromosomas y toxicidad genética causada por compuestos durante un periodo prolongado de tiempo (Rogers, 2012). El análisis de las alteraciones cromosómicas sirve como prueba de mutagenicidad y es uno de los pocos métodos directos para medir los daños en sistemas expuestos a posibles mutágenos o carcinógenos (Bosio and Dail, 2012). El *test* de *Allium cepa* es utilizado ampliamente para este propósito debido a que las raíces crecen en contacto directo con la sustancia de interés permitiendo predecir posibles daños al ADN de los eucariotas, pudiéndose extrapolar los datos a toda la biodiversidad animal y vegetal (Bosio y Dail, 2012). Los cambios en el ADN son conocidos como Aberraciones Cromosómicas (AC) y son generados por diferentes mecanismos de rupturas dobles del ADN entre los que se encuentran efectos clastogénicos (quiebras de cromosomas) o aneugénicos (pérdida de cromosomas enteros) (Segovia, *et. al*, 2016). Estas alteraciones pueden expresarse a nivel citológico, como un fallo en la actividad mitótica, la cual es observada con una disminución del índice mitótico y alguna anomalía en los cromosomas,

por ejemplo, la presencia de puentes anafásicos, c-mitosis, deleciones, translocaciones y fragmentos aberrantes productos de algún daño en la mitosis (apéndice C) (Berrocal, *et. al*, 2013).

El *test* de *Allium cepa* es usado como bioindicador de la contaminación ambiental y para evaluar la genotoxicidad de plantas medicinales (Bosio y Dail, 2012), especialmente para analizar extractos vegetales que contienen sustancias que pueden ser tóxicas para la salud humana y animal. En adición, los efectos de estos compuestos citotoxicológicos en *A. cepa* han demostrado ser similares y comparables con los resultados en células animales (Bonciu, *et. al*, 2018). Además, el *test* cuenta con una elevada sensibilidad para detectar alteraciones cromosómicas y aprovecha la consecuencia de la disminución del índice mitótico, expresada en el menor desarrollo radicular, observando así las diferencias significativas entre compuestos a distintas concentraciones, y tiempos de exposición (Berrocal, *et. al*, 2013). El Índice Mitótico (IM) se define como el número de células por unidad que sufren mitosis (profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis) durante 120h de exposición y se utiliza como estimación de la velocidad del crecimiento tisular. Los valores de IM inferiores al valor del control negativo indican alteraciones inhibitorias, derivadas de las sustancias químicas evaluadas. Mientras que los valores de IM superiores al control negativo indican un incremento en la división celular, traducido como un desorden en la proliferación celular, evidenciando una sustancia química con potencial para formación de tejido tumoral (Restrepo, *et. al*, 2012).

2.2 Marco de antecedentes

En la última década, diferentes investigadores han reportado datos obtenidos a partir de estudios de la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de romero frente a diferentes microorganismos entre los que se encuentran *S. mutans* y *P. gingivalis*.

Así pues, Bernardes y compañeros en el año 2010 evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de romero obtenido mediante hidrodestilación por 3h usando un sistema tipo Clevenger, compuesto de un balón donde se deposita la materia prima y una cantidad de agua pura, un condensador acoplado al balón y una conexión en forma de D, que permite acumular y separar el aceite esencial de la mezcla condensada (Cerpa, 2007). Los componentes mayoritarios del aceite esencial fueron alcanfor (18,9%), verbenona (11,3%), α -pineno (9,6%), β -mirceno (8,6%), 1,8-cineol (8,0%) y β -cariofileno (5,1%). La actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* (ATCC 25275) fue determinada mediante microdilución en caldo estableciendo una CIM superior a 2000 $\mu\text{g/mL}$. El compuesto de referencia utilizado fue clorhexidina para la cual se estableció un CIM de 0,09 $\mu\text{g/mL}$ (Bernardes, *et. al*, 2010).

Bonilla y colaboradores en el año 2016 evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de romero obtenido mediante destilación por arrastre con vapor a partir de las hojas de la planta con un rendimiento de 0,67%. Se determinó una CIM de 1000 $\mu\text{g/mL}$ para efecto bacteriostático y 1200 $\mu\text{g/mL}$ para efecto bactericida frente a *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) evaluada mediante dilución en agar. El compuesto de referencia utilizado fue metronidazol, con un CIM de 0,071 $\mu\text{g/mL}$ (Bonilla, *et. al*, 2016).

La actividad de romero frente a *S. mutans* y *P. gingivalis* fue estudiada por Cueva en 2017, quien sugirió que su potencial antimicrobiano se debe a la acción de flavonoides, terpenoides,

polifenoles y tanino. Su mecanismo de acción consiste en degradar la membrana citoplasmática bacteriana, conduciendo a una pérdida de iones potasio y provocando autólisis de la célula. Además, aumenta la permeabilidad de la membrana y disipa su potencial, haciendo que las bacterias pierdan su capacidad de motilidad, transporte de membrana y síntesis de ATP. También se ha reportado que algunos flavonoides participan en la inhibición de síntesis de ADN, ARN y otras macromoléculas (Cueva, 2017).

Ahora bien, en cuanto a la fitotoxicidad del AE de romero en semillas, se evidenció que ha sido escasamente estudiada, por lo que solo hay estudios de su efecto inhibitorio frente a otras diferentes a las evaluadas. Sin embargo, su genotoxicidad frente a bulbos de cebolla ha sido más reportada.

Stojanović y compañeros en 2010 reportaron la actividad fitotóxica del aceite esencial comercial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) frente a semillas de trigo (*Triticum vulgare*) y bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.). Las concentraciones evaluadas fueron de 5; 12,5; 25 y 50 mg/mL para las cuales se establecieron diferentes porcentajes de actividad inhibitoria, pero evidenciando que todas afectaron el crecimiento, longitud y número de raíces. Además, el AE exhibió un fuerte efecto inhibitorio en la proliferación de células en mitosis, que se hizo más evidente a medida que la concentración del AE aumentó pasando de un % IM de 25,7% hasta 19,1% (Stojanović, *et. al*, 2010).

Caputo y colaboradores en 2018 evaluaron el efecto fitotóxico del AE de romero frente a semillas de rábano (*Raphanus sativus* L.), ruda (*Ruta graveolens* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.) mostrando que el aceite presentó actividad frente a estos bioindicadores. La concentración de 100 µg/mL de AE aumentó la elongación de las raíces de ruda y disminuyó las de rábano. Todas las concentraciones evaluadas (0,1; 1; 10 y 100 µg/mL) inhibieron la elongación radicular y germinación de las semillas de lechuga y solo las

concentraciones de 1 y 10 µg/mL inhibieron la germinación de las semillas de tomate (Caputo, *et. al*, 2018).

Farias y colaboradores en 2018 evaluaron el efecto reparador del AE de romero frente a las modificaciones morfológicas y estructurales, y el índice mitótico de células expuestas inicialmente a arsénico. Los autores evidenciaron una reducción en las aberraciones cromosómicas mediadas por el arsénico. Sin embargo, al realizar determinación del % IM y % AC de células expuestas únicamente al AE establecieron que este también contribuye con la reducción del % IM a concentraciones de 0,8% (IM=5%) y 3% (IM=3,15%) del AE; y con la aparición de aberraciones como micronúcleos y puentes anafásicos y telofásicos (Farias, *et. al*, 2018). Por otra parte, también se han realizado estudios a partir del aceite esencial de anís, cuya composición química y actividad antibacteriana fue reportada por diferentes autores (Pino, *et. al*, 2012) (Acimovic, *et. al*, 2015). Sin embargo, no existen investigaciones reportadas de la actividad bactericida de este aceite esencial frente a los microorganismos de interés, es decir, *S. mutans* y *P. gingivalis*.

Ahora bien, varios autores han reportado variedad de compuestos químicos presentes en el aceite esencial de anís. Pino y colaboradores en 2012, identificaron que entre los componentes del AE de anís se encontraban canfeno (0,11%), linalool (0,11%), metil-chavicol (97,76%), 4-ciclopropil-2-metoxifenol (0,19%), β-carofileno (0,12%) y germacreno-D (0,44%) (Pino, *et. al*, 2012). Por otra parte, Acimovic y colaboradores en 2015, obtuvieron y caracterizaron el AE de anís mediante hidrodestilación y CG-MS, respectivamente, estableciendo que el AE estaba compuesto por *trans*-anetol (96,8%), metil chavicol (0,19%), *cis*-dihidrocarvona (0,26%), α-himachaleno (0,13%), γ-himachaleno (1,84%), β-himachaleno (0,11%) y *trans*-pseudoisoeugenil-2-metilbutirato (0,32%) (Acimovic, *et. al*, 2015).

Teniendo en cuenta la variedad de compuestos presentes en el aceite esencial de anís, Pino y colaboradores (2012), sugirieron que su actividad antimicrobiana no puede atribuirse a un compuesto en específico, sino a la acción combinada de estos, el mecanismo consiste en la disrupción de la membrana celular bacteriana mediante el incremento de la permeabilidad, afectación de la estabilidad estructural de la membrana y desestabilización del empaquetamiento de la bicapa lipídica, produciendo la muerte celular (Pino, *et. al*, 2012).

Kermanshah y colaboradores en 2014 evaluaron la actividad antimicrobiana del extracto de anís obtenido mediante maceración de las semillas. La determinación de la CIM y CBM fue realizada mediante macrodilución en caldo, obteniendo valores de 12,5 µg/mL y 200 µg/mL respectivamente, frente a *Streptococcus mutans* (Kermanshah, *et. al*, 2014).

En cuanto a la fitotoxicidad del AE de anís son muy pocas las investigaciones reportadas. Así pues, no se encontraron estudios acerca de su fitotoxicidad evaluada mediante el *test de Allium cepa* ni de su fitotoxicidad frente a las semillas evaluadas. Sin embargo, existen reportes del efecto inhibitorio del AE frente a otras semillas.

La toxicidad aguda del AE de anís frente a diferentes semillas fue investigada por Rolim y compañeros en 2010 donde reportaron el efecto de diferentes dosis del AE de anís sobre la germinación y el alargamiento de la radícula de *Lepidium sativum*, *Raphanus sativus* y *Lactuca sativa* determinando una disminución tanto en la germinación de las semillas como en el crecimiento de la radícula de los dos primeros bioindicadores. No obstante, el desarrollo de las semillas de *Lactuca sativa* mostró una tendencia aleatoria donde la germinación de las semillas y el crecimiento radicular aumentaron y disminuyeron a medida que el AE de anís era más concentrado (Rolim, *et. al*, 2010).

Teniendo en cuenta esta revisión, es prometedor realizar estudios de la actividad antibacteriana de los AE de romero y anís frente a *S. mutans* y *P. gingivalis*, puesto que son pocos los resultados reportados. Así pues, se espera comprobar que los AE evaluados presentan actividad antibacteriana frente a los microorganismos de interés, debido a la presencia de diferentes componentes tales como α -pineno, eucaliptol, mirceno, limoneno, linalool, cuminaldehído y anetol, entre otros, a los que se les ha atribuido en variedad de estudios, esta propiedad biológica.

Por otra parte, la evaluación de la fitotoxicidad de estos AE es un estudio realmente promisorio al existir pocas investigaciones reportadas acerca del efecto inhibitorio que tienen estos frente a la germinación y crecimiento radicular de diferentes bioindicadores, y también, pocos estudios relacionados con la genotoxicidad de los AE demostrada mediante los cambios en la proliferación de células en mitosis y registro de alteraciones a nivel cromosomal. De acuerdo con esto, se podría determinar el impacto ecotoxicológico de los AE de anís y romero en el ecosistema, pudiendo evaluar sus riesgos ambientales y sobre todas las células eucarióticas.

3. Metodología

A continuación (figura 9) se presenta una descripción de las etapas principales del desarrollo experimental del presente trabajo de grado consistente en la evaluación de la actividad antibacteriana y fitotoxicidad de los aceites esenciales de Anís y Romero.

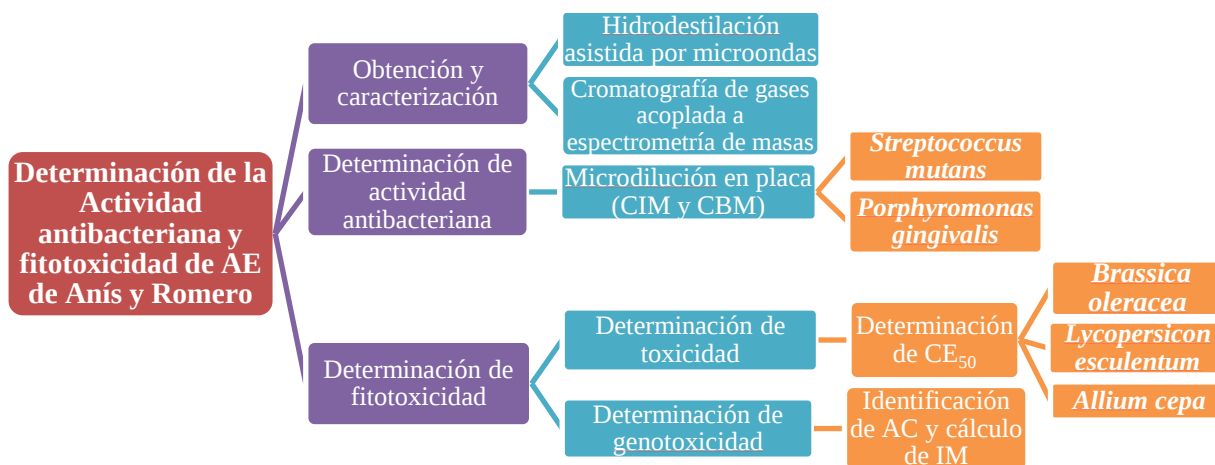


Figura 9. Etapas principales de la metodología experimental para la determinación de la actividad antibacteriana y fitotoxicidad de aceites esenciales de *Pimpinella anisum* y *Rosmarinus officinalis*.

3.1 Obtención y caracterización de los aceites esenciales

Para la obtención de los aceites esenciales se utilizó material vegetal fresco de la planta completa de romero (*Rosmarinus officinalis*), exceptuando las partes muy leñosas, y las semillas de anís (*Pimpinella anisum*). Los AE se obtuvieron mediante hidrodestilación asistida por microondas, para lo cual se empleó un equipo de destilación tipo *clevenger*, constituido por un balón fondo redondo con capacidad de 2000 mL acoplado a un horno microondas LG (potencia 800W y 2,5 GHz), dos condensadores y una trampa *Dean Stark*. Se realizaron extracciones de 20 minutos, con tres repeticiones e intervalos de descanso de 10 minutos, con una potencia de 40W. El número de extracciones estuvo dado por el rendimiento de extracción de los aceites esenciales y se realizó hasta obtener aproximadamente 8 mL de muestra, cantidad suficiente para realizar los ensayos de actividades biológicas propuestas. El rendimiento de extracción se calculó mediante la Ecuación 1.

Ecuación 1. Rendimiento de aceites esenciales.

$$\% \text{ *Rendimiento* } = \frac{g \text{ de AE obtenido}}{g \text{ de material vegetal}} \times 100$$

En la figura 10 se observa el proceso de obtención de AE en el equipo de hidrodestilación asistida por microondas disponible en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales de la Universidad Santo Tomás, seccional Bucaramanga.

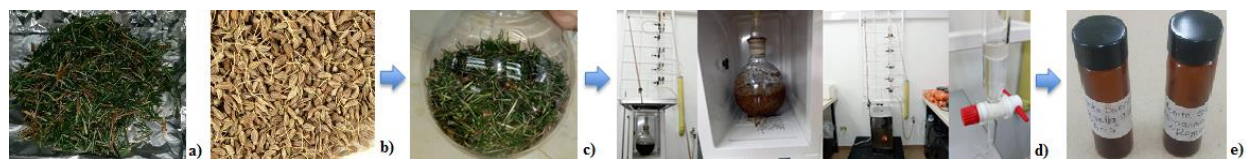


Figura 10. Obtención de AE de anís y romero mediante hidrodestilación asistida por microondas.

Nota: Esquema de las etapas llevadas a cabo para la obtención de los aceites esenciales. a) y b) Recolección del material fresco, romero y anís (Adaptado de: “Anise seed (*Pimpinella anisum*)”, por Natural Healing Room, s. f.), respectivamente; c) recorte y adición de 300 g aproximadamente de material vegetal con 1000 mL de agua en balón fondo redondo de 2000 mL; d) hidrodestilación asistida por microondas en equipo de destilación tipo *clevenger* acoplado a un horno microondas LG, dos condensadores y una trampa Dean-Stark; e) aceites esenciales de anís y romero obtenidos y almacenados en frascos ámbar y en refrigeración.

La caracterización de los aceites esenciales se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Esto se realizó bajo la modalidad de prestación de servicios en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas (CROM-MASS), adscrito a la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Industrial de Santander –UIS.

El análisis de las muestras se desarrolló según el método acreditado con la ISO/IEC 17025:2005 por el **ONAC**, con el código de acreditación 10-LAB-067: Análisis de aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS); documento normativo:

Norma ISO 7609-1985 (E): *Essential oils – Analysis by gas chromatography on capillary columns – General method*, empleando como material de referencia la mezcla certificada de hidrocarburos $C_6 - C_{25}$ (*AccuStandard*, New Haven, CT). La preparación de las muestras se llevó a cabo por dilución e inyección directa de los aceites esenciales al equipo cromatográfico. El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo de gases *AT 6890 Series Plus* (*Agilent Technologies*, Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas (*Agilent Technologies*, MSD 5975) operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencia (*full scan*). La columna empleada en el análisis fue DB-5MS (*J & W Scientific*, Folsom, CA, EE. UU.) [5%-fenil-poli(dimetilsiloxano), 60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m]. La inyección se realizó en modo *Split* (30:1), $V_{\text{iny}} = 2\mu\text{L}$.

3.2 Actividad antibacteriana de los aceites esenciales

La determinación de la actividad antibacteriana de los AE de romero y anís se llevó a cabo siguiendo el protocolo M7-A9 (NCCLS) de *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para las bacterias *P. gingivalis* y *S. mutans*. Todos los materiales utilizados fueron previamente esterilizados mediante calor húmedo (autoclave) (NCCLS, 2012).

En la figura 11 se observa el procedimiento llevado a cabo para la determinación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales.

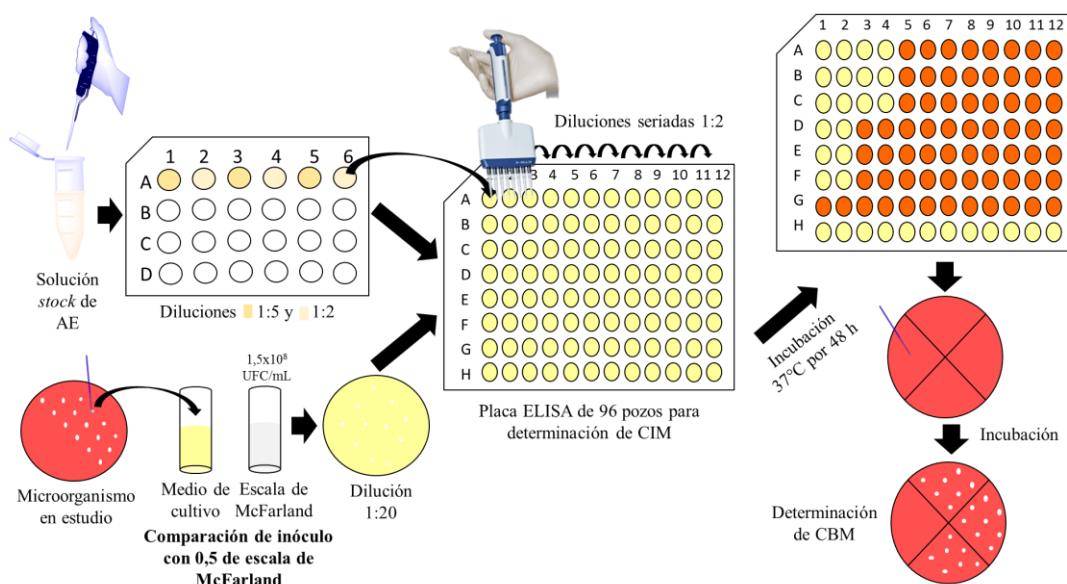


Figura 11. Determinación de la CIM y la CBM de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*) y las semillas de anís (*Pimpinella anisum*).

Nota: Esquema de etapas realizadas para la determinación de la actividad antibacteriana de los AE de anís y romero. 1) Preparación de diluciones 1:5 y 1:2 de AE: medio de cultivo, a partir de las soluciones *stock* (AE/DMSO) de AE de anís y romero cada uno, en placa de 24 pozos; 2) preparación del inóculo, teniendo en cuenta la escala de McFarland, y posterior dilución 1:20 (inóculo: medio de cultivo); 3) microdilución en placa ELISA de 96 pozos fondo plano estériles mediante diluciones volumétricas seriadas 1:2, realizadas con medio de cultivo, iniciando a partir de la solución *stock*; 4) Determinación de CIM e inoculación de pozos en agares selectivos y no selectivos; 5) Determinación de CBM de los AE de romero y anís.

Se consideraron los siguientes aspectos:

3.2.1 Tratamiento de cepas de referencia.

El tratamiento de las cepas de referencia utilizadas para la determinación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales, es decir *P. gingivalis* (ATCC 33277) y *S. mutans* (ATCC

25175), se estableció según sus condiciones y características de crecimiento observadas en la tabla 4.

Tabla 4. *Condiciones y características de crecimiento de microorganismos a evaluar*

Microorganismo	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
Medio de cultivo	Agar Sangre (OXOID) – Agar Columbia (OXOID)	Agar Mitis Salivarius (Becton and Dickinson, BD) – Agar Sangre
Atmósfera de incubación	Anaerobia: 80% N ₂ , 10% CO ₂ y 10% H ₂	Anaerobia: 95% N ₂ y 5% CO ₂
Tiempo de incubación	7-14 días	24-48 h
T de incubación (°C)	37	37
Colonia	Esféricas	Esféricas u ovaladas
Coloración	Amarillo o crema, después de 4 días negras desde el borde hacia el centro	Morado
Textura	Lisa	Esponjosas, mucosas y opacas
Características microscópicas	Gram negativo: rosado	Gram positivo: morado
Citas bibliográficas	Bugueño, 2014 NCCLS, 2012	Cerna, 2016 NCCLS, 2012

3.2.2 Compuestos de referencia.

Como compuestos de referencia se emplearon vancomicina comercial (Casa Comercial: Sigma-Aldrich, 99,9% de pureza, Saint Louis, EE.UU.) y metronidazol comercial (AMEGIAR, Casa Comercial: Coaspharma S. A. S., Colombia).

La purificación del metronidazol se llevó a cabo disolviendo tres tabletas de metronidazol 500 mg en 150 mL de acetona. A continuación, se añadieron 1,5212 g de carbón activado y se agitó durante 15 minutos. La solución obtenida se filtró y se rotoevaporó para eliminar el solvente. El sólido obtenido se cristalizó adicionando 20 mL de n-heptano y dejando la solución en un baño de

agua-hielo durante 20 minutos. Posteriormente, la muestra se filtró y el sólido obtenido se secó a 120°C durante 20 minutos. Se obtuvieron 0,6406 gramos de metronidazol con un rendimiento de 29,94%.

Para la caracterización de los compuestos de referencia se empleó un espectrofotómetro infrarrojo de Transformada de Fourier (SHIMADZU), modelo IRAffinity-1 con software IRPrestige-21 y una pastilla de KBr para la mezcla previa de cada antimicrobiano. Equipo disponible en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales de la Universidad Santo Tomás, Seccional Bucaramanga.

3.2.3 Rangos de concentración de aceites esenciales y compuestos de referencia.

Los rangos de concentración de los aceites esenciales evaluados se determinaron de acuerdo con la susceptibilidad bacteriana observada en pruebas preliminares. La solución *stock* se realizó disolviendo el aceite esencial en DMSO 99%, ajustando a 10 veces la primera concentración a evaluar en cada caso (apéndice D). La concentración final de estas soluciones fue 40.000 o 60.000 µg/mL dependiendo la concentración inicial del AE a evaluar en cada microorganismo. En esta solución, la concentración final del DMSO fue menor al 2%, concentración no tóxica frente a las bacterias evaluadas según los reportes en la literatura. En cuanto a los compuestos de referencia, la solución *stock* se realizó disolviendo el antimicrobiano en el medio de cultivo correspondiente, tratamiento sugerido por la NCCLS.

Los aceites esenciales de interés fueron evaluados teniendo en cuenta el rango de concentraciones que se presenta en la tabla 5, realizando diluciones en proporciones de 1:2. Los rangos de concentración de los compuestos de referencia, también se observan en la tabla 5. Estas concentraciones fueron establecidas de acuerdo con protocolo establecido por la NCCLS y

estudios previos realizados en el grupo de investigación donde se evaluaron otros aceites esenciales (Quintero y Rangel, 2016) (Torres y Torres, 2018).

Tabla 5. Rangos de concentración evaluados para determinación de actividad antibacteriana

Aceites Esenciales/ Compuestos de referencia	<i>P. gingivalis</i>		<i>S. mutans</i>	
	Concentración inicial (µg/mL)	Concentración final (µg/mL)	Concentración inicial (µg/mL)	Concentración final (µg/mL)
Anís	3000	1,46	2000	0,98
Romero	3000	1,46	2000	0,98
Vancomicina	NA	NA	512	0,25
Metronidazol	256	0,12	NA	NA

Nota: NA (No Aplica).

3.2.4 Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de aceites esenciales.

Con el fin de determinar el efecto bacterostático o bactericida de los aceites esenciales de romero y anís frente a *S. mutans* y *P. gingivalis*, los microorganismos se trataron según las condiciones de crecimiento de cada uno, tal y como se observa en la tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de crecimiento para determinación de la actividad antibacteriana de AE de anís y romero frente a *P. gingivalis* y *S. mutans*

Microorganismo	Medio de cultivo en placa ELISA	Tiempo de incubación (h)	Temperatura de incubación (°C)	Citas bibliográficas
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	BHI (OXOID)	48	37	Emani, <i>et. al</i> , 2014
<i>Streptococcus mutans</i>	BHI suplementado con 1% de sacarosa	24-48	37	Asawahame, <i>et. al</i> , 2015

Nota: Caldo BHI (Brain Heart Infusion) Adaptado de: “Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test sor Bacteria That Grow Aerobically”, por NCCLS, 2012.

La CIM se realizó siguiendo el protocolo establecido por la NCCLS M7-A9. El método empleado fue microdilución en placas estériles de 96 pozos fondo redondo distribuidos como se observa en la figura 12. Cada placa contuvo 50 μL de caldo BHI para *P. gingivalis* y caldo BHI + 1% de sacarosa para *S. mutans*. A continuación, se agregaron 50 μL de aceite esencial en la concentración inicial previamente definida. Además, se añadieron 50 μL de inóculo a una concentración de $1,5 \times 10^8$ microorganismos/mL establecido por el 0,5 de la escala de McFarland. Finalmente, las placas se incubaron teniendo en cuenta las condiciones establecidas en la tabla 6, una vez transcurrido el tiempo de incubación, la CIM se determinó de manera visual iniciando desde el pozo de menor concentración.

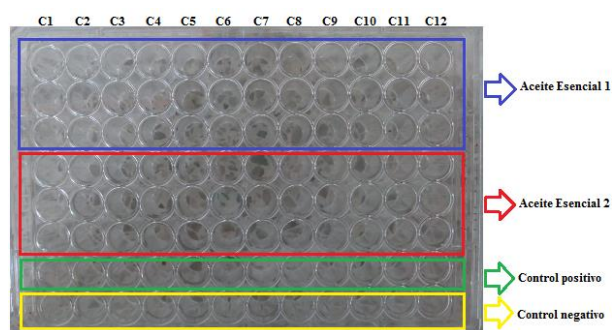


Figura 12. Diseño de siembra en placa Elisa de 96 pozos.

Nota: Diseño de distribución de AE en placa Elisa de 96 pocillos. Control Positivo (caldo de cultivo + inóculo) y control negativo (caldo de cultivo).

Por otra parte, la determinación de la CBM se llevó a cabo mediante la inoculación de 6-8 pozos de cada muestra en agares selectivos y no selectivos siguiendo los parámetros de la NCCLS M7-A9 y condiciones establecidas en la tabla 4 para cada microorganismo. La lectura de los resultados obtenidos para la CBM se realizó en aquellas placas de menor concentración de cada solución donde no se evidenció el crecimiento bacteriano.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado en ensayos independientes, y se validaron a partir de los resultados obtenidos en CIM y CBM de los compuestos de referencia.

3.3 Determinación de la fitotoxicidad de aceites esenciales

3.3.1 Preparación de soluciones.

Se prepararon soluciones de concentraciones 1, 10, 100 y 1000 ppm de los aceites esenciales de *Pimpinella anisum* y *Rosmarinus officinalis*, debido a que se trató de una evaluación preliminar se estudió amplio intervalo de concentraciones.

3.3.2 Toxicidad de aceites esenciales en semillas de repollo (*Brassica oleracea*) y tomate (*Lycopersicon esculentum*)

En cajas de Petri se añadieron aproximadamente 2 mL de las soluciones de AE previamente preparadas. A continuación, en cada caja se colocó un papel filtro y sobre este, 20 semillas seleccionadas (Envasado y Comercializado por: ANASAC S. A. C. e I. Santiago de Chile. Importado por: Semillas Arroyave S. A. S. Resolución ICA N° 003573 del 12 de agosto del 2013. Distribuido por Anasac Colombia Ltda.) de la especie blanco (repollo o tomate) (Figura 13). Finalmente, las cajas fueron selladas y dejadas en un lugar fresco ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) en total oscuridad durante 7 días (Figura 14) (Castillo, 2004). Pasado este tiempo, se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento las raíces y embriones mediante la comparación de la longitud media de las raíces y embriones en cada concentración, con la longitud de las raíces y embriones expuestos en el control. Teniendo en cuenta estos resultados se estableció la toxicidad aguda del aceite esencial, dato que se reportó en valores de CE_{50} .



Figura 13. Semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) y repollo (*Brassica oleracea*) empleadas para la determinación de la fitotoxicidad de los AE de anís y romero.

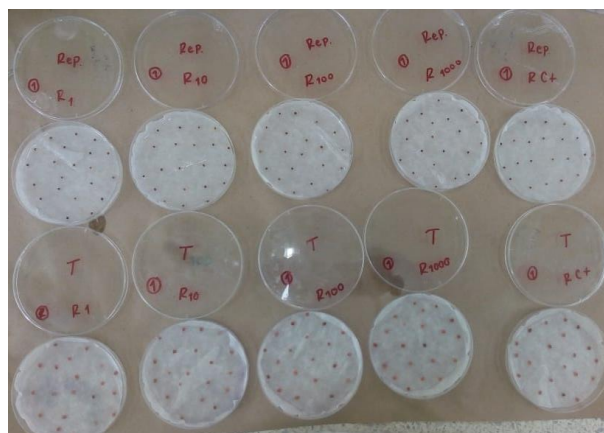


Figura 14. Montaje de semillas de repollo (*Brassica oleracea*) y tomate (*Lycopersicon esculentum*) para la evaluación de la toxicidad aguda de los AE de anís y romero.

Nota: En la parte superior se observan las semillas de repollo mientras que en la parte inferior se observan las semillas de tomate.

3.3.3 Toxicidad de aceites esenciales en bulbos de cebolla (*Allium cepa*).

Se seleccionaron cebollas moradas de tamaño similar, se les retiró la primera capa, se limpió cuidadosamente su base radicular sin eliminar las raíces y se dejaron sumergidas en agua embotellada comercial por un corto periodo de tiempo. Transcurrido este tiempo, cada cebolla se puso en contacto con cada una de las soluciones de aceites esenciales preparadas inicialmente y se

dejaron en la oscuridad durante 5 días para permitir nuevo desarrollo radicular (Castillo, 2004). El montaje realizado para el ensayo de toxicidad en cebolla se observa en la figura 15.

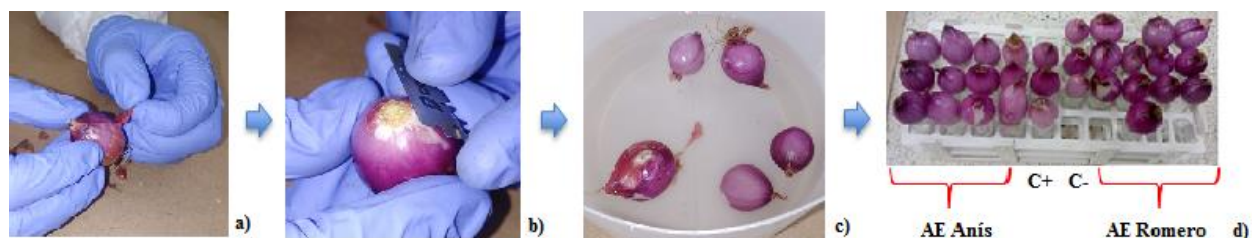


Figura 15. Ensayo de toxicidad aguda y genotoxicidad de AE de anís y romero en *A. cepa*.

Nota: Esquema de los pasos realizados para la determinación de la toxicidad aguda y genotoxicidad en cebolla. a) bulbos de cebolla sin primera capa, b) limpieza de base radicular, c) bulbos de cebolla sumergidos en agua embotellada comercial, d) montaje de cebollas en contacto con soluciones de diferentes concentraciones de AE, y controles: positivo (DMSO 0,38%) y negativo (agua embotellada comercial), se expusieron tres bulbos de cebolla por cada concentración de AE.

Transcurrido este tiempo, se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento de las raíces mediante la comparación de la longitud promedio de las raíces expuestas a cada concentración con las raíces que germinaron en el control. Teniendo en cuenta estos resultados se determinó la CE_{50} . Para la determinación del Índice Mitótico (IM) y las Aberraciones Cromosómicas (AC), se recortó el ápice (2-3 mm de la punta de la raíz) de las raíces que midieron más de 2,5 cm. Los ápices se expusieron a una solución de HCl 6N por 25 minutos, para romper la pared celular (Causil, *et. al*, 2017), se lavaron cuidadosamente con agua comercial y se sumergieron en aceto-orceina por 20 minutos, un colorante que permitió observar los cromosomas en las distintas fases del ciclo mitótico (Ibdciencia, 2015). Después del tiempo de exposición con el colorante, se colocó un ápice sobre una lámina, una preparación de aceto-orceina, se cubrió con una laminilla y se presionó sobre ésta hasta que el tejido se expandió sobre la lámina. Se observó en el microscopio (OLYMPUS CX23, modelo CX23LEDRFS1), disponible en el Laboratorio de Investigación y

Ciencias Básicas de la Universidad Santo Tomás, seccional Bucaramanga, con un objetivo de 40x identificando las diferentes etapas de la mitosis (profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis) presentes en el expandido. Posteriormente, se calculó el % IM y % AC aplicando las ecuaciones 2 y 3, y se identificaron las AC presentes en las etapas mitóticas.

Ecuación 2. Índice Mitótico.

$$\% \text{ IM} = \frac{\text{Número de células en división}}{\text{Número total de células}} * 100$$

Ecuación 3. Aberraciones Cromosómicas.

$$\% \text{ AC} = \frac{\text{Número de aberraciones celulares}}{\text{Número de células en división}} * 100$$

4. Consideraciones éticas

De acuerdo con el título IV, capítulo I de la resolución 8430 de 1993 relacionado con la investigación con microorganismos patógenos o material biológico que pueda contenerlos, se garantiza que la Universidad Santo Tomás cuenta con un laboratorio clasificado como “laboratorio de seguridad microbiológica” según lo referido en el artículo 64 y además, cumple con lo establecido en el artículo 63, es decir, con las instalaciones, equipos adecuados y normas técnicas que garantizan el manejo adecuado de los microorganismos. El proyecto seguirá el protocolo establecido en el artículo 65 de “*National Committee For Clinical Laboratory Standards*”, (NCCLS). Considerando lo establecido en el artículo 67, se identificará el riesgo que representan los microorganismos para los investigadores y comunidad en general.

5. Resultados y análisis

A continuación, se presentan los resultados y análisis de resultados más importantes obtenidos en la realización del proyecto de grado, con el fin de contribuir con los estudios del uso de los aceites esenciales de anís y romero como antibacteriano de los microorganismos *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans*.

5.1 Obtención y caracterización de aceites esenciales

La obtención de los aceites esenciales se realizó mediante hidrodestilación asistida por microondas, un método destilativo ambientalmente amigable en el que no se usan solventes tóxicos y eficiente en cuanto a la rápida extracción relacionada con factores como la polarización de las moléculas de agua y el calentamiento localizado de la muestra, provocando una ruptura rápida en las paredes de las glándulas secretoras donde se encuentra contenido el AE.

En la tabla 7 se observan los rendimientos teóricos y experimentales de los AE de anís (*Pimpinella anisum*) y romero (*Rosmarinus officinalis*) teniendo en cuenta que para la obtención del AE de anís se utilizaron sus semillas y para el AE de romero se aprovechó toda la planta exceptuando las partes muy leñosas.

Tabla 7. Porcentaje de rendimientos teóricos y experimentales de los AE obtenidos por hidrodestilación asistida por microondas

Aceite Esencial	% Rendimiento		Cita bibliográfica
	Reportado en literatura	Experimental	
<i>Pimpinella anisum</i>	1,7	0,44	Kürkçüoğlu, et. al, 2019.
<i>Rosmarinus officinalis</i>	0,35	0,58	Elyemni, et. al, 2019.

De acuerdo con la tabla anterior, se estableció que el porcentaje de rendimiento experimental más alto fue obtenido para el AE de romero. Así mismo, este valor fue superior al rendimiento reportado en la literatura. En cuanto al AE de anís se determinó que el rendimiento experimental fue muy bajo comparado con el reportado en la literatura para esta planta. Teniendo en cuenta, que el método de extracción en ambos casos fue el mismo, la diferencia pudo darse por la relación entre la cantidad de agua y material vegetal utilizada en cada caso, potencia de extracción, parte de la planta aprovechada, tratamiento previo de esta y lugar donde fue cultivada.

Ahora bien, en las tablas 8 y 9 se presentan los componentes de los AE de anís y romero, respectivamente, identificados mediante GC-MS.

Tabla 8. Composición química del AE de anís determinada mediante CG-MS

T _R , min	Identificación tentativa	Cantidad relativa, %
16,63	α -Pineno	< 0,1
20,65	<i>p</i> -Cimeno	< 0,1
20,86	Limoneno	< 0,1
21,02	Eucaliptol	< 0,1
22,07	γ -Terpineno	< 0,1
23,7	Linalool	0,2
27,73	Estragol	1,9

Tabla 8. (Continuación)

T_R, min	Identificación tentativa	Cantidad relativa, %
29,46	Cuminaldehído	< 0,1
29,72	<i>cis</i> -Anetol	0,3
30,27	<i>p</i>-Anisaldehído	1,8
31,57	<i>trans</i>-Anetol	92,1
33,4	Eugenol	< 0,1
34,58	1-(<i>p</i> -Metoxifenil)-2-propanona	0,1
37,3	α -Himachaleno	0,1
37,69	Compuesto C ₁₅ H ₂₂ , <i>m/z</i> (%): 222 (42), 187 (11), 159 (40), 146 (35), 145 (33), 131 (100), 119 (31), 91 (39), 41 (20)	0,1
38,03	<i>ar</i> -Curcumeno	0,1
38,23	Y-Himachaleno	1
38,46	α -Zingibereno	0,1
38,88	β -Bisaboleno	0,1
39,41	Compuesto C ₁₅ H ₂₂ , <i>m/z</i> (%): 222 (32), 187 (23), 159 (58), 146 (97), 145 (39), 131 (100), 119 (27), 117 (37), 115 (36), 93 (36), 91 (94), 77 (53), 65 (24), 41 (60)	0,1
42,57	Isoespatulenol	0,1
47,43	Metilbutirato de <i>trans</i>-pseudoisoeugenilo	1,4
48,68	Metilbutirato de epoxy-pseudoisoeugenilo	0,3

Nota: Datos adaptados a partir de la caracterización química del AE de anís realizada por GC-MS en el laboratorio CROM-MASS.

De acuerdo con la tabla 8, se estableció que los componentes mayoritarios del AE de anís son *trans*-anetol (92,1%), estragol (1,9%), *p*-anisaldehído (1,8%), metilbutirato de *trans*-pseudoisoeugenilo (1,4%) y Y-Himachaleno (1,0%). Además, el AE de anís cuenta con variedad de otros componentes, que se encuentran en menores concentraciones y que también pueden aportar al AE diferentes propiedades biológicas. La corriente iónica total reconstruida del AE de anís analizada por GC-MS operado en el modo *full scan* se observa en el apéndice E.

Ahora bien, en cuanto a los compuestos mayoritarios, son de terpenos cíclicos con diferentes grupos funcionales principalmente oxigenados como sustituyentes. En primer lugar, *trans*-anetol

y estragol son isómeros de posición el uno del otro, éteres fenólicos y derivados metoxi. En segundo lugar, *p*-anisaldehído es un monoterpenoide, aromático y derivado del fenilpropano, caracterizado por presentar un aldehído en su estructura. En tercer lugar, γ -Himachaleno es un sesquiterpeno cuyos sustituyentes son de origen alifático (grupos metilos).

Tabla 9. Composición química del AE de romero determinada mediante GC-MS

Tr, min	Identificación tentativa	Cantidad relativa, %
8,24	Isopentanol	< 0,1
13,02	Hexenol	0,1
16,15	Triciclono	0,1
16,28	α -Tujeno	0,2
16,82	α-Pino	14,3
17,35	α -Fencheno	< 0,1
17,46	Canfeno	2
17,58	Tuja-2,4(10)-dieno	0,3
18,38	Sabineno	0,1
18,68	β-Pino	1,7
18,8	6-Metil-5-hepten-2-ona	0,1
19,04	β -Mirceno	1
19,3	6-Metil-5-hepten-2-ol	< 0,1
19,85	α -Felandreno	0,2
20,31	α -Terpineno	0,4
20,83	<i>p</i>-Cimeno	1,2
21,25	Eucaliptol	24,7
22,08	γ -Terpineno	1
22,59	<i>cis</i> -Hidrato de sabineno	0,4
23,21	Terpinoleno	0,8
23,39	<i>p</i> -Cimeneno	0,1
23,83	Linalool	5
23,98	<i>trans</i> -Hidrato de sabineno	0,2
24,78	Crisantenona	1,7
24,86	<i>trans-p</i> -Ment-2-en-1-ol	0,1
24,93	α -Canfolenal	0,2
24,99	<i>trans</i> -Hidrato de pino	0,1

Tabla 9. (Continuación)

T _R , min	Identificación tentativa	Cantidad relativa, %
25,62	<i>cis</i> -Verbenol	0,7
25,79	<i>trans</i> -Verbenol	1
25,93	Alcanfor	3,2
26,34	<i>trans</i> -Pinocanfona	0,2
26,43	Pinocarvona	0,5
26,75	δ-Terpineol	0,3
26,98	Borneol	5,7
27,04	<i>cis</i> -Pinocanfona	0,9
27,15	Terpinen-4-ol	1,9
27,48	<i>p</i> -Cimen-8-ol	0,1
27,85	α-Terpineol	3,1
27,93	Mirtenol	0,8
28,12	Compuesto C ₁₀ H ₁₈ O, <i>m/z</i> (%): 154 (3), 139 (9), 121 (24), 105 (18), 95 (100), 93 (36), 91 (27), 77 (18), 67 (16), 41 (21)	1,1
28,4	Verbenona	10,7
28,51	<i>cis</i> -Carveol	0,1
28,61	Citronelol	0,6
29,12	Neral	0,3
29,65	Geraniol	6,6
30,2	Geranial	0,4
30,41	Compuesto C ₁₀ H ₁₄ O, <i>m/z</i> (%): 150 (12), 135 (22), 122 (6), 107, (8), 91 (8), 77 (15), 82 (100), 54 (22), 41 (12)	0,1
30,60	Acetato de verbenilo	0,1
30,92	Acetato de bornilo	2,8
31,41	Isocarveol	0,1
32,21	Acetato de mirtenilo	0,1
32,95	Piperitenona	0,1
33,32	Eugenol	0,1
34,13	Acetato de geranilo	0,5
35,04	Metileugenol	0,6
36,15	<i>trans</i> -β-Cariofileno	0,7

Tabla 9. (Continuación)

T_R, min	Identificación tentativa	Cantidad relativa, %
36,73	Geranil acetona	0,1
37,38	α -Humuleno	0,1
38,27	Benzoato de prenilo	< 0,1
41,41	Óxido de cariofileno	0,4
52,13	Compuesto NI, <i>m/z</i> (%): 168 (10), 167 (66), 121 (33), 109 (18), 108 (10), 107 (74), 93 (22), 81 (38), 69 (100), 55 (13), 53 (15)	0,1
59,4	Tetracosano	< 0,1
61,36	Pentacosano	< 0,1
62,95	Hexacosano	< 0,1
64,37	Heptacosano	0,1
65,84	Octacosano	0,1
67,43	Nonacosano	0,1
69,21	Triacontano	< 0,1
71,27	Untriacontano	< 0,1

Nota: Datos adaptados a partir de la caracterización química del AE de romero realizada por GC-MS en el laboratorio CROM-MASS.

Teniendo en cuenta la tabla anterior, se determinó que los compuestos mayoritarios del AE de romero son acetato de eucaliptol (24,7%), α -pineno (14,3%) verbenona (10,7%), geraniol (6,6%), borneol (5,7%), linalool (5,0%), alcanfor (3,2%), α -terpineol (3,1%), acetato de bornilo (2,8%), canfeno (2,0%), terpinen-4-ol (1,9%), crisantenona (1,7%), β -pineno (1,7%) y cimeno (1,2%). La corriente iónica total reconstruida del AE de romero analizada por GC-MS operado en el modo *full scan* se observa en el apéndice F.

En cuanto a los compuestos mayoritarios del AE de romero, se puede decir, que se trata de terpenos de cadena abierta como el geraniol y linalool, y cíclicos como el eucaliptol, α -pineno, verbenona, borneol, alcanfor, α -terpineol, acetato de bornilo, canfeno, terpinen-4-ol, crisantenona, β -pineno, acetato de bornilo y cimeno. En primer lugar, el eucaliptol es un monoterpenoide con

estructura de éter bicíclico. En segundo lugar, tanto los isómeros estructurales del pineno (α -pineno y β -pineno) como el canfeno, pertenecen a la familia de monoterpenoides bicíclicos y cuentan con sustituyentes de origen alifático. En tercer lugar, verbenona y su isómero crisantenona, y alcanfor son cetonas terpénicas bicíclicas. En cuarto lugar, geraniol, linalool, borneol (bicíclico), α -terpineol y terpinen-4-ol son terpenos en cuya estructura hay presencia de un alcohol. En quinto lugar, cimeno es un monoterpeno aromático con sustituyentes de origen alifático. En sexto lugar, el acetato de bornilo es un terpeno aromático perteneciente a la familia de los ésteres. Además, el AE de romero cuenta con muchos otros compuestos que, aunque se encuentren en menor proporción, también le aportan características biológicas y químicas.

Ahora bien, es de gran relevancia tener en cuenta que la actividad biológica, específicamente el potencial antibacteriano de los aceites esenciales se debe a la presencia de componentes tanto mayoritarios como minoritarios, que gracias a sus diferentes grupos funcionales pueden ejercer una mayor acción. De acuerdo con esto, se identificaron alcoholes, éteres y aldehídos, como los grupos funcionales presentes en los compuestos mayoritarios de los AE de anís y romero con actividad bactericida reportada, entre ellos se encuentran: eucaliptol, linalool, borneol, geraniol, acetato de bornilo, α -pineno y *trans*-anetol. En los apéndices G-M se observan los espectros de masas de dichos componentes.

En el apéndice G se observa la fragmentación propuesta para eucaliptol (1,8-cineol), componente más abundante del AE de romero. Teniendo en cuenta, algunos de los picos más intensos, se plantea el ion molecular del compuesto en un $m/Z=154$, este presenta la pérdida de un radical metilo ($-CH_3$), formando el catión con $m/Z=139$, por la pérdida de oxígeno que forma el éter y un radical metilo, se derivan los cationes con $m/Z=108$ y $m/Z=93$, respectivamente, por

reordenamiento y ruptura de los carbonos α con respecto al oxígeno, se obtienen los cationes con $m/Z=81$ y $m/Z=43$, siendo este último, el pico base.

En el apéndice H se observa la fragmentación propuesta para α -pineno, componente mayoritario del AE de romero y minoritario del AE de anís. De acuerdo con los picos más intensos mostrados, se sugiere que el ion molecular de α -pineno está en el pico con $m/Z=136$, gracias a la separación de radicales alquílicos ($-CH_3$) y ($-C_2H_4$) se observa el pico base con un $m/Z=93$, seguidamente, por la pérdida de H_2 se obtiene un ion con $m/Z=91$. Por otra parte, debido a la ruptura y reordenamiento de los enlaces C-C del ion molecular, se presentan los cationes con $m/Z=77$ y $m/Z=39$.

En el apéndice I se presenta la fragmentación propuesta para borneol, uno de los componentes mayoritarios del AE de romero. Su ion molecular tiene un $m/Z=154$ por lo que no es posible apreciarlo en el espectro de masas. Su pico base presenta un $m/Z=95$, se debe a pérdida de radicales alquílicos y por el reordenamiento de los enlaces del carbono. Además, se observa un pico menos intenso debido a la formación del catión con $m/Z=110$ gracias a la pérdida de radicales metilos ($-CH_3$).

En el apéndice J se presenta la fragmentación propuesta para linalool, componente mayoritario del AE de romero y minoritario del AE de anís; presenta un ion molecular con $m/Z=154$ por lo que no se observa su pico en el espectro de masas. Gracias a la separación de los radicales metilos ($-CH_3$), hidroxilo ($-OH$) e hidrógeno ($-H$), y al reordenamiento de los enlaces del carbono se obtiene un catión con $m/Z=93$. Por otra parte, a partir del ion molecular se presenta la ruptura del radical alquílico ($-C_6H_{11}$) observando catión con $m/Z=71$, que además es el pico base. De este último se derivan los cationes con $m/Z=55$ formado a partir de la transposición del hidrógeno perteneciente al grupo hidroxilo y a la pérdida de un radical metilo y un hidrógeno, $m/Z=43$ por la

separación del radical hidroxilo, de un radical metilo y por el reordenamiento del enlace C-C, y $m/Z=41$ debido a la transposición y pérdida de hidrógenos.

En el apéndice K se observa la fragmentación tentativa de geraniol, componente mayoritario del AE de romero, cuyo ion molecular corresponde al pico con $m/Z=154$. Debido a la separación de los radicales metilos y seguido de la pérdida del radical $-CH_2OH$ se obtiene un pico poco intenso correspondiente al catión con $m/Z=93$. Además, se observa el pico base con un $m/Z=69$ que corresponde al catión obtenido a partir de la transposición del hidrógeno perteneciente al grupo hidroxilo y de la separación del radical C_6H_{11} . Se observa un pico intenso con un $m/Z=41$ obtenido a partir de la fragmentación del ion molecular, la cual consistió en la ruptura de los radicales metilos y $C_6H_{11}O$.

En el apéndice L se presenta la fragmentación propuesta de acetato de bornilo, compuesto mayoritario del AE de romero. Este presenta un ion molecular con $m/Z=196$ del cual se derivan los cationes con $m/Z=136$ por pérdida de radicales metilo y $m/Z=121$ además, por la pérdida de un radical alquílico y el reordenamiento de los enlaces C-C. A partir de este último se obtiene un catión con un $m/Z=95$ (pico base) correspondiente a la pérdida del radical $-C_2H_2$. Se observa un pico intenso con $m/Z=43$ derivado a partir de la ruptura del enlace C-O, del cual se obtiene un catión C_2H_3O .

En el apéndice M se presenta la fragmentación tentativa para *trans*-anetol, componente de mayor concentración encontrado en el AE de anís. El ion molecular de este compuesto se observa en el pico con $m/Z=148$ que a su vez es el pico base. De la pérdida de un hidrógeno del grupo metilo, se deriva un catión con $m/Z=147$ y de la separación de los radicales alquílicos, CH_3 y C_2H_2 se obtienen los cationes con $m/Z=133$ y $m/Z=105$, respectivamente. A partir del ion radical y por la ruptura del enlace C-O del anillo aromático y el grupo metoxi, respectivamente se observa un

pico poco intenso que corresponde al catión con $m/Z=117$. De este último, se deriva el catión con $m/Z=77$ gracias a la pérdida del radical alquílico C_3H_5 .

5.2 Determinación de actividad antibacteriana de aceites esenciales

5.2.1 Compuestos de referencia.

A continuación, se presentan los espectros infrarrojo obtenidos para metronidazol y vancomicina. Estos fueron comparados con los espectros encontrados en la literatura (*Spectral Database for Organic Compounds SDBS*).

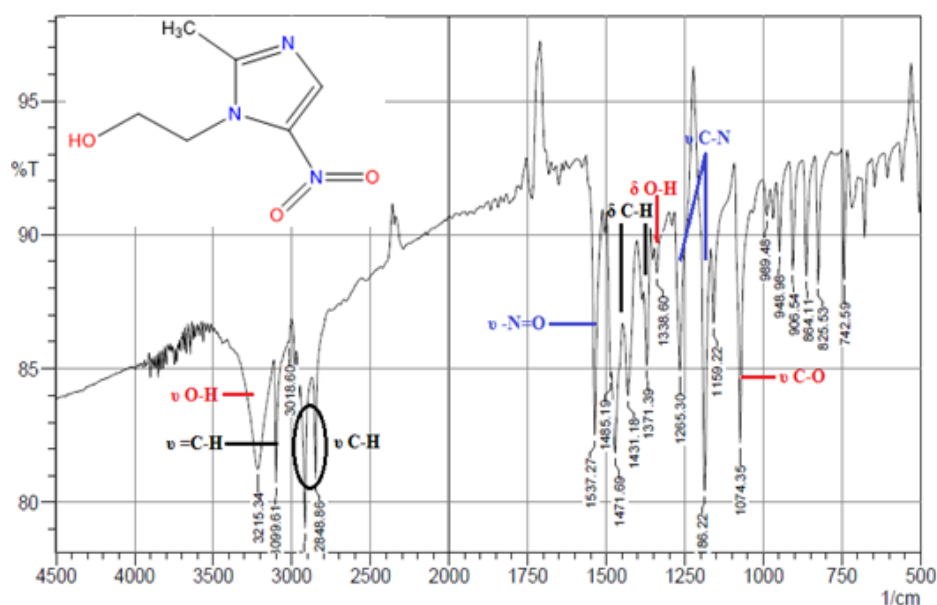


Figura 16. Espectro IR del metronidazol.

En la figura 16 se observa el espectro infrarrojo del metronidazol. Teniendo en cuenta la presencia del grupo hidroxilo del alcohol perteneciente a la molécula de metronidazol se observan tres regiones de absorción características. En primer lugar, en la región de 3215 cm^{-1} se presenta una banda de absorción atribuida a la vibración de tensión del O-H por una asociación intermolecular; en segundo lugar, en la región 1074 cm^{-1} se observa una banda fuerte de absorción

característica de una vibración de tensión del sistema C-O de alcoholes; en tercer lugar, en la región 1338 cm^{-1} se presenta una banda débil atribuida a la vibración de flexión del O-H. En la región de 3099 cm^{-1} hay la presencia de una banda de absorción característica de la vibración de tensión del $=\text{C-H}$ de las estructuras aromáticas. En la región de $2848\text{-}2916\text{ cm}^{-1}$ se observa un doblete fuerte debido a que escinden por resonancia en dos bandas y a las vibraciones de tensión simétrica y asimétrica del C-H. En la región de 1371 cm^{-1} se observa banda de intensidad media que hace referencia a una vibración de flexión simétrica del C-H, mientras que en la región $1431\text{-}1471\text{ cm}^{-1}$ se presenta una banda fuerte característica de una vibración de flexión asimétrica del C-H. En la región de 1537 cm^{-1} se aprecia una banda intensa de tensión asimétrica del $-\text{N}=\text{O}$ debido a que se trata de un nitrocompuesto aromático. Debido a la presencia de un anillo aromático, se observan dos bandas de absorción del C-N, por una parte, una banda de intensidad media debida a la conjugación del par de electrones del átomo de nitrógeno con el anillo de imidazol, que da cierto carácter de doble enlace al C-N en la región de 1265 cm^{-1} . Por otra parte, se presenta una banda fuerte, de frecuencia más baja que la anterior, en 1186 cm^{-1} debido a la tensión del C-N alifático.

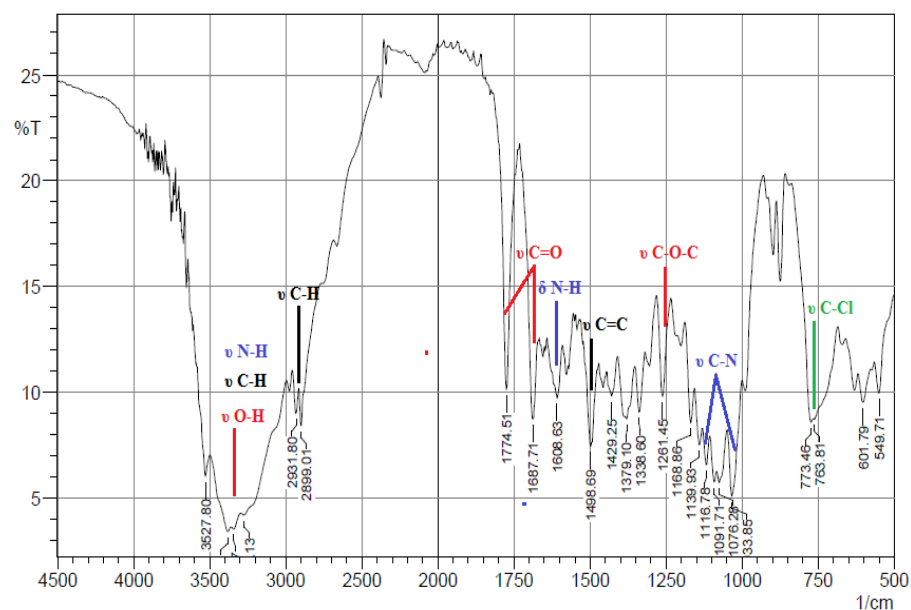


Figura 17. Espectro IR de la vancomicina.

En la figura 17 se observa el espectro infrarrojo de la vancomicina. En la región $3275\text{--}3527\text{ cm}^{-1}$ se observa un solapamiento de bandas anchas características de vibraciones de tensión del O-H tanto de los grupos carboxilo e hidroxilo presentes en la molécula de vancomicina. Así mismo, esta banda solapa las regiones de tensión del C-H del anillo aromático y de tensión simétrica y asimétrica de N-H. Además, es cercana a la región de $2899\text{--}2931\text{ cm}^{-1}$ donde se observan picos débiles atribuidos a la vibración de tensión de los grupos metilo. En la zona comprendida entre 1800 y 2300 cm^{-1} aproximadamente, se observan bandas combinadas de intensidad débil características de las sustituciones del benceno. En la región 1687 y 1774 cm^{-1} se presentan dos bandas características del grupo amídico debidas a la vibración de tensión del carbonilo de la amida C=O, y la zona de 1608 cm^{-1} que se debe a la vibración de flexión del N-H. En 1498 cm^{-1} se observa un pico de intensidad media atribuido a la vibración de tensión del C=C de los anillos aromáticos. En 1261 cm^{-1} se presenta una frecuencia de intensidad media característica a una vibración de tensión asimétrica del C-O-C. En la región comprendida entre 1076 y 1116 cm^{-1} se observan frecuencias que pueden atribuirse a las vibraciones de tensión del C-N donde hay cierto carácter de doble enlace del grupo debido a la conjugación del par de electrones del átomo de nitrógeno con el anillo aromático. En la zona $763\text{--}773\text{ cm}^{-1}$ se observa el desplazamiento de la banda característica de la absorción de tensión del C-Cl debido a la interacción con otros grupos.

5.2.2 Evaluación *in vitro* de actividad antibacteriana de aceites esenciales.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos (tablas 10 y 11) en la evaluación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de anís y romero frente a *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.

Tabla 10. Resultados de evaluación de actividad antimicrobiana de AE de anís y romero frente a *S. mutans*

Aceite Esencial/Compuesto de referencia	<i>Streptococcus mutans</i>	
	CIM ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	CBM ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Anís (<i>Pimpinella anisum</i>)	>2000	>2000
Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	>2000	>2000
Vancomicina	4-8	2-4

Nota: CIM (Concentración Inhibitoria Mínima), CBM (Concentración Bactericida Mínima).

De acuerdo con los resultados registrados en la tabla 10, se determinó que tanto el AE de anís como el AE de romero no presentaron actividad antibacteriana, en términos de CIM y CBM, frente a *S. mutans* en las concentraciones evaluadas. Así pues, comparando tales resultados con los reportados en diferentes estudios, se comprobó que el AE de romero no ejerce actividad antibacteriana, presentando una CIM superior a $2000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, tal y como lo determinaron Bernardes y colaboradores en 2010. Así mismo, la composición química reportada tanto para el AE de romero obtenido experimentalmente y el registrado por tales autores, fue similar, identificando los mismos componentes mayoritarios. Sin embargo, la cantidad relativa de ambos AE fue diferente, estableciendo que alcanfor (18,3%) y eucaliptol (24,7%) fueron los mayores componentes para el AE de romero reportado en la literatura y el obtenido, respectivamente.

Por otra parte, el resultado obtenido para el AE de anís no pudo ser comparado con estudios reportados, debido a que no hay evidencia de la acción antibacteriana de tal aceite frente a *S. mutans*. Sin embargo, se observó que el AE evaluado presentó similar composición que la reportada por Acimovic y colaboradores en 2015. En ambos casos se identificó al *trans*-anetol como mayor componente, con una cantidad relativa superior al 90%. Además, otros componentes como metil chavicol, α -himachaleno, γ -himachaleno y metilbutirato de *trans*-pseudoisoeugenilo, tuvieron cantidades relativas similares.

Ahora bien, el potencial de acción de los AE se ve relacionado, por una parte, con la composición química del AE, cuyas cantidades relativas (%) dependen del método de extracción empleado, y, por otra parte, con el método utilizado para la evaluación de la actividad antibacteriana (Ramírez y Marín, 2012). Sin embargo, el poder bactericida de los AE no es el mismo frente a todas las bacterias; algunas se ven afectadas a nivel de la membrana celular, donde ocurre una alteración en la estructura de los polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos causando una permeabilización. Este efecto depende de las mezclas de compuestos presentes en el AE, que pueden aumentar o disminuir el potencial antimicrobiano del AE frente a diferentes bacterias (De Carvalho, *et. al*, 2012).

Tanto el AE de romero como el AE de anís cuentan con la presencia de compuestos con actividad antibacteriana reportada frente a *S. mutans*. En primer lugar, en el AE de romero están presentes, en cantidades considerables, compuestos como eucaliptol (Aguilar, *et. al*, 2018), linalool y citronelol (Ferreira, *et. al*, 2018). En segundo lugar, en el AE de anís hay presencia de compuestos como *trans*-anetol (Park, *et. al*, 2004), eucaliptol y linalool. Sin embargo, la presencia de otros componentes generalmente minoritarios en los AE puede conducir a un efecto antagonista con el que el potencial antibacteriano puede disminuir (Bernardes, *et. al*, 2010). Algunos estudios reportaron que la presencia de compuestos como el *p*-cimeno y monoterpenos fenólicos, pueden ejercer tal acción (Botelho, *et. al*, 2007). En cuanto a los resultados de vancomicina, se determinó que la CIM experimental, es decir, $4-8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, fue superior a la CIM registrada por el CLSI, donde se estableció que *S. mutans* es susceptible a concentraciones $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ de vancomicina.

Tabla 11. Resultados de evaluación de actividad antimicrobiana de AE de anís y romero frente a *P. gingivalis*

Aceite Esencial/Compuesto de referencia	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	
	CIM ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	CBM ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
Anís (<i>Pimpinella anisum</i>)	2000-3000	1500
Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	750-1000	375-750
Metronidazol	256	128

Nota: CIM (Concentración Inhibitoria Mínima), CBM (Concentración Bactericida Mínima).

Según los resultados presentados en la tabla 11, se determinó que el microorganismo *Porphyromonas gingivalis* presentó susceptibilidad frente a los AE de anís y romero. Este último presentó mayor potencial antibacteriano en comparación con el AE de anís.

En la tabla se observa que el AE de romero presentó una CIM de 750-1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ y CBM de 375-750 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ frente a *P. gingivalis*. Al comparar estos resultados con los datos determinados por Bonilla y colaboradores en 2016 se estableció que el AE obtenido experimentalmente ejerció un potencial antibacteriano mayor, siendo esto evidenciado mediante el resultado de la CIM, para el que los autores registraron un resultado de 1000-1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sin embargo, el rendimiento del AE reportado en la literatura (0,67%) fue mayor al experimental, sugiriendo que el método de extracción y la parte de la planta empleada para la extracción fue determinante.

El efecto antibacteriano de este aceite esencial ha sido reportado en relación a la presencia de diferentes compuestos mayoritarios y minoritarios con potencial antibacteriano, entre ellos se encuentran el eucaliptol, α -pineno, linalool, geraniol, borneol y acetato de bornilo, entre otros.

Por otra parte, se evidenció que el AE de anís también presentó un efecto antibacteriano a una concentración de 2000-3000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, frente a *P. gingivalis*. Sin embargo, los datos no se pudieron comparar con reportes en la literatura, debido a que no hay evidencia de estudios de la actividad antibacteriana del AE de anís frente a este microorganismo. El efecto antibacteriano ejercido por

el aceite esencial de anís se atribuye a la presencia de componentes mayoritarios como *trans*-anetol y minoritarios tales como α -pineno, limoneno, eucaliptol, linalool, cuminaldehído y eugenol que actúan de forma sinérgica ejerciendo tal efecto. En cuanto a la CIM de metronidazol ($256 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) se estableció que en comparación con la CIM teórica ($0,125 \mu\text{g/mL}$) (Wright, *et. al*, 2006), el resultado de la CIM experimental es muy alto, sugiriendo que la sensibilidad del antimicrobiano se pudo ver alterada por diferentes factores entre los que se encuentran la posible resistencia de la cepa bacteriana trabajada o la composición del antimicrobiano puesto que no se utilizó un compuesto con una pureza al 99% certificada, pudiendo contener excipientes que alteraron el resultado obtenido.

5.3 Determinación de fitotoxicidad de aceites esenciales

5.3.1 Determinación de toxicidad aguda.

La determinación de la toxicidad aguda en especies vegetales como las semillas de repollo y tomate, y los bulbos de cebolla es una prueba estática que puede mostrar a través de alteraciones en su metabolismo, transporte de nutrientes y división celular la sensibilidad al estrés ambiental, al ser expuestas a sustancias puras o mezclas complejas como los AE (Rodríguez, *et. al*, 2014). El bioensayo de toxicidad aguda en las especies blanco se realizó mediante la cuantificación de la inhibición en la elongación de la radícula e hipocótilo, tal y como se observa en las figuras 18 y 19. Los datos fueron registrados en términos de CE_{50} (tablas 12 y 13), es decir, la concentración del AE de anís o romero capaz de causar el 50% de la inhibición de la elongación de las raíces e hipocótilo de tomate, repollo y cebolla.

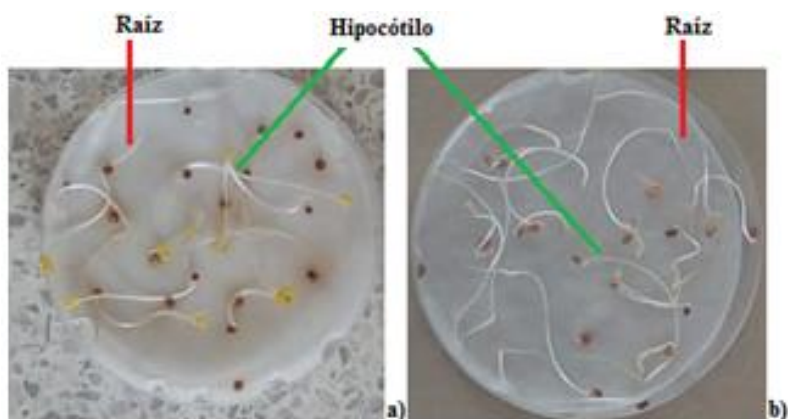


Figura 18. Elongación de embriones y raíces en los bioindicadores a) repollo (*Brassica oleracea*) y b) tomate (*Lycopersicon esculentum*) expuestos a los AE de romero y anís.

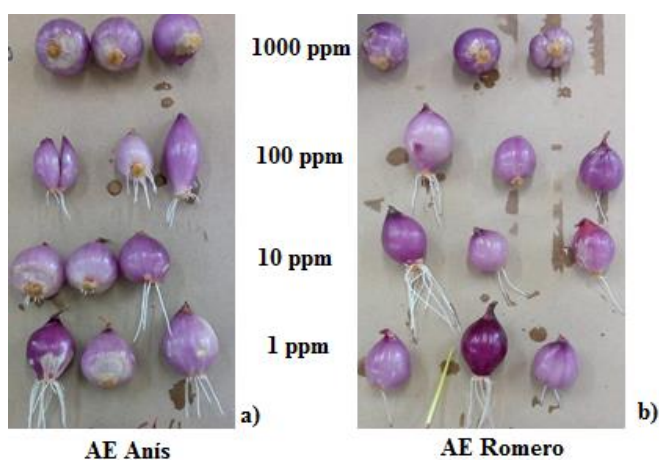


Figura 19. Elongación del sistema radicular de bulbos de cebolla (*Allium cepa*) expuestos a diferentes concentraciones de los AE de anís (a) y romero (b).

Tabla 12. Determinación de la toxicidad aguda de AE de anís y romero en semillas

Bioindicador		CE ₅₀ (μg*mL ⁻¹)	
		AE de anís	AE de romero
Repollo (<i>Brassica oleracea</i>)	Embrión	CE ₅₀ >1000	CE ₅₀ >1000
	Raíz	CE ₅₀ >1000	CE ₅₀ >1000
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Embrión	CE ₅₀ >1000	CE ₅₀ >1000
	Raíz	CE ₅₀ >1000	CE ₅₀ >1000

Nota: CE₅₀ (Concentración Efectiva media).

De acuerdo con los resultados registrados en la tabla 12 se determinó que los AE de anís y romero presentaron una CE_{50} superior a las concentraciones evaluadas frente a las semillas de repollo y tomate. Teniendo en cuenta esto, se estableció que las concentraciones evaluadas de AE de anís y romero (1, 10, 100, 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) son tan bajas, que no son suficientes para inhibir en un 50% el proceso de elongación de la radícula o del hipocótilo. Las respuestas obtenidas a partir de las pruebas de toxicidad realizadas en estas especies son en gran medida representativos de los efectos en semillas o plántulas en general, por lo que se puede decir que la presencia de los AE evaluados no interferirá en los procesos fisiológicos de otras plantas, es decir, que no alterará la supervivencia, desarrollo normal o capacidad de establecimiento de las plantas (Sobrero y Ronco, 2004).

Tabla 13. *Determinación de la toxicidad aguda de AE de anís y romero en bulbos de cebolla*

Bioindicador	CE_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
	AE de anís	AE de romero
Cebolla (<i>Allium cepa</i>)	27,41	5,24

Nota: CE_{50} (Concentración Efectiva media).

Sin embargo, en el caso de la toxicidad aguda frente a bulbos de cebolla (tabla 13) se presentó un retardo en el proceso de elongación de las raíces. Esto se debió a que la hidratación de los bulbos de cebolla se llevó a cabo en presencia de los AE de anís y romero en cuya composición hay una fuerte presencia de aleloquímicos que afectaron la división celular del sistema radicular, causando un efecto inhibitorio en el crecimiento normal de las raíces. Así pues, se establecieron CE_{50} de 27,41 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 5,24 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de los AE de anís y romero, respectivamente.

En ambos AE se observó un retardo en el proceso de elongación de las raíces a partir de la concentración más baja evaluada (1 ppm). Sin embargo, en el caso del AE de romero ocurrió una inhibición total de la elongación del sistema radical a 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, es decir, la concentración evaluada más alta, mientras que en esta misma concentración del AE de anís, aún se observó

crecimiento de algunas raíces. De acuerdo con esto, se determinó que el desarrollo normal del sistema radicular de los bulbos de cebolla es más sensible frente a la presencia del AE de romero, del cual se necesita una concentración de $5,24 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para causar inhibición en 50% de las raíces de los bulbos de cebolla evaluados. Mientras que el AE de anís debe estar presente a una concentración de $27,41 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para causar este mismo efecto.

Las regresiones lineales de la relación Dosis-Respuesta de los AE frente a bulbos de cebolla, a partir de las cuales se determinó la CE_{50} en cada caso, se observan en el apéndice N.

5.3.2 Determinación de genotoxicidad.

A continuación, en las figuras 20 y 21, y tabla 14 se presentan los resultados obtenidos de genotoxicidad en términos de % Índice Mitótico (IM) y % Aberraciones Cromosómicas (AC), respectivamente.

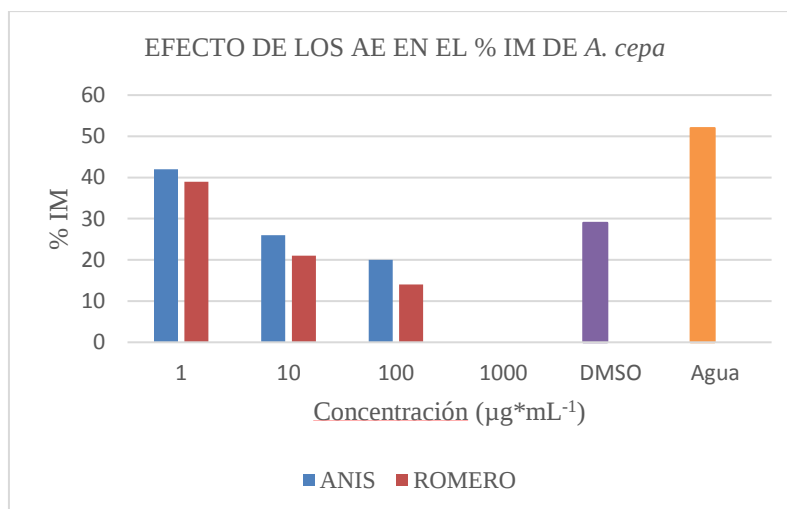


Figura 20. Diagrama del efecto de las soluciones de diferentes concentraciones de AE de anís y romero evaluadas frente al % IM en el sistema radicular de bulbos de cebolla.

Nota: C+ (control positivo: solución de DMSO al 0,38%) y C- (control negativo: agua comercial embotellada).

De acuerdo con los resultados presentados en la figura 20, se estableció que tanto las soluciones del AE de anís como del AE de romero causaron una disminución en la división celular en comparación con el control negativo. Sin embargo, se puede decir, que % IM de las células expuestas a ambos AE se pudo ver afectado por el efecto sinérgico ejercido entre el DMSO y cada AE. En la figura se observa, que % IM del DMSO (29%) disminuyó en un 23% con respecto al % IM del control negativo (52%).

Ahora bien, en el caso del AE de romero, el efecto genotóxico no solo se debe al DMSO sino también, a la presencia de uno de sus componentes mayoritarios, eucaliptol, del cual ha sido demostrada una fuerte actividad citotóxica sobre células eucariotas (Stojanović, *et. al*, 2010). Al observar la figura anterior se evidenció que a medida que las concentraciones de los AE aumentan, el % IM va disminuyendo. Además, para este aceite, se estableció un mayor potencial inhibitorio teniendo en cuenta que los % IM (39, 21, 14 y 0%) son más bajos en comparación con los datos obtenidos para el AE de anís, es decir, % IM de 42, 26, 20 y 0% para las concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 ppm, respectivamente.

Así pues, se puede decir que los AE causaron parte del efecto inhibitorio de la función mitótica en las células evaluadas, pudiéndose observar la acción inhibitoria a partir de la concentración más baja evaluada (1 ppm). En adición, a medida que avanzaron las fases cromosómicas, la cantidad de células en cada fase se fue reduciendo, hasta observarse un bloqueo total de la mitosis, en la mayor concentración evaluada (1000 ppm) de ambos aceites. La inhibición total de la división celular se estableció indirectamente teniendo en cuenta que este factor está relacionado con la elongación de las raíces, las cuales no se observaron en dicha concentración, evidenciando un fuerte efecto fitotóxico cuando los AE se evaluaron a 1000 ppm.

Además, se evidenció un efecto genotóxico por parte de los AE de anís y romero teniendo en cuenta los datos registrados en la figura 21. Se identificaron diferentes aberraciones cromosómicas que no solo fueron inducidas por la exposición a los AE, sino que también por la presencia de DMSO en cada solución. Estos compuestos pudieron actuar de forma sinérgica incrementando la cantidad de AC en cada una de las soluciones evaluadas.

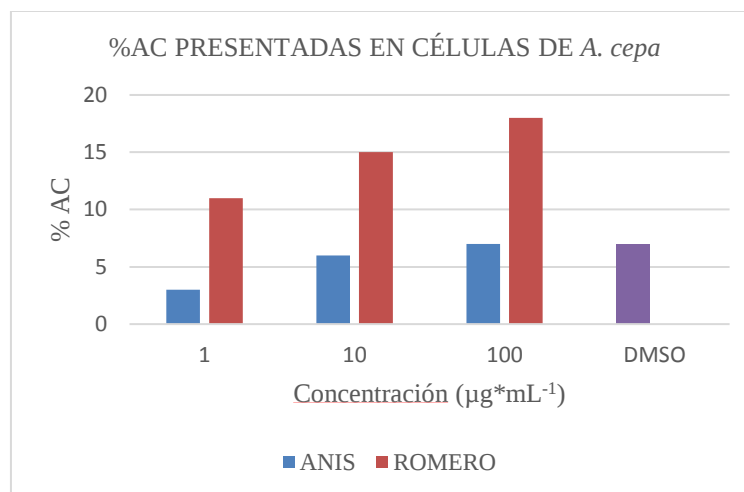
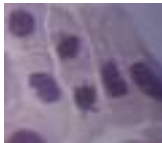


Figura 21. Diagrama del índice de Aberraciones Cromosómicas causadas en células de cebolla por los AE de anís y romero.

De acuerdo con la figura 21, se estableció una relación directa para ambos AE con respecto al % AC, es decir, que a medida que aumentó la concentración de cada solución de aceite, también incrementó el índice de aberraciones cromosómicas. Así mismo, se confirmó que el AE de romero ejerce un efecto genotóxico significativamente mayor sobre las células de cebolla, que el AE de anís. Lo anterior se vio reflejado en la cantidad de AC presentadas por fase; las células expuestas al AE de romero presentaron más aberraciones en metafase, anafase y telofase que el AE de anís. Sin embargo, el índice de AC a medida que avanzaban las fases fue disminuyendo debido a la interrupción de la división celular. Por otra parte, observando los datos registrados para el control positivo (DMSO 0,38%) se estableció que la presencia de este compuesto en las soluciones

realizadas de los AE induce la aparición de aberraciones cromosómicas, viéndose reflejado tanto en el % AC de la figura 21 (7%) y en la tabla 14 donde se observan las AC presentadas en la división de las células expuestas tanto a cada AE como al control positivo. Se determinó que los cromosomas pegajosos en metafase, puentes anafásicos, anafase tardía y cromosomas vagabundos en telofase, fueron inducidos por la presencia del DMSO en cada una de las soluciones de AE.

Tabla 14. *Aberraciones cromosómicas presentadas en células de cebolla expuestas a diferentes concentraciones de AE de anís y romero, y a DMSO 0,38% (C+: control positivo)*

Aceite Esencial	Metafase		Anafase		Telofase
	Metafase pegajosa	Puente anafásico	Anafase tardía	Anormal y distorsionada	Cromosomas vagabundos
Anís	 1, 10, 100 ppm	 1, 10, 100 ppm	 1, 10, 100 ppm	N.A.	 1, 10, 100 ppm
Romero	 1, 10, 100 ppm	 1, 10, 100 ppm	 1, 10, 100 ppm	 10, 100 ppm	 1, 10, 100 ppm
C+	 	 	 	N.A.	

Nota: N.A. (No Aplica)

Las aberraciones cromosómicas se caracterizan por ser anomalías presentadas en la estructura de los cromosomas o alteraciones morfológicas que se dan a nivel nuclear. La exposición del sistema radicular de los bulbos de cebolla frente a los AE de anís y romero provocó en las células

alteraciones tanto anaugénicas (segregación cromosómica anormal) como clastogénicas (rompimiento de cromosomas). Las anomalías anaugénicas evidenciadas fueron cromosomas vagabundos, metafase con cromosomas pegajosos, anafase tardía y anafase anormal y distorsionada en el caso de AE de romero y metafase pegajosa, cromosomas vagabundos y anafase tardía en el caso de AE de anís. Mientras que las alteraciones clastogénicas se debieron a la presencia de puentes anafásicos para las células expuestas a ambos AE.

De acuerdo con lo anterior, se determinó que las sustancias evaluadas presentaron mayor inducción de aberraciones anaugénicas que actúan a nivel de estructuras celulares impidiendo la fijación de las fibras del huso mitótico, y por consecuencia, provocando un desplazamiento y pérdida de cromosomas, mientras que la presencia de cromosomas pegajosos se pudo deber al bloqueo de la descondensación de la cromatina, interrupción relacionada con el efecto del AE frente la estructura de esta sustancia (Restrepo, *et. al*, 2012).

En presencia de los AE, el progreso de la división celular fue bloqueado en cada una de las fases mitóticas, viéndose reflejado en los resultados de genotoxicidad en las células de *A. cepa* cuyos datos han sido validados por varios investigadores que realizaron pruebas en animales *in vitro* y los resultados obtenidos fueron similares, proporcionando valiosa información para la salud humana (Bonciu, *et. al*, 2018). Lo anterior está relacionado con la similitud de la morfología de los cromosomas de plantas y animales (Nefic, *et. al*, 2013), puesto que se trata de células somáticas eucariotas, que realizan su división celular a través de mitosis, por lo que se sugiere que cualquier acción ejercida por una sustancia química durante el proceso de división celular en células vegetales o animales es una respuesta que puede ser comparable con cualquier tipo de célula que se divida mediante un proceso mitótico.

6. Conclusiones

Se obtuvieron aceites esenciales de anís (*P. anisum*) y romero (*R. officinalis*) mediante hidrodestilación asistida por microondas con rendimientos de 0,44 y 0,58% respectivamente. Los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales fueron *trans*-Anetol (92,1%) en el caso de anís y Eucaliptol (24,7%), α -Pino (14,3%) y Verbenona (10,7%) en el caso de romero.

Los aceites esenciales de anís y romero presentaron actividad antibacteriana frente a *P. gingivalis*, para los cuales se establecieron CIM de 2000-3000 $\mu\text{g/mL}$ y 750-1000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, demostrando que el aceite esencial de romero cuenta mayor potencial antibacteriano que el aceite esencial de anís. Sin embargo, en el caso de *S. mutans*, no se evidenció actividad antibacteriana a las concentraciones evaluadas de los AE.

El desarrollo del sistema radicular de los bulbos de cebolla evaluados fue más sensible frente a la presencia de las concentraciones evaluadas de los AE de anís y romero, en comparación con el desarrollo de la radícula y el hipocótilo de las semillas de tomate y repollo, en el cual los AE carecen de un efecto fitotóxico debido a que su CE_{50} fue superior a 1000 ppm. Sin embargo, el AE de romero ($\text{CE}_{50}=5,24$ ppm) genera un efecto inhibitor mayor al causado por el AE de anís ($\text{CE}_{50}=27,41$ ppm).

Los AE de anís y romero presentaron genotoxicidad frente a las células de las raíces de bulbos de cebolla. Sin embargo, estos resultados se vieron afectados por la acción del DMSO. El AE de romero presentó mayor efecto inhibitorio de la división celular que el AE de anís teniendo en cuenta el índice mitótico establecido en cada caso. Este efecto se vio reflejado en los datos del crecimiento del sistema radicular de los bulbos expuestos a las diferentes soluciones de AE. Tanto el AE de anís como el AE de romero indujeron a una mayor cantidad de aberraciones aneuploídicas

ocasionando distintas alteraciones relacionadas con el desplazamiento, pérdida y segregación anormal de cromosomas.

Es importante continuar realizando estudios sobre las distintas propiedades biológicas de los AE, otorgadas por la variedad de compuestos químicos presentes, debido a que reportes científicos han demostrado que es necesario recurrir a alternativas de origen natural, que contribuyan a disminuir los problemas ambientales relacionados con la acumulación de sustancias sintéticas, como los agentes antimicrobianos y otros compuestos biocidas, que dan lugar al incremento de la presencia de contaminantes emergentes, provocando efectos tóxicos en el ser humano y dentro de los ecosistemas.

7. Recomendaciones

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se recomienda seguir investigando la actividad bactericida de los AE de anís y romero frente a *P. gingivalis*, gracias a las distintas sustancias con propiedad antibacteriana presentes en la composición química de cada uno.

Se recomienda continuar con la investigación de la actividad bactericida y fitotóxica de otros aceites esenciales, así como las propiedades que pueden tener los compuestos mayoritarios presentes en ellos.

Referencias Bibliográficas

- Acimovic, M.; Tesevic, V.; Todosijevic, M.; Djisalov, J. y Oljaca, S. (2015). Compositional characteristics of the essential oil of *Pimpinella anisum* and *Foeniculum vulgare* grown in Serbia. *Botanica SERBICA*. 39(1), 09-14.
- Acosta, S.; Barrios, Y.; González, F. y Tacoronte, J. E. (2011). Evaluación de biocidas para su posible uso en depósitos combustibles. *CENIC*. 42(3), 119-123.
- Aguilar, E. G.; Aguilar, K. V.; Garay, B.; Mamani, V. y Quispe, M. M. (2018). Actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* de aceites esenciales de cinco plantas alto andinas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 35(1).
- Aissa, D. y Boch, B. (2015). *Toxicología Genética y Salud Ambiental*. Córdoba, Argentina: Centro de Estudios de Población y Desarrollo.
- Albarracín, G. C. y Gallo, S. G. (2003). *Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial utilizando Piper aduncum (Cordoncillo) procedente de la zona cafetera*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Colombia, Manizales, Colombia.
- Anguiano, L. y Zerón, A. (2015). Las enfermedades periodontales y su relación con enfermedades sistémicas. *Revista Mexicana de Periodontología*. 6(2). 77-87.
- Asawahame, C.; Sutjarittangtham, K.; Eitssayeam, S.; Tragoolpua, Y.; Sirithunyalug, B. y Sirithunyalug, J. (2015). Antibacterial Activity and Inhibition of Adherence of *Streptococcus mutans* by Propolis Electrospun Fibers. *APPS PharmSciTech*. 16(1), 182-191.
- Ávalos, A. y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca*. 2(3), 119-145.
- Ávila, R.; Navarro, A. R.; Vera, O.; Dávila, R. M.; Melgoza, N. y Meza, R. (2011). Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios. *Ciencia y mar*. 15(43), 23-46.
- Bernardes, W.; Lucarini, R.; Tozatti, M.; Bocalon, L.; Souza, M.; Turatti, I.; Andrade, M.; Martins, C.; Da Silva, A. y Cunha, W. (2010). Antibacterial Activity of the Essential Oil from *Rosmarinus officinalis* and its Major Components against Oral Pathogens. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*. 65(9-10), 588-593.

- Berrocal; A. M.; Blas, R. H.; Flores, J. y Siles, M. A. (2013). Evaluación del potencial mutagénico de biocidas (vertimec y pentacloro) sobre cebolla. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 15(1), 17-27.
- Bhowal, M. y Gopal, M. (2016). Structure of eucalyptol (1, 3, 3-Trimethyl-2-oxabicyclo [2, 2, 2] octane). [Figura]. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/292176635_Eucalyptol_Safety_and_Pharmacological_Profile
- Bonciu, E.; Firbas, P.; Fontanetti, C. S.; Wusheng, J.; Karaismailoğlu, M. C.; Liu, D.; Menicucci, F.; Pesnya, D.; Popescu, A.; Romanovsky, A. V.; Schiff, S.; Ślusarczyk, J.; De Souza, C. P.; Srivastava, A.; Sutan, A. y Papini, A. (2018). An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. *Caryologia*. 71(3), 191-209.
- Bonilla, D. M.; Mendoza, Y.; Moncada, C. E.; Murcia, O.; Rojas, A. P.; Calle, J.; Pinzón, R. y Neiro, L. (2016). Efecto del aceite esencial de *Romarinus officinalis* sobre *Porphyromonas gingivalis* cultivada *in vitro*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* 45(2), 275-287.
- Bosio, S. y Dail, H. (2012). Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. *Environmental contamination*. Brasil. InTech. 137-156.
- Botelho, M. A.; Nogueira, N. A. P.; Bastos, G. M.; Fonseca, S. G. C.; Lemos, T. L. G.; Matos, F.J. A.; Montenegro, D.; Heukelbach, J.; Rao, V. S. y Brito, G. A. C. (2007). Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 40(3), 349-356.
- Brandariz, D.; Guarc, E.; García, B.; Picón, R. y Hernández, V. (2018). Pancitopenia inducida por vancomicina: descripción de un caso. *Farmacia Hospitalaria*. 42(1).
- Brescó, M.; Costa, N.; Berini, L. y Gay, C. (2006). Susceptibilidad antibiótica de las bacterias causantes de infecciones odontogénicas. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)*. 11(1).
- Bugueño, I. M. (2014). *Caracterización de aislados clínicos de Porphyromonas gingivalis y su efecto en la viabilidad de células epiteliales gingivales*. (Tesis de posgrado). Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile.

- Caputo, L.; Trotta, M.; Romaniello, A. y De Feo, V. (2018). Chemical Composition and Phytotoxic Activity of *Rosmarinus officinalis* Essential Oil. *Natural Product Communications*. 13(10), 1367-1370.
- Castaño, H. I.; Ciro, G.; Zapata, J. E. y Jiménez, S. L. (2010). Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 17(2). 149-154.
- Castillo, G. (Ed.). (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. México: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
- Causil, L. A.; Coronado, J. L.; Verbel, L. F.; Vega, M. F.; Donado, K. A. y Pacheco, C. (2017). Efecto citotóxico del hipoclorito de sodio (NaClO), en células apicales de raíces de cebolla (*Allium cepa* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 11(1), 97-104.
- Cerna, V. W. (2016). *Efecto Antibacteriano in vitro del Aceite Esencial de Cymbopogon citratus (Hierba Luisa) frente a Streptococcus mutans 25175*. (Tesis de maestría). Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo, Perú.
- Cerpa, M. G. (20007). *Hidrodestilación de aceites esenciales: Modelado y caracterización*. (Tesis de doctorado). Universidad de Valladolid, Valladolid, España.
- Cerutti, M. y Neumayer, F. (2004). Introducción a la obtención de aceite esencial de limón. *Invenio*. 7(12), 149-155.
- Chen, W.; Vermaak, I. y Viljoen, A. (2013). The chemical structure of the (1R)-(+) and (1S)-(-) enantiomers of camphor. [Figura]. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6270224/>
- Chertok, Y. (2005-2019). Primer plano de floración Rosemary (*Rosmarinus officinalis*). [Figura]. Recuperado de: https://es.123rf.com/photo_71966930_primer-plano-de-floraci%C3%B3n-rosemary-rosmarinus-officinalis-.html
- Cueva, J. (2017). *Actividad antimicrobiana del aceite esencial de romero (Rosmarinus officinalis) frente al crecimiento de Streptococcus mutans ATCC 25175 in vitro*. Lima 2016. (Tesis de pregrado). Universidad Privada Norbert Wiener, Lima, Perú.
- Cunha, A. G. y Gandini, A. (2010). Chemical structure of myrcene (My) and limonene (LM). [Figura]. Recuperado de:

- https://www.researchgate.net/publication/248777964_Turning_polysaccharides_into_hydrophobic_materials_A_critical_review_Part_1_Cellulose
- De Carvalho, L. C.; Fernandes, V.; Fernandes, S. M.; Da Cunha, M. G.; Tasca, A. L.; De Carvalho, J. E.; Sartoratto, A.; Garcia, V. L.; Figueira, G. M.; Teixeira, M. C.; Ikegaki, M.; De Alencar, S. M. y Rosalen, P. L. (2012). Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Streptococcus mutans* and their Antiproliferative Effects. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 12.
- Demirci, F.; Noma, Y.; Kirimer, N. y Can, H. (2004). The biotransformation of (-)-carvone (1) and its metabolism to the diol 10-hydroxy-(+)-neodihydrocarveol (4) via (+)-trans-dihydrocarvone (2) and (+)-neodihydrocarveol (3) in 4 days. [Figura]. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/23462918_Microbial_Transformation_of_-Carvone
- Dhifi, W.; Bellili, S.; Jazi, S.; Bahloul, N. y Mnif, W. (2016). Essential Oil's Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines*. 3(4). 25.
- Dhifi, W.; Bellili, S.; Jazi, S.; Bahloul, N. y Mnif, W. (2016). Structure of some terpenes. [Figura]. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5456241/>
- Díaz, J.; Yáñez, J.; Melgar, S.; Álvarez, C.; Rojas, C. y Vernal, R. (2012). Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*. 5(1). 40-45.
- Dominy, SS.; Lynch, C.; Ermini, F.; Benedyk, M.; Marczyk, A.; Konradi, A.; Nguyen, M.; Haditsch, U.; Raha, D.; Griffin, C.; Holsinger, LJ.; Arastu-Kapur, S.; Kaba, S.; Lee, A.; Ryder, MI.; Potempa, B.; Mydel, P.; Hellvard, A.; Adamowicz, K.; Hasturk, H.; Walker, GD.; Reynolds, EC.; Faull, RLM.; Curtis, MA.; Dragunow, M. y Potempa, J. (2019). *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Science Advances*. 5(1).
- Duke, J. (2019). Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases. EU. Recuperado de: <https://phytochem.nal.usda.gov/phytochem/search/list>
- Ecosostenible. (2017). *Pimpinella anisum*. [Figura]. Recuperado de: <http://antropocene.it/es/2017/07/09/pimpinella-anisum/>

- Elsharif, S.; Banerjee, A. y Buettner, A. (2015). Lavender oil main constituents. [Figura]. Recuperado de: <https://mediatum.ub.tum.de/doc/1344478/1344478.pdf>
- Elyemni, M.; Louaste, B.; Nechad, I.; Elkamli, T.; Bouia, A.; Taleb, M.; Chaouch, M. y Eloutassi, N. (2019). Extraction of Essential Oils of *Rosmarinus officinalis* L. by Two Different Methods: Hydrodistillation and Microwave Assited Hydrodistillation. *The Scientific World Journall*. 2019.
- Emani, S.; Gunjiganur, G. y Singh, D. (2014). Determination of the antibacterial activity of simvastatin against periodontal pathogens, *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: An *in vitro* study. *Contemp Clin Dent*. 5(3), 377-382.
- Farhat, A.; Ginies, C.; Romdhane, M.; Chemat, F. (2009). Eco-friendly and cleaner process for isolation of essential oil using microwave energy. Experimental and theoretical study. *Journal of Chromatography A*. 1216, 5077-5085.
- Farias, G. J.; Frescura, D. V.; Boligon, A. A.; Trapp, C. K.; Andriolo, L. J.; Tedesco, B. S.; Bernardy, K.; Schwalbert, R.; Del Frari, K. B.; Carey, M. y Nicoloso, T. F. (2018). Chemical properties and protective effect of *Rosmarinus officinalis*: mitigation of lipid peroxidation and DNA-damage from arsenic exposure. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 91, 1-7.
- Feijoo, J. F.; Abeleira, M. T. y Castro, M. (2016). *Protocolo de administración de antibióticos en pacientes alérgicos a los betalactámicos*. [Archivo PDF]. Recuperado de: http://www.coeg.eu/wp-content/uploads/2016/05/30_antibioticos_uso_betalactamicos_01-1.pdf
- Ferreira, G. L. S.; Bezerra, L. M. D.; Ribeiro, I. L. A.; Morais, R. C. D. y Castro, R. D. (2018). Susceptibility of cariogenic microorganism to phytoconstituents. *Brazilian Journal of Biology*. 78(4), 691-696.
- Flores, M. C. (2010). *Investigación de los aceites esenciales, sus características y finalidad de uso. Análisis del estado de su regulación en Chile y el mundo* (Tesis de pregrado). Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile.
- Foroughi, A.; Pournaghi, P.; Najafi, F.; Zangeneh, A.; Mahdi, M. y Moradi, R. (2016). Evaluation of Antibacterial Activity and Phytochemical Screeaning of *Pimpinella anisem's Essential Oil*. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 8(11), 1886-1890.

- Gamboa, F.; Acosta, A.; García, D.; Velosa, J.; Araya, N. y Ledergerber, R. (2014). Occurrence of *Porphyromonas gingivalis* and its antibacterial susceptibility to metronidazole and tetracycline in patients with chronic periodontitis. *Acta odontológica Latinoamericana*. 27(3), 137-144.
- García, J. E.; García, E. y García, M. I. (2014). Estudios de sensibilidad en bacterias anaerobias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 32(1), 23-29.
- Guarín, O. D. y Barajas, A. F. (2015). Hidrodestilación asistida con microondas (MWHd) para la extracción de hidrolatos de plantas aromáticas. *Revista Politécnica*. 11(21), 51-55.
- Gutiérrez, M. C. y Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín INTEXTER*. (122), 35-41.
- Hernández, J. N. y Rengel, A. (2002). Actividad antibacteriana de dos desinfectantes en función de la temperatura y el tiempo de contacto. *Ciencia*. 10(4), 332-339.
- Horna, G.; Silva, M.; Vicente, W. y Tamariz, J. (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Médica Herediana*. 16(1).
- Ibdciencia. (2015). Orceína B solución hidroacética 100 mL. España. Recuperado de: <https://www.ibdciencia.com/es/colorantes-e-indicadores-para-laboratorios/5600-orceina-b-solucion-hidroacetica-100-ml.html>
- Jaramillo, A.; Betancourth, M.; Mayorga, I.; Castillo, D. M.; Aya, M. R.; Lafaurie, G. I.; Botero, J. E. y Contreras, A. (2008). Perfiles Antimicrobianos de Bacterias Subgingivales en Pacientes con Periodontitis en Colombia. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*. 1(2), 61-65.
- Kermanshah, H.; Hashemi, S.; Arami, S.; Kamalinegad, M.; Karimi, M.; Mirsalehian, A.; Jabalameli, F. y Kharazi, M. (2014). The Effect of Hydro Alcoholic Extract of Seven Plants on Cariogenic Bacteria-An *in Vitro* Evaluation. *OHDM*. 13(2), 395-401.
- Khalil, N.; Ashour, M.; Fikry, S.; Naser, A. y Salama, O. (2018). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of selected Apiaceous fruits. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 4(1), 88-92.
- Kobad, M.; Hossain, J.; Uddin, A. (2017). Bioautography of ethyl acetate extract of *Drynaria quercifolia* tubers on *Staphylococcus saprophyticus* after thin-layer chromatography

- (TLC). [Figura]. Recuperado de: https://www.researchgate.net/figure/Bioautography-of-ethyl-acetate-extract-of-Drynaria-quercifolia-tubers-on-Staphylococcus_fig1_280726993
- Kumara, M.; Sayeed, M. y Rani, U. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2016.
- Kürkçüoğlu, M.; Koşar, M. y Baser, K. (2019). Comparison of Microwave-Assisted Hydrodistillation and Hydrodistillation Methods for *Pimpinella anisum* L. *Journal of Research in Pharmacy*.
- Lizcano, A. J. y Vergara, J. L. (2008). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extratos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos*. (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D. C., Colombia.
- Melka, B.; Asaminew, G.; Mieso, B. y Sisay, W. (2018). Structures of major abundant compounds of *Rosemarinus officinalis*. [Figura]. Recuperado de: <https://www.longdom.org/open-access/chemotypic-characterization-and-antioxidant-activities-of-rosemarinusofficinalis-essential-oil-from-ethiopian-cultivars-2167-0412-1000325.pdf>
- Mendiola, M. A. y Montalbán, J. M. (2009). *Plantas aromáticas gastronómicas*. Madrid, España. Ediciones Mundi-Prensa.
- Miljkovic, V.; Arsic, B.; Bojanic, Z.; Nikolic, G.; Kalicanin, B. y Savic, V. (2014). Structure of metronidazole. [Figura]. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/262413775_Interactions_of_metronidazole_with_other_medicines_A_brief_review
- Molina, J. y Uribarren, T. (2017). Generalidades de bacterias. México: *Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM*. Recuperado de: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html>
- Montoya, G. J. (2010). *Aceites Esenciales. Una alternativa de diversificación para el Eje Cafetero*. Manizales, Colombia. Universidad Nacional de Colombia.
- Moreno, S. y Contreras, A. (2013). Factores de virulencia de *Porphyromonas gingivalis*. *Fundación Juan José Carraro*. (37), 16-27.

- Natural Healing Room. (s.f.). Anise seed (*Pimpinella anisum*). [Figura 3]. Recuperado de: <https://naturalhealingroom.com/shop/herbs-spices/anise-seed-pimpinella-anisum/>
- Nava, E.; García, C.; Camacho, J. R. y Vázquez, L. (2012). Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*. 8(3b), 17-29.
- NCCLS. (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. CLSI Document M7-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Nefic, H.; Musanovic, J.; Metovic, A. y Kurteshi, K. (2013). Chromosomal and Nuclear Alterations in Root Tip Cells of *Allium Cepa* L. Induced by Alprazolam. *Medical Archives*. 67(6), 388-392.
- Nieto, G.; Ros, G.; Castillo, J. (2018). Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A Review. *Medicines*. 5(3), 98.
- NIST. (2018). Eucalyptol Mass Spectrum. [Figura]. Recuperado de: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C470826&Mask=200>
- NIST. (2018). alpha-pinene Mass Spectrum. [Figura]. Recuperado de: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C80568&Mask=200>
- NIST. (2018). endo-borneol Mass Spectrum. [Figura]. Recuperado de: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C507700&Mask=200>
- NIST. (2018). Linalool Mass Spectrum. [Figura]. Recuperado de: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C78706&Mask=200>
- NIST. (2018). Geraniol Mass Spectrum. [Figura]. Recuperado de: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C106241&Mask=200>
- NIST. (2018). Bornyl acetate Mass Spectrum. [Figura]. Recuperado de: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C76493&Mask=200>
- NIST. (2018). Anethole Mass Spectrum. [Figura]. Recuperado de: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C104461&Mask=200>
- Ojeda, J. C.; Oviedo, E. y Salas, L. A. (2013). *Streptococcus mutans* y caries dental. *Revista CES Odontología*. 26(1).
- Olguín, L. P. y Rodríguez, H. M. (2004). *Cromatografía de gases*. UNAM. Ciudad de México, México.

- OMS. (2018). Resistencia a los antimicrobianos. *Organización Mundial de la Salud*. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>
- OMS. (2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. *Organización Mundial de la Salud*. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>
- OMS. (2017). Resistencia a los antibióticos. *Organización Mundial de la Salud*. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/es/>
- Özcan, M. M. y Chalchat, J. C. (2006). Chemical composition and antifungal effect of anise (*Pimpinella anisum* L.) fruit oil at ripening stage. *Annals of Microbiology*. 56(4).
- Palmier, R. (2013). Uso combinado de metronidazol y amoxicilina en el tratamiento sistémico de infecciones periodontales. *El dentista moderno*. Recuperado de: <https://www.eldentistamoderno.com/2013/12/uso-combinado-de-metronidazol-y-amoxicilina-en-el-tratamiento-sistemico-de-infecciones-periodontales/2/>
- Palomer, L. (2006). Caries dental en el niño. Una enfermedad contagiosa. *Revista Chilena de Pediatría*. 77(1), 56-60.
- Park, J. S.; Baek, HH.; Bai, D.; Oh, TK. y Lee, CH. (2004). Antibacterial activity of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seed essential oil against the growth of *Streptococcus mutans*. *Food science and biotechnology*. 13(5), 581-585.
- Pedraza, P. N. y Castellanos, H. J. (2009). *Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través de métodos in vitro*. (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Peredo, H. A.; Palou, E. y López, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 3(1), 24-32.
- Pérez, E. e Iglesias, L. (2003). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 21(9), 469-534.
- Pino, J. A. (2015). *Aceites esenciales química, bioquímica, producción y usos*. La Habana, Cuba: Editorial Universitaria.

- Pino, O.; Sánchez, Y.; Rojas, M.; Abreu, Y. y Correa, T. (2012). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimpinella anisum* L. *Revista de Protección vegetal*. 27(3), 181-187.
- Pirez, M. y Mota, M. (2008). *Morfología y Estructura Bacteriana*. Temas de Bacteriología y Virología Médica. 2 ed. Montevideo, Uruguay: Universidad de la República.
- Plascencia, G. (2003). *Espectrometría de masas*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México.
- Porte, L.; Braun, S.; Dabanch, J.; Egaña, A. y Andrighetti, D. (2009). *Streptococcus mutans*: Una bacteria que hace honor a su nombre. *Revista Chilena de Infectología*. 26(6).
- Quijano, D. M. (2016). *Impacto ambiental de los medicamentos. Una aproximación desde el pensamiento ambiental*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Quintero, A. M. y Rangel, K. J. (2016). *Determinación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales frente a Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus y Candida albicans*. (Tesis de grado no publicada). Recuperado el 17/08/19. Universidad Santo Tomás, Bucaramanga, Colombia. Disponible en el sitio web de la fuente, <https://repository.usta.edu.co/handle/11634/9419>
- Ramírez, D. A. (2017). *Determinación de la concentración efectiva CE₅₀ de dos plaguicidas comerciales con dimetoato como ingrediente sobre plántulas de lechuga (Lactuca sativa fam asteraceae) variedad "Batavia"*. (Tesis de pregrado). Universidad Santo Tomás, Bogotá, Colombia.
- Ramírez, L. S. y Marín, D. (2009). Metodologías para evaluar *In vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*. 15(42), 263-268.
- Ramírez, L. S. y Marín, D. (2009). Métodos para el estudio de susceptibilidad antimicrobiana. [Figura]. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84916714049>
- Ramírez, L. S. y Marín, D. (2012). Evaluación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales y extracto etanólicos utilizando métodos de difusión en agar y dilución en pozo. *Scientia et Technica*. 17(50), 152-157.
- Razzaghi-Abyaneh, M.; Yoshinari, T.; Shams-Ghahfarokhi, M.; Rezaee, M.; Nagasawa, H. y Sakuda, S. (2007). Biosynthesis of Aflatoxins B₁ and G₁ from O-Methylsterigmatocystin

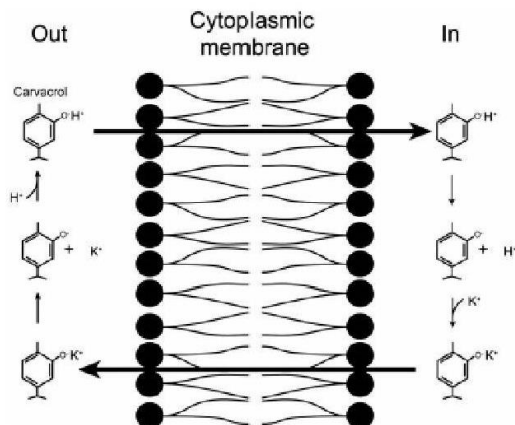
- (A), and Structures of Dillapiol, Apiol and Myristicin (B). [Figura]. Recuperado de: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1271/bbb.70264>
- Restrepo, R.; Reyes, D.; Ortiz, M.; Rojas, F. y Kouznetsov, V. (2012). Aberraciones cromosomales en bulbos de cebolla *Allium cepa* inducidas por moléculas híbridas 4-aminoquinolónicas. *Universitas scientiarum* 17(3), 253-261.
- Revilla, N. (2009). *Análisis farmacocinético-farmacodinámico de vancomicina en pacientes de UCI*. (Tesis de doctorado). Universidad de Salamanca, Salamanca, España.
- Rivas, A. C.; Monteiro, P.; Barros, M. M.; Machado, D. C.; Sales, C. y Sales, D. (2012). Structural formulas of α -pinene and β -pinene enantiomers. [Figura]. Recuperado de: <https://cyberleninka.org/article/n/996881.pdf>
- Rogers, W. J. (2012). Sterilisation of Biomaterials and Medical Devices. *Woodhead Publishing Series in Biomaterials*, 151-211.
- Rolim, L. F.; Frei, F.; Mancini, E.; De Martino, L. y De Feo, V. (2010). Phytotoxic Activities of Mediterranean Essential Oils. *Molecules*. 15(6), 4309-4323.
- Saad, N. Y.; Muller, C. D. y Lobstein, A. (2013). Schematic representation explaining the hypothesis of carvacrol mechanism of action. [Figura]. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/236671827_Major_bioactivities_and_mechanism_of_action_of_essential_oils_and_their_components
- Salehi, B.; Prakash, A.; Shukla, I.; Sharifi-Rad, M.; Contreras, M.; Segura, A.; Fathi, H.; Nasri, N.; Kobarfard, F. y Sharifi-Rad, J. (2017). Structure of cymene, thymol and carvacrol. [Figura]. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/325011493_Thymol_thyme_and_other_plant_sources_Health_and_potential_uses
- Sánchez, H. H. (1 ed.) (2013). *El cultivo de anís. Aspectos a considerar para la producción de anís*. Catamarca, La Rioja, Argentina: Ediciones INTA.
- Santana, M.; Almeida, W.; Nascimento, P.; Da Silva, A. P. y Nuñez, R. (2018). Potentially Phytotoxic of Chemical Compounds Present in Essential Oil for Invasive Plants Control: A Mini-Review. En R. Radhakrishnan (Ed.). *Biological Approaches for Controlling Weeds* (49-62).
- Sattur, A. P.; Lee, J. H.; Song, K. B.; Panda, T.; Kim, C. H.; Rhee, S. K. y Gokul, B. (2000). Structure of vancomycin. [Figura]. Recuperado de:

- https://www.researchgate.net/publication/226522068_Analytical_techniques_for_vancomycin-A_review
- Segovia, E. A.; Arrúa, R. A.; Barrozo, N. C.; Duré, R. D.; Nakayama, H. D. y Peralta, I. (2016). Evaluación de los efectos mutagénicos/antimutagénicos de *Luehea divaricata* en ratones. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*. 14(3), 102-106.
- Sharma, A.; Pal, H.; Batish, D. R. y Kumar, R. (2019). Different types of chromosomal and cytological aberrations induced by *H. suaveolens* EO in *A. cepa* root tips after 24 h of treatment. [Figura]. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30665103>
- Shojaii, A. y Abdollahi, M. (2012). Review of Pharmacological Properties and Chemical Constituents of *Pimpinella anisum*. *International Scholarly Research Network*. 2012.
- Sigma-Aldrich. (2019). *P-anisaldehyde*. [Figura]. Recuperado de: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/a88107?lang=en®ion=CO>
- Silva, B. C.; Soares, A.; Yamamoto, C. H.; Costa, M. R.; Gutterres, A.; Alves, M. S.; Dos Santos, A. L. y Vieira, O. (2018). Oxidation reaction of methyl chavicol to obtain 2-[(4-methoxyphenyl)methyl] oxirane. [Figura]. Recuperado de: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2018/2189348/>
- Sobrero, M. C. y Ronco, A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca Sativa L.*). En G. Castillo. (Ed.), *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones* (55-67). Ottawa, Canadá: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo.
- Stojanović, Z.; Nešić, M.; Čomic, L. y Radulović, N. (2010). Antimicrobial activity and cytotoxicity of commercial Rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis L.*). *Biologica Nyssana*. 1(1-2), 83-88.
- Taroco, R.; Seija, V. y Vignoli, R. (2008). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. En FEFMUR (Ed.), *Temas de Bacteriología y Virología Médica* (763-772). Montevideo, Uruguay: Editorial Oficina del Libro FEFMUR.
- Tedesco, S. B. y Laughinhouse IV, H. D. (2012). Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. In: Srivastava J, editor. Environmental contamination. Croatia: InTech; 137-156 citado en: *An evaluation for the standardization of the Allium cepa test as cytotoxicity and genotoxicity assay*. Recuperado de:

- https://www.researchgate.net/publication/327654759_An_evaluation_for_the_standardization_of_the_Allium_cepa_test_as_cytotoxicity_and_genotoxicity_assay
- Tejada, C.; Quiñonez, E. y Peña, M. (2014). Contaminantes emergentes en aguas: metabolitos de fármacos. Una revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*. 10(1), 80-101.
- Torrenegra, M. E.; Pájaro, N. P. y León, G. (2017). Actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales de diferentes especies del género *Citrus*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 46(2). 160-175.
- Torres, K. T. y Torres, M. A. (2018). *Obtención, Caracterización y Evaluación de la Actividad Antibacmicrobiana de Aceites Esenciales de diversa familias frente a Enterobacterias y Candida albicans*. (Tesis de pregrado no publicada). Recuperado el 17/08/19. Universidad Santo Tomás, Bucaramanga, Colombia. Disponible en el sitio web de la fuente, <https://repository.usta.edu.co/handle/11634/16824>
- Torres, M. E. (2002). *Relación huésped parásito: mecanismos de defensa del huésped*. Universidad de La República, Montevideo, Uruguay.
- Vargas, T. (2014). Morfología Bacteriana. *Revista de Actualización Clínica Investiga*. 49.
- Vega, E. y López, A. (2009). Agentes antimicrobianos presentes en especias y hierbas. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 3. 1, 85-95.
- Velasco, R.; Mesa, A.; Gil, J.; García, C. y Durango, D. (2015). Structure of trans-anethole (A). [Figura]. Recuperado de: https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-trans-anethole-A_fig4_285582520
- Vera, A. P. (2009). *Evaluación del efecto protector del aceite esencial de Lippia alba sobre la toxicidad del mercurrocromo en raíces de Allium cepa*. (Tesis de maestría). Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia.
- Vera, D. C. (2014). *Eficacia in vitro de la pasta CTZ y pasta 3MIX en el crecimiento de Streptococcus mutans, Streptococcus salivarius, Enterococcus faecalis y Candida albicans en laboratorios de la facultad de odontología de la UCSM, Arequipa*. 2014. (Tesis de especialización). Universidad Católica de Santa María. Arequipa, Perú.
- Weiman, S. (2015). Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test. [Figura]. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519801/figure/fig8/>
- Wright, T.; Ellen R.; Lacroix, J.; Sinnadurai, S. y Mittelman, M. (2006). Effects of metronidazole on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. *Journal of Periodontal Research*. 32(5), 473-477.

Apéndices

Apéndice A. Efecto antibacteriano de compuestos fenólicos (ej. Carvacrol).

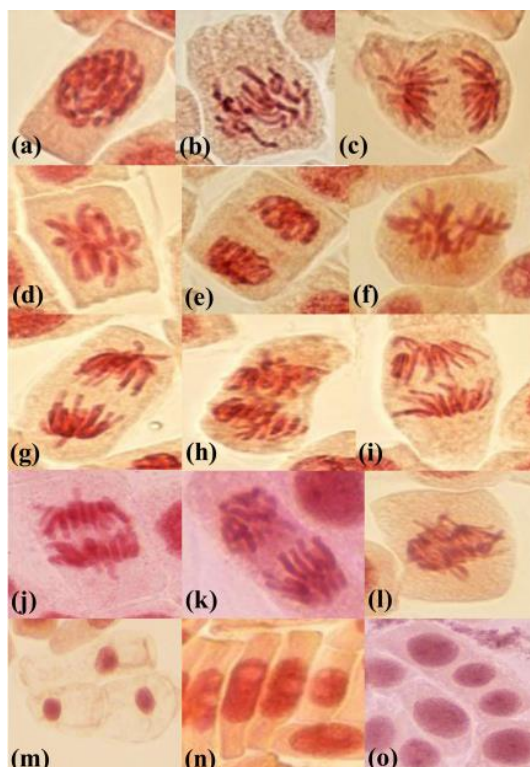


Nota: El carvacrol no disociado se difunde a través de la membrana citoplasmática hasta el citoplasma donde se disocia liberando un protón. En el citoplasma, el carvacrol adhiere un ion potasio (u otro ion), que luego será transportado a través de la membrana citoplasmática hacia el ambiente externo. Una vez fuera de la membrana, un protón se fija nuevamente en el carvacrol, que libera el ion potasio. En su forma protonada (no disociada), el carvacrol está listo para difundirse nuevamente a través de la membrana citoplasmática y se disocia, liberando el protón en el citoplasma. Adaptado de: “Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components”, por Saad, *et. al*, 2013.

Apéndice B. Métodos de determinación de susceptibilidad antimicrobiana.

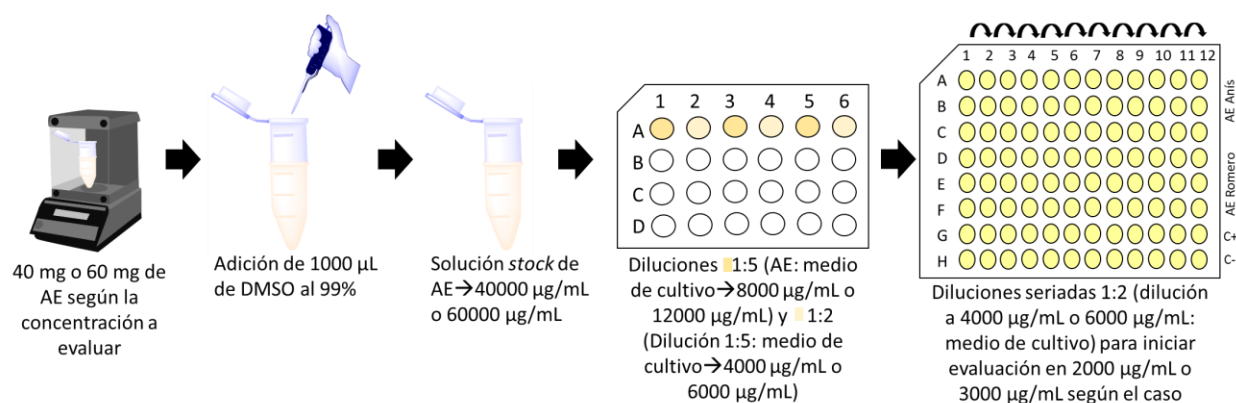
Método	Categorías	CIM (µg/mL)
Difusión en agar	S, I, R	No
Dilución en agar	S, I, R	Sí
Dilución en caldo	S, I, R	Sí
Métodos automatizados	S, I, R	Sí

Nota: S, susceptible; I, intermedio; R, resistente. Adaptado de: “Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal”, por Ramírez y Marín, 2009.

Apéndice C. Aberraciones Cromosómicas presentadas en células de cebolla (*Allium cepa*).

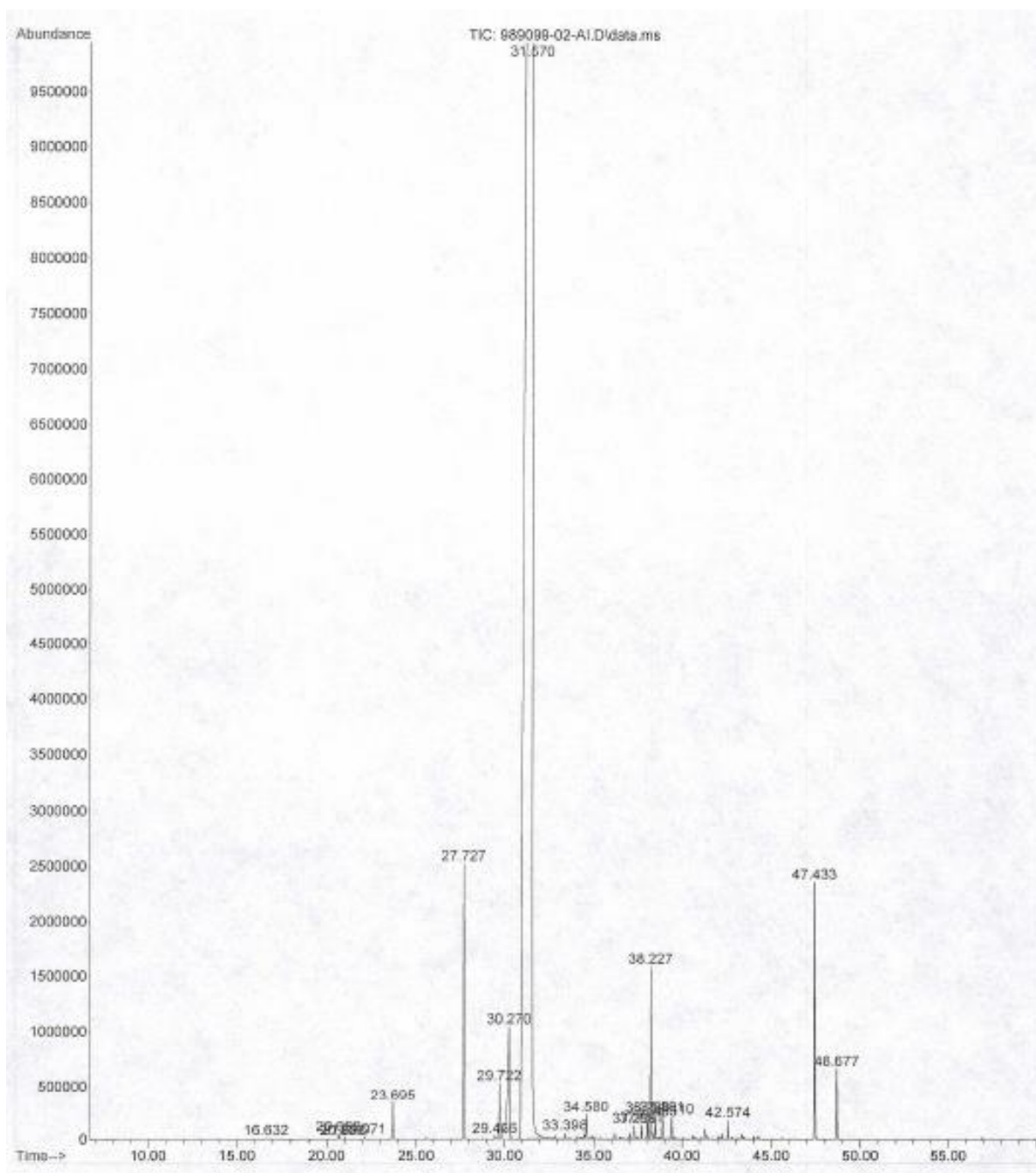
Nota: (a, b, c) cromosomas pegajosos en metafase y anafase; (d, e) c-mitosis; (f) anafase anormal y distorsionada; (g, h, i) anafase tardía; (i) anafase multipolar; (j) cromosoma vagabundo; (k) anafase con puentes múltiples; (l) aberraciones citológicas: citoplasma destruido con núcleos periféricos; (m) células alargadas con interfase extendida; (n) célula binucleada. Adaptado de: “Chemical profiling, cytotoxicity and phytotoxicity of foliar volátiles of *Hyptis suaveolens*”, por Sharma, *et. al*, 2019.

Apéndice D. Diseño experimental de diluciones realizadas para evaluación de actividad antibacteriana de AE.



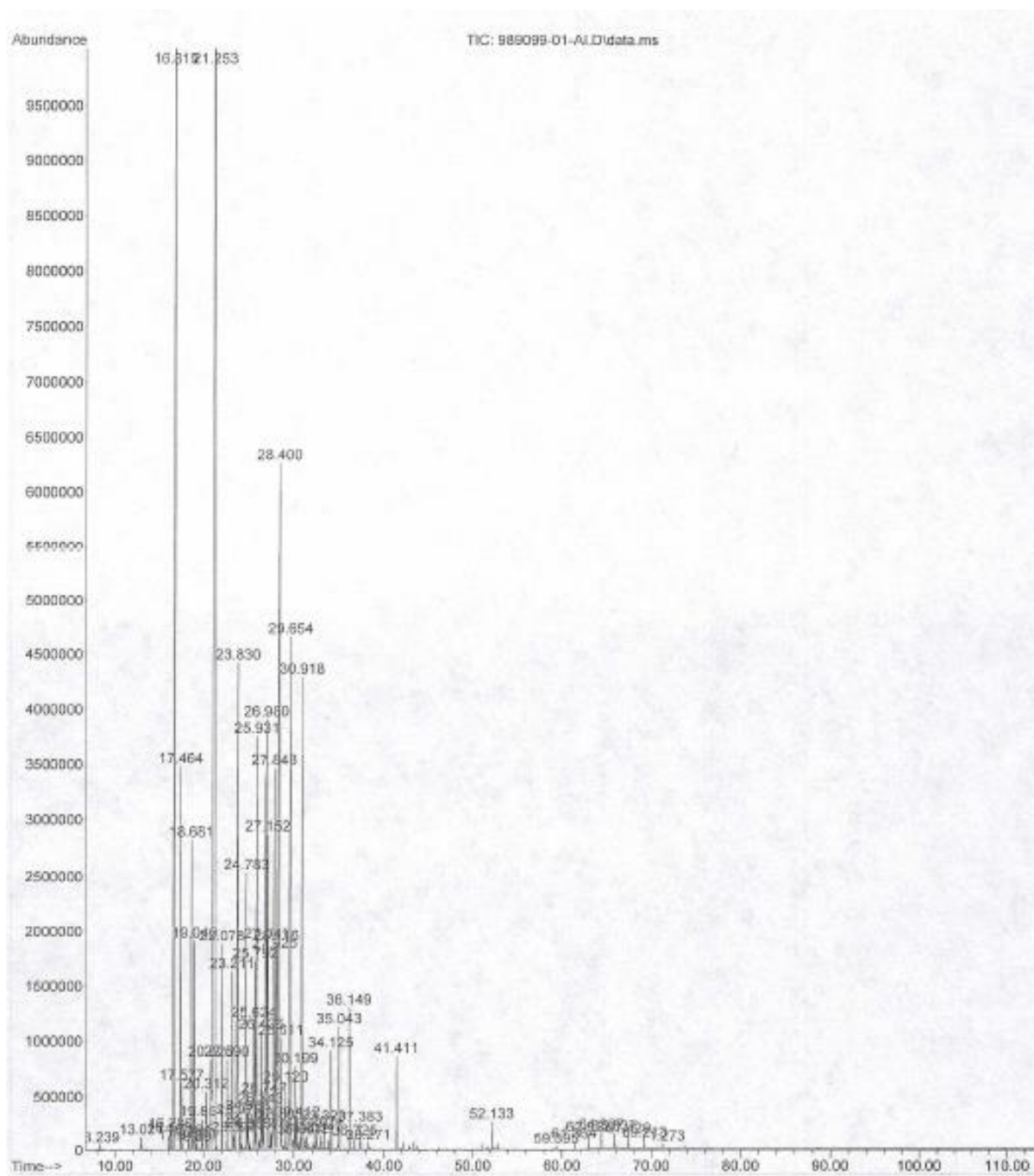
Nota: Diluciones realizadas para la determinación de la actividad antibacteriana de los AE de anís y romero. Se pesaron aproximadamente 40 o 60 mg de cada AE, dependiendo de la concentración inicial a evaluar, es decir, 2.000 o 3.000 µg/mL, respectivamente. A continuación, se le agregó al AE pesado, 1000 µL de DMSO al 99%, con el fin de obtener una solución *stock* con concentración de 40.000 o 60.000 µg/mL. A partir de esta solución, se realizó una dilución 1:5, en una placa de 24 pocillos, agregando 200 µL de la solución *stock* en 800 µL de medio de cultivo, obteniendo diluciones de concentración de 8.000 o 12.000 µg/mL. De estas diluciones se realizó una de relación 1:2, añadiendo 500 µL de la dilución 1:5 en 500 µL de medio de cultivo, dando lugar a diluciones con concentración de 4.000 o 6.000 µg/mL. En la placa de 96 pocillos, se realizaron diluciones seriadas 1:2, a partir de la dilución 1:2 realizada en la placa de 24 pocillos, iniciando la evaluación de la actividad a una concentración de 2.000 o 3000 µg/mL.

Apéndice E. Corriente iónica total reconstruida (cromatograma) del AE de anís analizado por GC-MS operado en el modo *full scan*.



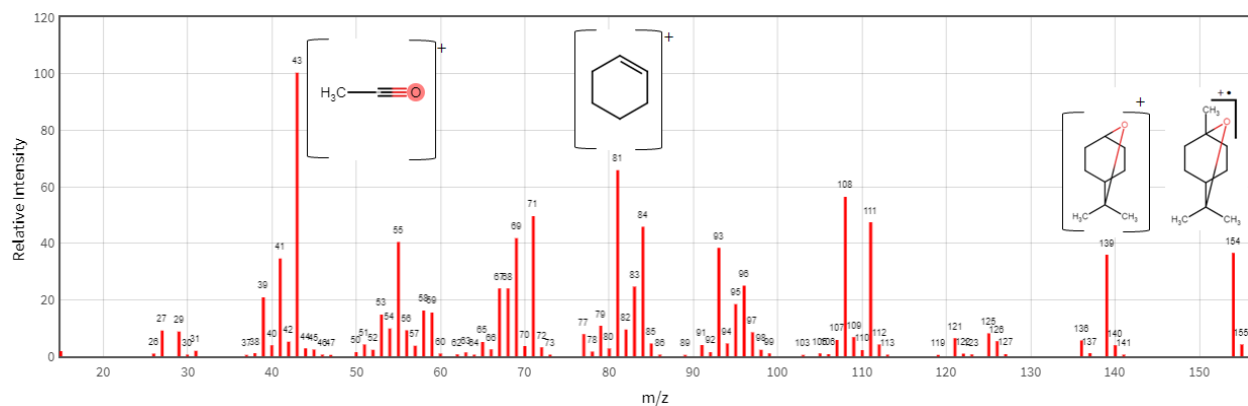
Nota: Datos adaptados a partir de la caracterización química del AE de romero realizada por GC-MS en el laboratorio CROM-MASS.

Apéndice F. Corriente iónica total reconstruida (cromatograma) del AE de romero analizado por GC-MS operado en el modo *full scan*.

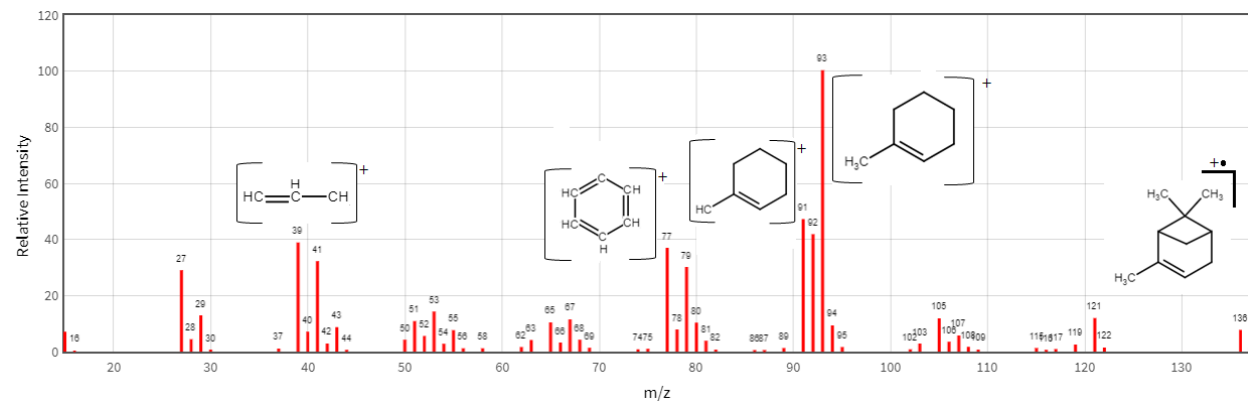


Nota: Datos adaptados a partir de la caracterización química del AE de anís realizada por GC-MS en el laboratorio CROM-MASS.

Apéndice G. Fragmentación propuesta para eucaliptol.

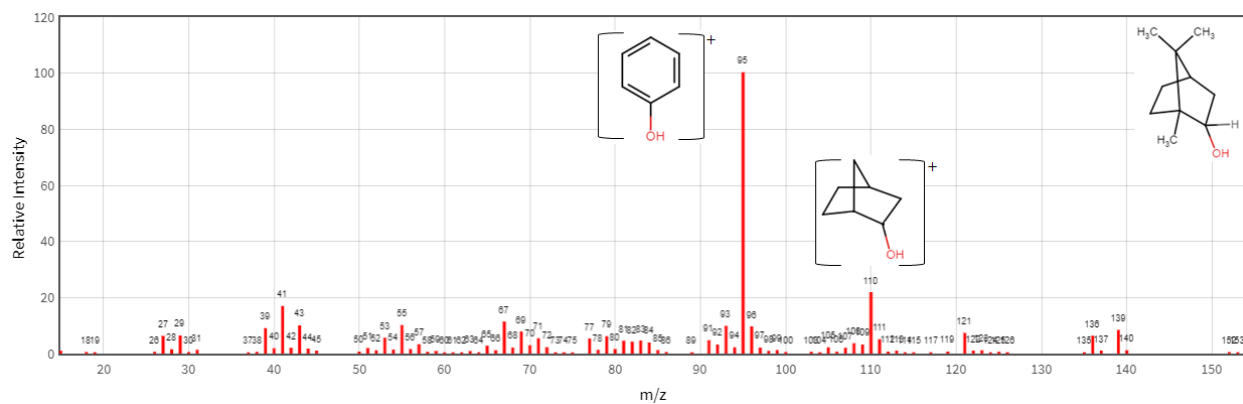


Nota: Espectro de masas de eucaliptol adaptado de: NIST, 2018.

Apéndice H. Fragmentación propuesta para α -pineno.

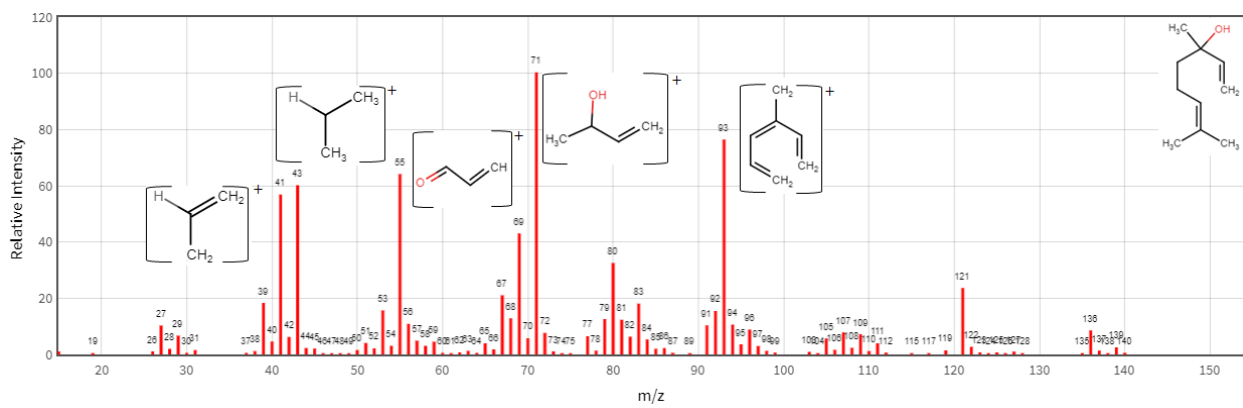
Nota: Espectro de masas de α -pineno adaptado de: NIST, 2018.

Apéndice I. Fragmentación propuesta para borneol.



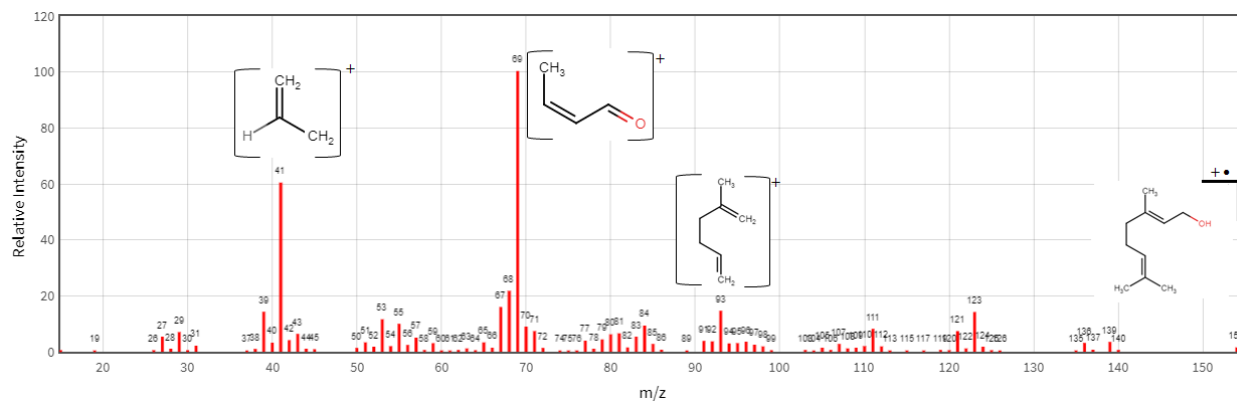
Nota: Espectro de masas de borneol adaptado de: NIST, 2018.

Apéndice J. Fragmentación propuesta para linalool.



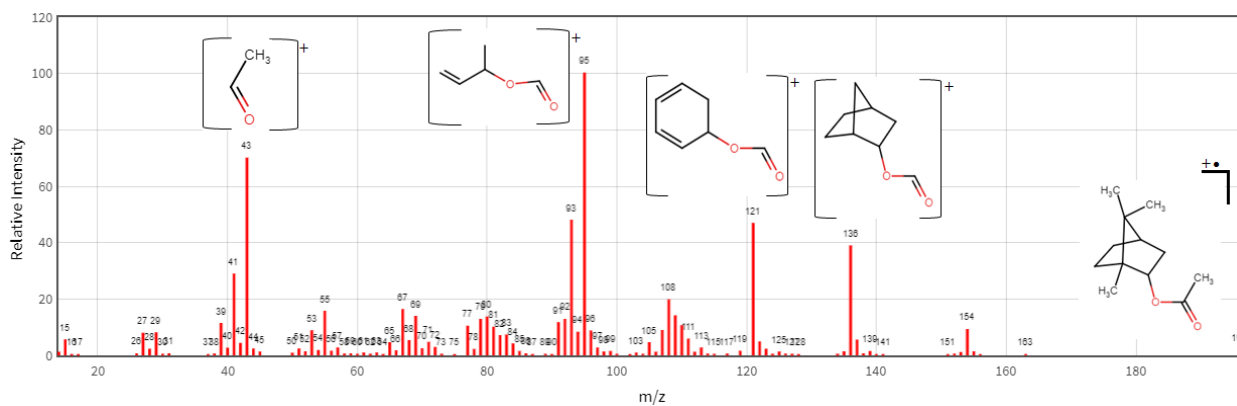
Nota: Espectro de masas de linalool adaptado de: NIST, 2018.

Apéndice K. Fragmentación propuesta para geraniol.

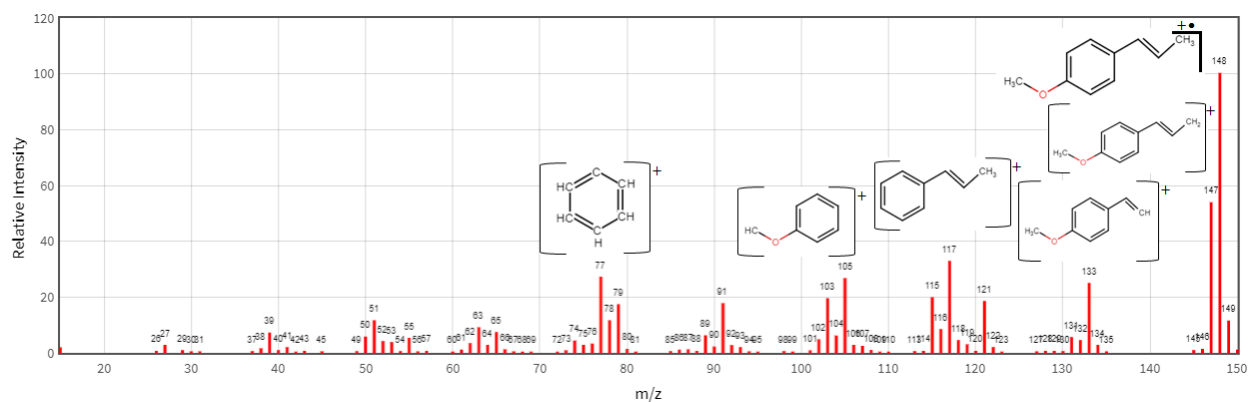


Nota: Espectro de masas de geraniol adaptado de: NIST, 2018.

Apéndice L. Fragmentación propuesta para acetato de bornilo.



Nota: Espectro de masas de acetato de bornilo adaptado de: NIST, 2018.

Apéndice M. Fragmentación propuesta para *trans*-anetol.

Nota: Espectro de masas de *trans*-anetol adaptado de: NIST, 2018.

Apéndice N. Regresión lineal de Dosis-Respuesta de AE de anís y romero frente a bulbos de cebolla.

