



# UNIVERSIDAD DE MURCIA

## FACULTAD DE BIOLOGÍA

Estudio de la Variabilidad Química, Propiedades Antioxidantes y Biocidas de Poblaciones Espontáneas de *Rosmarinus Officinalis* L. en la Región de Murcia

**Dña. Vanesa Lax Vivancos**  
**2014**





Universidad de Murcia.  
Facultad de Biología.



Instituto Murciano  
de Investigación y  
desarrollo Agrario y  
Alimentario.

Estudio de la variabilidad química,  
propiedades antioxidantes y biocidas de  
poblaciones espontáneas de *Rosmarinus officinalis*  
L. en la Región de Murcia.

Memoria de Tesis presentada por D<sup>a</sup> Vanesa Lax Vivancos  
para optar al grado de Doctor.

Dirigida por D<sup>a</sup> María José Jordán Bueso y D. José Antonio  
Sotomayor Sánchez

Murcia, 2014



D.<sup>a</sup> María José Jordán Bueso, Doctora investigadora perteneciente al Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) del Departamento de Recursos Naturales

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Estudio de la variabilidad química, propiedades antioxidantes y biocidas de poblaciones espontáneas de *Rosmarinus officinalis* L. de la Región de Murcia", realizada por D.<sup>a</sup> Vanesa Lax Vivancos, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En La Alberca-Murcia, a 29 de julio de 2014



Dra. María José Jordán Bueso



D. José Antonio Sotomayor Sánchez, Doctor investigador perteneciente al Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) del Departamento de Recursos Naturales

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Estudio de la variabilidad química, propiedades antioxidantes y biocidas de poblaciones espontáneas de *Rosmarinus officinalis* L. de la Región de Murcia", realizada por D.<sup>a</sup> Vanesa Lax Vivancos, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En La Alberca-Murcia, a 29 de julio de 2014



Dr. José Antonio Sotomayor Sánchez







UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

Vicerrectorado de  
Estudios

**D<sup>a</sup> VANESA LAX VIVANCOS**  
**C/ Mariano Caballero, 14, 2º E**  
**30161 LLANO DE BRUJAS (MURCIA)**

Vista la solicitud presentada el día 13 de diciembre de 2013, por D<sup>a</sup> VANESA LAX VIVANCOS, con D.N.I.: 48.509.776-Q, sobre autorización para presentación de tesis doctoral como compendio de publicaciones con carácter previo a la tramitación de la misma en la Universidad de Murcia, le comunico que la Comisión de General de Doctorado, vistos:

- el informe previo del Presidente de la Comisión Académica del Doctorado en Biología molecular y biotecnología, y
- el visto bueno de la Comisión de Ramas de Conocimiento de Ciencias,

resolvió, en su sesión de 16 de diciembre de 2013, **ACCEDER** a lo solicitado por la interesada pudiendo, por lo tanto, presentar su tesis doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones.

Lo que en cumplimiento del artículo 58 de la vigente Ley 30/1992, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común, de 26 de noviembre, se **notifica a D<sup>a</sup> VANESA LAX VIVANCOS**, significándole que contra este acuerdo, y conforme a lo establecido en el artículo 21.2 de los Estatutos de la Universidad de Murcia, podrá interponer recurso de alzada ante el Sr. Rector Magfco de esta Universidad, en el plazo de un mes a partir del día siguiente a la recepción de la misma.

Murcia, 16 de diciembre de 2013  
Vicerrectora de Estudios y  
Presidenta de la Comisión General de Doctorado



*Clay*  
Concepción Palacios Bernal





D. JOSE BAUTISTA TUDELA SERRANO, Catedrático de Universidad del Área de Bioquímica y Biología Molecular y **Presidente Comisión Académica programa doctorado** \* Biología Molecular y Biotecnología, INFORMA:

Que una vez evaluado, de conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 21 del Reglamento de doctorado de la Universidad de Murcia, el expediente completo de la tesis doctoral titulada "Estudio de la variabilidad química, propiedades antioxidantes y biocidas de poblaciones espontáneas de Rosmarinus officinalis L. en la Región de Murcia", realizada por D<sup>a</sup> Vanesa Lax Vivancos, bajo la inmediata dirección y supervisión de D<sup>a</sup>. María José Jordán Bueso y D. José Antonio Sotomayor Sánchez, Doctores investigadores pertenecientes al Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) del Departamento de Recursos Naturales, esta Comisión Académica, en sesión celebrada en fecha 25/Julio/2014, ha dado su autorización para su presentación ante la Comisión General de Doctorado.

Murcia, a 25 de Julio de 2014





UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

**Doctorando: D<sup>a</sup>. Vanesa Lax Vivancos**

*\*Informe del Departamento para alumnos del RD 778/1998.*

*\*Informe de La Comisión Académica del Programa para alumnos del RD 56/2005 y RD 1393/2007.*





Instituto Nacional de  
Investigación y Tecnología  
Agraria y Alimentaria



Instituto Murciano de  
Investigación y desarrollo  
Agrario y Alimentario.

Esta tesis ha sido financiada gracias a una beca predoctoral del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), a través del proyecto “Prospección, recolección y conservación de germoplasma, caracterización química, selección, estudios de propagación y cultivo en ecológico, de poblaciones silvestres de plantas aromáticas y medicinales de la flora española” (RTA2005-00168-C04-03).



## **AGRADECIENTOS**

Al Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), por poner a mi disposición las instalaciones, medios técnicos e instrumentación necesarios para el desarrollo del trabajo experimental.

A mi directora de Tesis, María José Jordan Bueso, que ha sido un pilar fundamental en mi formación gracias a sus consejos y paciencia, que hicieron amenas tantas horas de correcciones y revisiones. A mi director de Tesis, Jose Antonio Sotomayor Sanchez, gracias a quien ahora no solo entiendo los programas de estadística, si no que hasta los encuentro interesantes. Gracias por todo tu tiempo y dedicación para sacar este proyecto adelante.

A mi tutora de la universidad, María Angeles Pedreño García, gracias por tu ayuda y tu total disonibilidad para solucionar cualquier papeleo, y por acogerme para relaizar la tesis de master como una más de tu equipo. A Lorena, quien me ayudó en ese mundo hasta entonces desconocido de “Los callos de lechuga”. A mi difunto tutor de la universidad Alfonso Ros Barceló, que aunque apenas nos conociamos, me acoció bajo su tutela sin dudarlo siquiera.

A Carmina Rota y Susana Loran de la facultad de veterinaria de Zaragoza, quienes pusieron a mi disposición el material, métodos y todo el cariño necesarios para poder realizar mis experimentos. Así como a los becarios/ as que conocí y me acogieron como una “Mañica” más.

## AGRADECIMIENTOS

A los todos mis compañeros del departamento de Recursos Naturales, a los que han estado y los que están. A Rosi, Maria Quilez, María de Haro, Jose Antonio, Carmen Patiño, M<sup>a</sup> Carmen Jimenez, Inma Moñino e Inma García, Aranzazu, Cristina, Ana. A los alumnos en prácticas que han pasado por el laboratorio y nos han tocado el corazón con su forma de ser, Facundo, Jose David, Veronica....

A todo el equipo del IMIDA gracias por vuestro apoyo y colaboración para poder llevar a cabo este proyecto, en especial a Manolo que me gestionaba, con una sonrisa, cualquier tramite que necesitara, ya fuera una estancia o simplemente más bolis para el departamento.

A mi familia, que habéis estado ahí apoyandome para finalizar este proyecto. Por vuestros ánimos y buenos consejos. A mi esposo Pedro, por entender lo importante que es este proyecto para mi, esperar tardes enteras pacientemente para poder ver una peli y por cederme tu mini-portátil de forma permanente para trabajar allá donde fuéramos juntos.



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**µg**: microgramo

**µL**: microlitro

**µm**: micras

**µM**: micromolar

**ABTS**: 2,2-azinobis-(3-etilbenzotioazolín-6-sulfónico

**bar**: 10<sup>6</sup> barias.

**BHA**: butilato hidroxianisol

**BHT**: butilato hidroxitolueno

**C**: alcanfor

**cm**: centímetro

**DPPH**: 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl

***E. coli*** : *Escherichia coli*

**E**: eucaliptol

**EEUU**: Estados Unidos

**FRAP**: ferric-reducing antioxidant power

**g**: gramo

**h**: horas

**ha**: hectárea

**HPLC**: cromatógrafo líquido de alta resolución

**IMIDA**: Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario.

**INIA**: Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria.

**IR**: índice de retención

**ISO**: Organización Internacional de Normalización

**kg**: kilogramo

**L. m. m.**: Lower Meso-Mediterranean / Piso Meso Mediterráneo Inferior

***L. monocytogenes*** : *Listeria monocytogenes*

## ABREVIATURAS

**L. t. m.:** Lower Thermo-Mediterranean/Piso

Termomediterráneo Inferior

**L:** litro

**m,** average temperature of the lowest temperatures in the coldest month/ Promedio de las temperaturas más bajas en el mes más frío

**m.s.n.m.:** metros sobre el nivel del mar

**M:** average temperature of the highest temperatures in the coldest month/Promedio de la temperaturas más altas en el mes más caluroso.

**M:** molar

**mbar:** milibar

**MBC:** concentración mínima bactericida

**mg:** miligramos

**MIC:** concentración mínima inhibitoria

**min:** minutos

**mL:** mililitro

**mm:** milímetro

**mM:** milimolar

**nd.:** no detectado

**nm:** nanómetro

**°C:** grados centigrados

**p-cimeno:** para-cimeno

**ppb:** partes por billón

**ppm:** partes por millón

**ROS:** especies reactivas del oxígeno

**S. aureus :** *Staphylococcus aureus*,

**S. S. Typhimurium:** *Salmonella typhimurium*

**S.m:** Supra-Mediterranean/ Piso Supramediterráneo

**s:** segundos

**T:** average annual temperature/Media anual de temperaturas.

**t:** toneladas

**tr:** trazas.

**Trolox:** 6-hidroxi-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-ácido  
carboxílico

**U E:** Unión Europea

**U. m. m.:** Upper Meso-Mediterranean/ Piso Mesomediterráneo superior

**U. t. m.:** Upper Thermo-Mediterranean/ Piso Termomediterráneo superior

**UNE:** normas tecnológica española creadas por comités técnicos de normalización

**UV:** ultravioleta

**Vol:** volumen

**$\alpha$ P:** alfa pineno

## ABREVIATURAS

## **TESIS COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES**

	Página
<b>I. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS .....</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
1. Usos tradicionales del romero.....	9
2. El género Rosmarinus .....	11
2.1. Taxonomía del género Rosmarinus.....	11
2.2. Caracterización y morfología de <i>R. officinalis</i> L .....	12
2.3. Distribución de <i>R. officinalis</i> L.....	15
3. Taxonomía química .....	18
3.1. Composición química del aceite esencial.....	18
3.1.1. Actividad biológica .....	22
3.2. Extracto polifenólico de romero .....	25
3.2.1. Actividad biológica .....	27
4. Interés económico.....	32
4.1. Mercado internacional.....	34
4.2. Mercado de aceite esencial .....	37
5. Posibilidades de cultivo .....	41
<b>III. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
1. Aceite esencial.....	45
2. Extracto polifenólico.....	51
<b>IV. CONCLUSIONES .....</b>	<b>59</b>
<b>V. RESUMEN .....</b>	<b>63</b>
<b>VI. SUMMARY.....</b>	<b>69</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>75</b>

<b>VIII. APORTACIÓN CIENTÍFICA.....</b>	<b>99</b>
<b>IX. PUBLICACIONES.....</b>	<b>107</b>
1. Artículo I.....	109
2. Artículo II.....	113
3. Artículo III.....	117
4. Artículo IV .....	121
<b>X. ANEXO I .....</b>	<b>125</b>
1. Otras publicaciones .....	127
<b>XI. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.</b>	
1. Tabla 1: Taxonomía del género <i>Rosmarinus</i> .....	11
2. Figura 1: Planta de romero en floración .....	13
3. Figura 2: Detalle de tallo, flor y hoja de <i>R. officinalis</i> .....	14
4. Figura 3: Distribución del romero en la península ibérica .....	16
5. Figura 4: Distribución global de las plantas de <i>R. officinalis</i> .....	17
6. Figura 5: Distribución de quimiotipos de romero en la península Ibérica y Baleares (Valera <i>et al.</i> , 2009).....	21
7. Tabla 2: Autorizaciones para la recolección de romero: (Fuente: Dirección General del Medio Natural). .....	33
8. Tabla 3: Área y cantidades recolectadas anualmente en monte: (Fuente: Dirección General del Medio Natural). .....	34
9. Figura 6: Comercio de aceite esencial de romero .....	38

## I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



La gran abundancia de flora espontánea aromática en el sureste Ibérico es clave en la comercialización de plantas silvestres, y motivo por el que la Región de Murcia es un enclave para numerosas empresas dedicadas a la transformación y comercialización de productos naturales, que son demandados por industrias farmacéuticas, cosméticas y agroalimentarias.

La riqueza en el romero (*Rosmarinus officinalis* L.) de componentes con demostrada actividad biosaludable, ha generado un enorme potencial de aplicaciones en amplios campos industriales, en los que la demanda social de productos de origen natural ha propiciado una mirada retrospectiva, recuperando valores y conocimientos de las propiedades medicinales y culinarias atribuidas desde antaño a estas plantas.

El cultivo de esta especie no se encuentra plenamente establecido todavía en nuestra región, y se sigue recolectando el material espontáneo de los montes, a diferencia de otras especies,

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

entre las que se incluyen el espliego (*Lavandula latifolia*), la salvia (*Salvia lavandulifolia*) o el tomillo rojo (*Thymus zygis*), que son tradicionalmente cultivadas en la comarca del Noroeste.

La razón de esta recolección de material espontáneo de romero es que la Dirección General del Medio Natural no tiene ningún problema en autorizar la recolección de este material silvestre, pues al ser su recolección mediante siega no se produce ningún efecto adverso sobre el terreno. Sin embargo, esto origina como efecto secundario que las producciones obtenidas sean de una enorme heterogeneidad, debido a la gran variabilidad intra-específica que presenta esta especie. Esta variabilidad se puede atribuir a numerosos factores, muchos de los cuales no han sido estudiados hasta el momento, que influyen así mismo en el rendimiento de la planta, en la riqueza final de los diferentes compuestos, y en sus propiedades biológicas.

Los factores de variabilidad se pueden atribuir a las condiciones edafo-climáticas donde se desarrollan las plantas (Del Baño, 2005; Tigrine-Kordjani *et al.*, 2007; Jamshidi *et al.*, 2009; Moghtader y Afzali, 2009; Tounekti *et al.*, 2011; Singh y Guleria, 2013; Zaouali *et al.*, 2013), y/o a variaciones genéticas de las poblaciones (Martin y Hernández-Bermejo, 2000; Zaouali *et al.*, 2012), de ahí la necesidad de realizar un estudio detallado que nos permita conocer que factores, abióticos o genéticos, afectan, y en qué medida lo podrían hacer sobre el rendimiento y la calidad de las producciones obtenidas.

Una solución a este problema sería la obtención de clones con características propias y determinadas, para destinarlos al establecimiento de cultivos comerciales. De esta manera se obviarían los problemas de heterogeneidad, ofreciendo así

producciones de calidad homogénea que estarían acorde a las exigencias de cada mercado.

Es por tanto el objetivo principal de esta Tesis, el seleccionar plantas individuales de romero, atendiendo a la composición química -tanto de sus aceites esenciales como de sus extractos polifenólicos- y a sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas, con la finalidad última de establecer cultivos comerciales.

Este objetivo general se puede desglosar en los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar químicamente el aceite esencial y el extracto polifenólico del romero, para buscar relaciones entre estas composiciones y las condiciones edafoclimáticas en las que se ha desarrollado la planta.
2. Estudiar la relación existente entre composición química y actividad biológica, considerando capacidad antioxidante y antimicrobiana, e identificar a los principales componentes responsables de la misma.
3. Determinar momento óptimo de recolección, considerando los diferentes estadios fenológicos de las plantas, para la obtención de máximos rendimientos y calidad en las producciones.
4. Promover el establecimiento del romeo como cultivo agrícola a partir de nuestra selección de plantas, para de esta forma, favorecer el desarrollo rural mejorando la economía de los sectores agrícolas, a la vez que se contribuye a la conservación del medio natural.

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

## II. INTRODUCCIÓN



## **1. Usos tradicionales del romero**

El hombre ha dependido de las plantas a lo largo de su historia para cuidar de su salud. Hoy en día resulta muy complicado encontrar referencias de los primeros usos de plantas medicinales en la Prehistoria. Es por tanto necesario basar las investigaciones en el hallazgo de restos vegetales fosilizados en yacimientos (De Rivera y Obón, 1991), como por ejemplo, las evidencias encontradas por Neandertales desde hace unos 60.000 años (Stockwell, 1988). Son numerosos los autores que recogen las tradiciones de recolectar y usar plantas en su beneficio propio (Thomson, 1978; Stockwell, 1988; Cowan, 1999; Muñoz, 2002; Rozman y Jersek, 2009).

La planta de romero también ha tenido un peso importante a lo largo de la historia de la humanidad debido a las propiedades mágicas o milagrosas que se le han atribuido en las diversas culturas (Villiera, 2002). Un ejemplo son los restos hallados en la primera dinastía faraónica, donde se solían colocar ramas de romero

sobre las tumbas con la intención de perfumar el viaje hacia el país de los muertos (De Rivera y Obón, 1995).

Por otro lado griegos y romanos consideraban al romero como una planta sagrada, y como prueba de ello el poeta romano Horacio compuso odas alabando sus poderes místicos. Tanto los habitantes de Grecia como de Roma creían que el romero simbolizaba el amor y la muerte, apareciendo desde entonces esta planta en bodas y funerales, como simbolo manifiesto de amor duradero y que ese vínculo jamás se rompería; así mismo los griegos tenían por costumbre el quemar ramitas de romero en sus templos (López y Costa, 1996; Brines *et al.*, 2007).

En la Edad Media se solía usar esta planta no solo con fines alimentarios o medicinales, también tenía aplicaciones como la fumigación contra los malos espíritus y la protección frente a plagas, (Lawless, 1998; Pamplona-Roger, 1999; Villiera, 2002; Carvalho, 2010).

Pero no fue hasta el año 1300, cuando Arnau de Villanova llevó a cabo una destilación de romero (Arango-Mejía, 2006), favoreciendo por tanto, la obtención de productos más elaborados.

Podemos por tanto destacar que son numerosas las propiedades que se le han atribuido al romero desde la antigüedad, como remedio o paliativo de los males que sufría la población en aquella época (Lawless, 1998; Font Quer, 1999; Pamplona-Roger, 1999; Carvalho, 2010).



## 2. El género *Rosmarinus*.

### 2.1. Taxonomía del género *Rosmarinus*.

El género *Rosmarinus* cuenta con tres especies en la península ibérica, que pueden diferenciarse morfológicamente atendiendo a la clasificación de Morales (2014), tal y como se expone en la Tabla 1.

**Tabla. 1.** Taxonomía del género *Rosmarinus*.

<p><b>1.</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Hojas de hasta 40 mm, en general de tamaño variable en la misma rama, agudas, glabras por el haz; cáliz glabro o con pelos ramificados aplicados; inflorescencias axilares.....<b><i>R. officinalis</i></b></li><li>• Hojas de hasta 20 mm, en general de tamaño homogéneo, de ápice redondeado, glabras o tomentosas por el haz; cáliz con pelos ramificados aplicados y pelos largos, tectores o glandulares; inflorescencias axilares y terminales.....<b>2.</b></li></ul> <p><b>2.</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Hojas siempre glabras por el haz; núculas de hasta 2,9 mm. ....<b><i>R. eriocalyx</i></b></li><li>• Hojas pelosas por el haz; núculas de hasta 3,1 mm .....<b><i>R. tomentosus</i></b></li></ul>
--

Aunque se han identificado estas tres especies dentro del género *Rosmarinus*, también podemos encontrar híbridos en la naturaleza, siendo los actualmente conocidos, según Morales, (2014):

- *R. eriocalix* x *R. officinalis*.
- *R. officinalis* x *R. tomentosus*.

## 2.2. Caracterización y morfología de *R. officinalis* L.

La planta de *Rosmarinus officinalis* L. fue identificada por Linneo en 1753 (Sánchez-Monge, 1980). Tradicionalmente se ha creído que el nombre de “*Rosmarinus*” derivaba de la unión de los vocablos latinos “*ros*” (rocío) y “*marinus*” (mar), que significarían “rocío del mar”. Aunque actualmente los etimologistas piensan que su verdadero origen proviene de la unión de los vocablos griegos, “*rhos*”, arbusto y “*myrinos*”, aromático, los cuales concuerdan perfectamente con las características de la planta (Morales, 2014). Por otro lado el origen del nombre específico, “*officinalis*”, pone de manifiesto su aplicación como planta medicinal (Font Quer, 1999; Stuart, 1981).

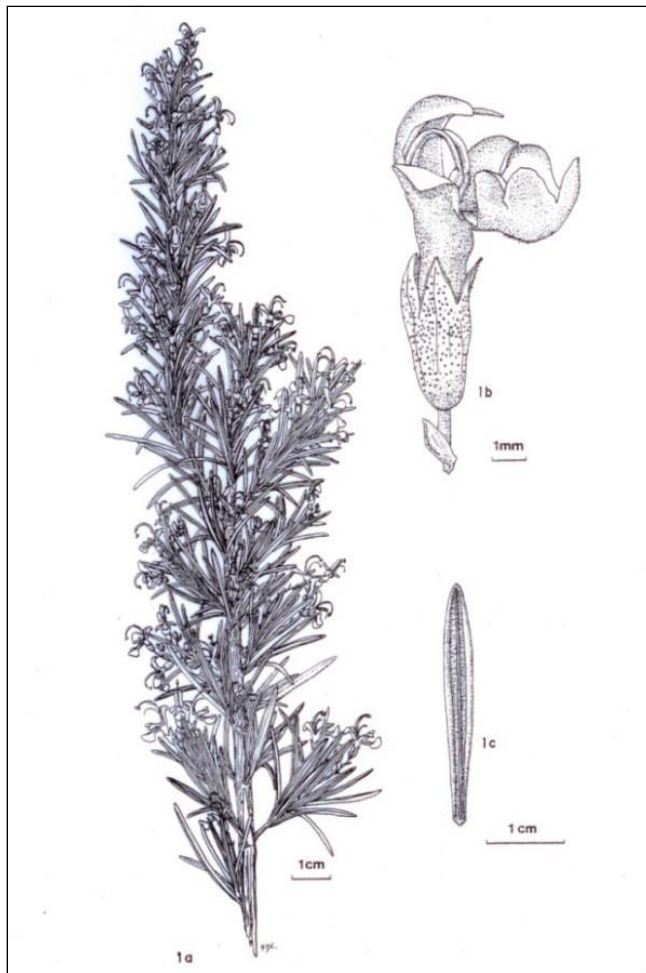
Dentro del género *Rosmarinus* la especie *Rosmarinus officinalis* L. es un arbusto de hasta dos metros de altura, generalmente erguido, aunque en ocasiones achaparrado y cuya vida media oscila entre 5 y 15 años. Su floración puede variar, pues mientras que algunos autores afirman que las flores pueden estar presentes en la planta durante todo el año (Muñoz, 2002), otros declaran que no hay floración durante los meses más calurosos del año (De Rivera y Obón, 1991). Los tallos de este arbusto son erectos o procumbentes, pelosos y poseen numerosas glándulas esferoidales.

En cuanto a las hojas, son simples y de un tamaño menor o igual a 4-6 mm, pudiendo encontrarse diferencias de tamaño dentro de la misma rama, el borde de las hojas se caracteriza por ser agudo y entero, oscilando entre lineal y lanceolado, con márgenes revolutos, sentados y algo afilados. En cuanto a la superficie foliar, el haz de las hojas es glabro mientras que su envés es con frecuencia lanoso, sobre todo en las jóvenes (Morales, 2014; Sánchez *et al.*, 2011; De Rivera, 1994).

Así mismo la inflorescencia (como podemos apreciar en las Figuras 1 y 2) es laxa y se encuentra situada en verticilastros axilares cortos con ejes lanosos y esta formada por grupos de 5-15 flores con brácteas elípticas pequeñas comprendidas entre 2,5-3,5mm. Esta inflorescencia consta de cinco pedicelos florales de una longitud de 1,5-3 mm. Según lo descrito en la bibliografía, el cáliz es verde oscuro glabro o con pelos ramificados y corola bilabiada, pudiendo oscilar el color de la corola desde el morado hasta el blanco-azulado.



**Figura.1.** Planta de romero en floración.



**Figura.2.** Detalle de tallo, flor y hoja de *R. officinalis*. (Dibujo tomado de Alcaraz, et al. 1989).

La flor de romero se compone de:

- Dos estambres recurvados, cuyas anteras están formadas por una teca curvada.
- Un gineceo bicarpelar, cuyo ovario tetralobular contiene formación de un falso septo en la pared del carpelo.
- Un estilo cuyas dimensiones oscilan de 10 a 20 mm.

Las núculas que producen las inflorescencias del romero son ovoides, aplanadas y de color castaño, las dimensiones de estas núculas están comprendidas entre 2,2-3 mm x 1,8-2 mm (De Rivera, 1994; Sánchez et al., 2011; Morales, 2014).

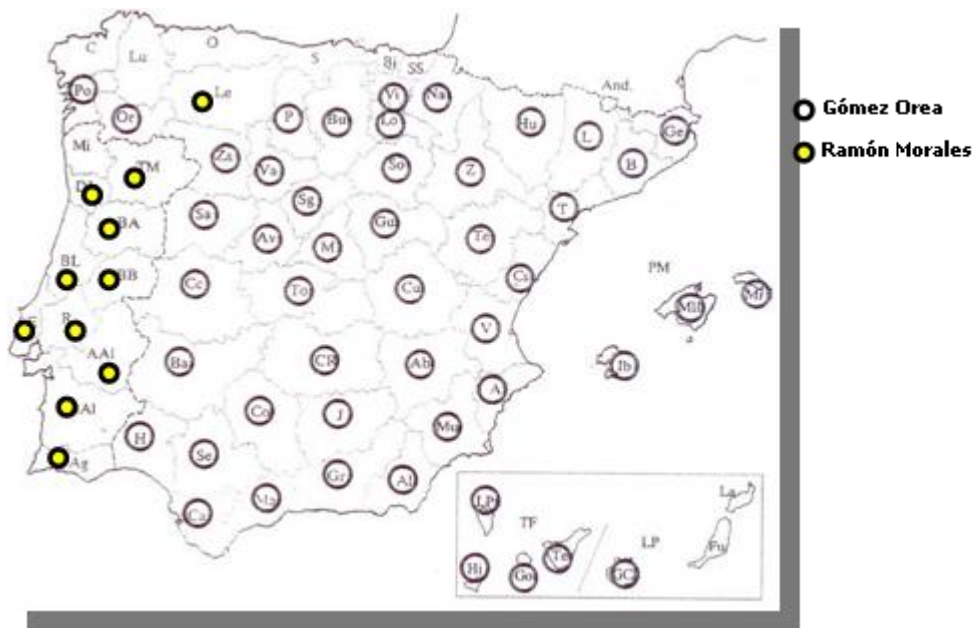
### **2.3. Distribución de *Rosmarinus officinalis* L.**

Las plantas de romero se encuentran de forma espontánea en la región mediterránea y el Cáucaso.

En la Figura 3 se muestra la distribución de romero en la península ibérica. Se ha elaborado en base a la información recogida de Gómez Orea (1999) Morales (2014) y en ella se destaca la presencia de romero en:

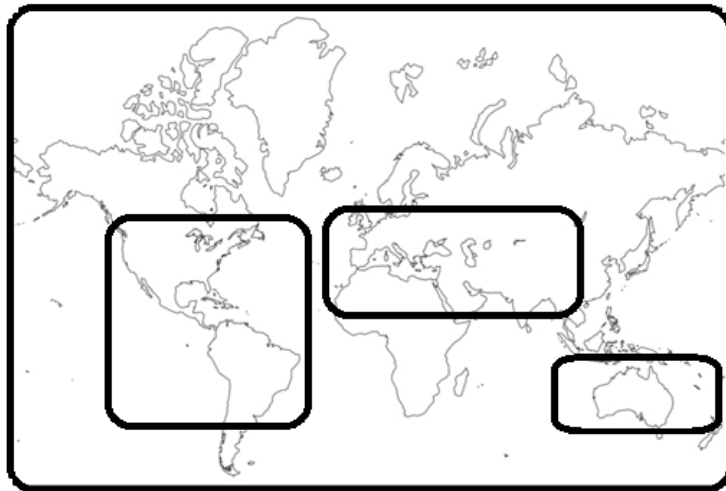
- España: en gran parte de Andalucía, Almería, Murcia, Extremadura, Comunidad Valenciana, Aragón, Navarra, Cataluña (hasta llegar a los pirineos), así como en Baleares,
- Portugal en su totalidad (con la excepción de algunas provincias del norte).

No obstante, en general, es difícil encontrarla en las zonas del norte y noroeste de la península (Font Quer, 1999; De Rivera, 1994, Morales, 2014).



**Figura 3.** Distribución del romero en la península ibérica.

En la Figura 4 se muestra la distribución del romero a nivel mundial, siendo posible encontrarlo como planta silvestre o como cultivo. Como planta silvestre, se puede encontrar en el sur de Europa, norte de África, suroeste de Asia, así como en Latinoamérica. La introducción del romero en Latinoamérica (Méjico, Guatemala y otros países) se debe a los viajes realizados por los españoles en la época colonial, donde la utilizaban para fines medicinales en sustitución de los remedios aztecas (Ortiz de Montellano, 1990).



**Figura. 4.** Distribución global de las plantas de *R. officinalis*.

Como cultivo destaca en países como Rusia, Inglaterra, Francia, Portugal, Balcanes, Túnez, China, Australia y Estados Unidos (en concreto en California) (Del Baño, 2005; Morales, 2014).

En lo referente a sus requisitos de hábitat se suele localizar en suelos calcáreos, formando parte de los matorrales que se desarrollan en áreas secas y soleadas, principalmente en etapas de degradación del encinar (López González, 2001), aunque también se puede presentar en suelos silíceos con pH ligeramente ácido (Correal y Sotomayor, 2001). Sus necesidades anuales de precipitación oscilan entre los 200-600 mm<sup>3</sup>, presentando un crecimiento óptimo a partir de los 350 mm<sup>3</sup>.

La altitud en la que crece el romero es muy variada, pudiendo encontrar plantas desde 0-1500 m sobre el nivel del mar, aunque la mayor altitud donde se encontraron plantas de romero en la Región de Murcia ha sido a 1400 m, en la ladera del pico de Revolcadores.

No obstante, las plantas de romero son capaces de desarrollarse en condiciones diferentes a las indicadas como su

hábitat ideal, y es por eso que algunos autores citan que el estrés medioambiental al que estarían afectadas en esos ambientes, se vería reflejado en una posterior alteración tanto de su rendimiento en extractos, como de su composición química final. Así, factores a tener en cuenta, como son el pH del suelo (D'Andrea, 1998; Del Baño, 2005) la temperatura y precipitaciones a las que se ven sometidas las plantas (Del Baño, 2005) el área geográfica donde crece/se desarrolla (Faleiro *et al.*, 2002; Tigrine-Kordjani *et al.*, 2007; Moreno *et al.*, 2006; Brewer, 2011) la fase de desarrollo vegetativo cuando se procede a realizar la siega (Consentino *et al.*, 1999; Celiktas *et al.*, 2007; Zaouali *et al.*, 2013; Singh y Guleria, 2013), el estrés abiótico que las plantas puedan sufrir durante su desarrollo (Tounekti *et al.*, 2011) y la herencia genética propia de las poblaciones vegetales (Martin y Hernández-Bermejo, 2000; Zaouali *et al.*, 2012), pueden ser determinantes a la hora de originar los distintos quimiotipos que se podemos encontrar en la naturaleza.

Estos factores se traducen en una variabilidad de la composición química del extracto y aceite de romero la cual debería ser considerada como una ventaja que la naturaleza crea, para la supervivencia y adaptación de la especie a nuevos entornos.

### **3. Taxonomía química.**

#### **3.1. Composición química del aceite esencial.**

En la realización de este trabajo -memoria y publicaciones- se ha empleado la terminología establecida por García Martín y García Vallejo (Sotomayor, 1998) referente a la clasificación de los constituyentes de los aceites esenciales en función a sus concentraciones.



Para la taxonomía química de los aceites esenciales de las plantas aromático-medicinales, se contemplan dos clases de componentes:

- No significativos taxonómicamente: apenas varían en concentración de unos quimiotipos a otros; son generales para casi todas las especies, y comúnmente se encuentran de forma minoritaria, aunque, a veces, algunos como  $\alpha$ -pineno, *p*-cimeno y limoneno en *Thymus baeticus* alcanzan categoría de mayoritarios.
- Componentes taxonómicos: entre los que están los principios activos, mayoritarios, que forman familias de terpenoides afines, relacionados genéticamente entre sí. De ellos, uno o varios son precursores de los demás.

Se consideran, por tanto, cuatro clases de componentes presentes en los aceites esenciales, siendo los componentes mayores los que se encuentran en una proporción entre el 8-99%, los componentes menores los que se encuentran entre un 5-8%, los microcomponentes los que se encuentran entre un 0,1-5% y para finalizar los componentes traza los que se encuentran en concentraciones entre 0,0001-0,1% de abundancia en la totalidad del aceite estudiado.

En esta tesis se han considerado los componentes mayores y menores, siendo la combinación de uno, dos o tres componentes de mayor abundancia en las muestras de aceite esencial, los determinantes de los diferentes quimiotipos de nuestras plantas, y habiéndose omitido el estudio de los microcomponentes y componentes trazas.

La composición química del aceite de romero ha sido ampliamente estudiada, habiéndose detectado la presencia de diferentes quimiotipos, que podrían ser un reflejo de los factores que están íntimamente relacionados con el desarrollo de la planta como ya hemos mencionado con anterioridad siendo los casos concretos detectados atribuidos a factores edafo-climáticos (Soria *et al.*, 2008; Brenes y Roura, 2010), las condiciones medioambientales y del suelo (Tigrine-Kordjani *et al.*, 2007; Jamshidi *et al.*, 2009; Moghtader y Afzali, 2009), la fecha en la que se procede a la siega o recolección del material vegetal (Celiktas *et al.*, 2007), la fase de desarrollo fenológico en la que se encuentra la planta (Ruberto y Baratta, 2000; Zaouali *et al.*, 2013; Singh y Guleria, 2013), características de la herencia genética del ejemplar (Martin y Hernandez-Bermejo, 2000; Zaouali *et al.*, 2012), estrés abiótico sufrido por la planta (Tounekti *et al.*, 2011), y el método de extracción llevado a cabo para la obtención de la muestra de aceite esencial (López *et al.*, 2005; Ramírez *et al.*, 2006; Okoh *et al.*, 2010).

Las distintas combinaciones de estos factores darían como resultado variaciones en las relación entre los componentes mayoritarios que definen el quimiotipo del aceite de romero, como indica Napoli *et al.*, (2010), quienes clasifican las plantas estudiadas en tres tipos de quimiotipos, *Cineol*, donde hay un elevado contenido en 1,8 cineol en el aceite, *Alcanfor*, donde el contenido en alcanfor supera el 20% del contenido total de aceite y *Verbenona*, en cuyo caso, el contenido total de verbenona es superior al 15% del aceite total.

Según el trabajo realizado por Salido *et al.*, (2003), en plantas procedentes del sur de España, el quimiotipo que detectaron fue  $\alpha$  pineno–eucaliptol–alcanfor, mientras que en el trabajo realizado por

Varela *et al.*, (2009), donde se estudiaron poblaciones de romero de toda España, obtuvieron diferentes perfiles químicos en función de área de procedencia de la planta estudiada, tal y como se muestran en la Figura 5., siendo en el nordeste de España los componentes mayoritarios identificados en el perfil volátil “A” correspondiente a “alcanfor-eucaliptol- $\alpha$  pineno”, en la costa Mediterránea el perfil volátil “B” correspondiente a “eucaliptol- $\alpha$  pineno-alcanfor”, en el interior el perfil volátil “C” correspondiente a “alcanfor- eucaliptol- $\alpha$  pineno” y en el sur el perfil volátil “D” correspondiente a “eucaliptol-alcanfor- $\alpha$  pineno”.



**Figura 5.** Distribución de quimiotipos de romero en la península ibérica y Baleares (Varela *et al.*, 2009). (Imagen cedida por Sotomayor Martínez, 2011)

Por otro lado, otros autores han estudiado poblaciones de plantas de romero en diferentes estados fenológicos intentando aclarar la posible existencia de una relación entre los resultados de sus componentes mayoritarios en aceite y el estado fenológico. En el caso del estudio llevado a cabo por Salido *et al.*, (2003), donde identifican el aceite de 12 plantas de romero procedentes del sur de España y en el cual todas las muestras de las plantas estudiadas corresponden independientemente de su estado fenológico al quimiotipo  $\alpha$ -pineno-1,8-cineol-alcanfor. Posteriormente Zaouali *et al.*, (2013), estudiaron la composición química del aceite de diferentes órganos de plantas de romero en diferentes estados fenológicos, y ésta se mantenía constante con la única excepción de borneol y algunos componentes minoritarios, al igual que Singh y Guleria (2013), quienes no pudieron relacionar el estado fenológico de las plantas de romero con un perfil químico de su aceite diferenciado, siendo la única diferencia encontrada la presencia de un mayor rendimiento de aceite durante la fructificación.

En el trabajo llevado a cabo por Sotomayor Martínez (2011), se pone de manifiesto ciertas diferencias en la composición química -aunque el quimiotipo de la planta no varía “alcanfor-1,8 cineol-  $\alpha$  pineno”- del aceite según el estado fenológico en el que se hace la siega, haciendo realizado el estudio con dos poblaciones de clones para evitar en medida de lo posible la variación genética propia de esta especie.

### **3.1.1. Actividad biológica.**

Son numerosas las propiedades atribuidas al aceite esencial de romero y es por ello que se considera la planta aromática y medicinal más empleada (Rozman y Jersek, 2009). Muchas de esas

actividades biológicas detectadas en romero se han correlacionado con la presencia de componentes mayoritarios en sus aceites esenciales, aunque no se descarta que puedan ejercer un papel importante en la misma los componentes minoritarios (Wu *et al.*, 2011).

Cada vez es más frecuente el estudio de tratamientos alternativos para la obtención de principios activos con actividad biológica, sin tener que recurrir al uso de antibióticos o conservantes sintéticos, por sus posibles efectos adversos como la generación de resistencias bacterianas, sobre este campo ha destacado el romero debido a sus múltiples propiedades antimicrobianas como se verá a continuación.

En esta línea, aunque hace unos años no se prestaba atención al uso de antibióticos -a dosis subclínicas- en piensos de animales con finalidad de mejorar la salud de estos y favorecer su engorde, tras la entrada en vigor de la Directiva 96/23/CE y posteriormente el Real Decreto 1749/1998, han empezado a considerarse los efectos adversos que estos antibioticos ejercen sobre la población humana, siendo tendencia el controlar, cada vez con mayor detalle, los aditivos alimentarios que se encuentran de forma normal en los piensos de animales con fines de alimentación humana, donde se establece un procedimiento comunitario de fijación de límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal.

Entre las actividades biológicas más importantes atribuidas al aceite esencial de romero destacamos, propiedades antibacterianas (Castano *et al.*, 2010; Ntzimani *et al.*, 2010; Okoh *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2011; Ivanovic *et al.*, 2012) antifúngicas (Soylu *et al.*, 2010), insecticida (Zoubiri y Baaliouamer, 2011) anticancerígenas

(Horváthová *et al.*, 2010; Slaménová *et al.*, 2011) mejora de la capacidad cognitiva (El Omri *et al.*, 2010; Linck *et al.*, 2010) como conservante alimentario (Castano *et al.*, 2010; Ivanovic *et al.*, 2012) y como antioxidante (Zaouali *et al.*, 2010; Özcan y Arslan., 2011; Slaménová *et al.*, 2011).

Aunque según algunos autores la actividad antioxidante y antimicrobiana procede de una actividad sinérgica entre los componentes del aceite esencial (Wu *et al.*, 2011), otros afirman que elevadas concentraciones de los componentes principales purificados son más activos que la mezcla de componentes presentes en el aceite (Bernardes *et al.*, 2010 (a); Klančnik *et al.*, 2010).

Así mismo, Zaouali *et al.*, (2010) describieron la existencia de variaciones en la actividad antibacteriana de romero procedentes de Túnez (*R. officinalis* var. *typicus* y var. *trogodytorum*) que dependen de la variación cuantitativa de los componentes del aceite esencial, es por ello que algunos autores han correlacionado determinados quimiotipos de aceite y su baja actividad antimicrobiana frente a microorganismos causantes de caries u otros agentes que degradan los alimentos siendo 1,8 cineol-alcanfor- $\alpha$  pineno (Tavassoli *et al.*, 2011) y alcanfor- verbenona-  $\alpha$  pineno (Bernardes *et al.*, 2010(a)).

Los factores principalmente influyentes asociados a esta variación en la actividad se atribuyen principalmente al lugar de origen (Jamshidi *et al.*, 2009), fecha de la siega (Celiktas *et al.*, 2007), estado fenológico de la planta (Singh y Guleria, 2013) método de extracción (Okoh *et al.*, 2010; Ivanovic *et al.*, 2012; Rodríguez-Rojo *et al.*, 2012; Visentin *et al.*, 2012) y la fase de desarrollo de la planta (Zaouali *et al.*, 2013).

### 3.2. Extracto polifenólico de romero.

Tras la destilación de las plantas de romero para la obtención de su aceite esencial, se obtiene un subproducto con un contenido polifenólico aproximadamente unas 10 veces menor que el que tenían las hojas de romero (Almela *et al.*, 2006), aunque este subproducto aún posee una considerable actividad antioxidante (Romano *et al.*, 2009; Klancnik *et al.*, 2010; Bubonja Sonje *et al.*, 2011; Navarrete *et al.*, 2011; Rodríguez Rojo *et al.*, 2012).

Son numerosos los autores que han estudiado la composición química de los extractos metanólicos de romero (Aruoma *et al.*, 1992; Erkan *et al.*, 2008; Romano *et al.*, 2009; Bernardes *et al.*, 2010(a); Rodríguez Rojo *et al.*, 2012), aunque hay discrepancias acerca de los componentes mayoritarios presentes en el mismo, por un lado algunos autores defienden que los componentes principales son únicamente ácido carnósico y carnosol, al igual que Aruoma *et al.*, (1992), quienes afirman que aproximadamente el 5% del peso seco de las hojas de romero se corresponde a carnosol y ácido carnósico.

Por el contrario, Erkan *et al.*, (2008), afirman que los componentes mayoritarios en el extracto de romero procedente de plantas de Turquía, son el ácido carnósico y rosmarínico en unos porcentajes del 5% y el 8% respectivamente, estos datos coinciden con los publicados por Rodríguez Rojo *et al.*, (2012), quienes estudian plantas procedentes de España e identificaron estos mismos componentes como los principales constituyentes del extracto metanólico.

Otros autores defienden que tanto carnosol como los ácidos carnósico y rosmarínico forman parte de los principales componentes del extracto metanólico de romero, en este sentido el

trabajo llevado a cabo por Romano *et al.*, (2009), tras proceder al estudio de la mezcla de plantas de romero procedentes de Argentina, obtuvieron los siguientes porcentajes en sus componentes principales 30% de ácido carnósico, 16% de carnosol y 5 % de ácido rosmarínico. Así mismo, Bernardes *et al.*, (2010) (b), encuentran en muestras de romero procedentes de Brasil ácido rosmarínico y sus derivados (ácido carnósico, carnosol junto a menores cantidades de ácido ursólico y oleanólico). Por otro lado, autores como Bernardes *et al.*, (2010 (b)) y Tai *et al.*, (2012), destacan una elevada presencia de hesperidina en los extractos de romero.

En la bibliografía podemos encontrar autores que se centran directamente en la concentración de polifenoles y flavonoides totales contenidos en las muestras de romero (Mi Yoo *et al.*, 2008). También es importante señalar que para algunos autores, como Borrás Linares *et al.*, (2011), el método de extracción del compuesto polifenólico de romero influye en los compuestos polifenólicos obtenidos de dichas muestras.

No obstante, la composición química del extracto es variable como ya hemos mencionado atendiendo a los factores medioambientales que influyen en el desarrollo de la planta (Consentino *et al.*, 1999; Celiktas *et al.*, 2007; Tounekti *et al.*, 2011; Singh y Guleria, 2013; Zaouali *et al.*, 2013), habiéndose relacionado la presencia de un incremento significativo en la concentración tanto de ácido caféico y ácido carnósico durante los meses más fríos y un descenso del mismo en los meses más calurosos, mientras que el resto de metabolitos secundarios como pueden ser el ácido rosmarínico, la naringina, cirsimaritina, hespidulina y el carnosol muestran diferentes tipos de respuestas a este estrés ambiental (Luis *et al.*, 2007). Así mismo Luis y Johnson, (2005), detectaron que



las concentraciones de ácido carnósico descendieron en un 50% en los meses de verano, siendo durante el mes más frío (diciembre), la época en la que se observaron los niveles más elevados para este componente. Según otros autores (Munné-Bosch, 1999) este fenómeno tendría su explicación en el hecho de que el ácido carnósico se degrada en cascada hacia carnosol, rosmanol e isorosmanol, compuestos que la planta va a utilizar durante los meses más calurosos para proteger sus clorofilas del daño oxidativo.

### 3.2.1. Actividad biológica

La relación entre la actividad antimicrobiana y la composición química del extracto de romero es objeto de estudio de gran interés en la comunidad científica (Klancnik *et al.*, 2009; Katalinic *et al.*, 2010). Debido a que la concentración de los compuestos polifenólicos es inferior por el efecto de la destilación (Almela *et al.*, 2006), la eficacia de los extractos de romero sobre patógenos de alimentos esta aún en controversia, así, mientras que algunos investigadores opinan que el extracto de romero posee una baja actividad frente bacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* o *Moraxella cattarhalis* (Celiktas *et al.*, 2007; Rasheed y Thajuddin, 2011), otros indican que esa baja actividad se puede potenciar con el uso de diferentes compuestos, otros extractos u otros antioxidantes de origen sintético (Romano *et al.*, 2009; Weerakkody *et al.*, 2010).

Por otro lado, un tercer grupo de autores han identificado los componentes responsables de su destacable actividad antimicrobiana, atribuyéndolo a una elevada concentración en uno o varios compuestos, como es el caso del ácido carnósico que estaría directamente relacionada con una alta actividad antimicrobiana,

mientras que para otro grupo de autores, la actividad antimicrobiana se debería a la presencia de ácido carnósico, ácido rosmarínico y carnosol como componentes mayoritarios de sus extractos metanólicos (Klancnik *et al.*, 2009; Bernardes *et al.*, 2010(b); Katalinic *et al.*, 2010; Peshev *et al.*, 2011; Vegara *et al.*, 2011).

Así mismo, hay estudios *in vitro* donde se demuestra que el ácido carnósico podría ser el componente antioxidante más activo, con una actividad tres veces superior al carnosol y siete veces superior que otros componentes sintéticos como son el butylated hydroxytoluene y butylated hydroxyanisole (Cuvelier *et al.*, 1996). Mientras que otros estudios *in vitro* indicarían que el compuesto más importante para la actividad antioxidante sería la presencia de ácido rosmarínico seguido por el resto de diterpenos fenólicos (Thorsen *et al.*, 2003).

También Pérez-Fons *et al.*, (2010), han publicado que el ácido rosmarínico, ácido carnósico, carnosol, rosmadial y genkwanina serían los responsables de la actividad antioxidante de los extractos de hojas de romero, aunque no todos estos compuestos actuarían siguiendo los mismos mecanismos de acción. Sin embargo, otro equipo afirma que la mayor actividad biológica se alcanza al estudiar el extracto total, ya que parece ser que hay un cierto sinergismo entre los diferentes componentes que forman estos extractos (Erkan *et al.*, 2008).

Una de las posibles aplicaciones a estos extractos de romero, es usarlos como tratamiento antimicrobiano frente a la proliferación de flora bacteriana en alimentos para prevenir lo que puede llegar a ser un grave problema tanto de salud pública, como a nivel económico, y es aquí donde se han centrado muchas de las investigaciones en relación al romero, demostrándose que el

extracto al igual que el aceite esencial, posee tanto actividad bactericida y bacteriostática como medida preventiva frente al deterioro de los alimentos (Moreno *et al.*, 2006).

Esta propiedad de conservante alimentario se le atribuye a la riqueza polifenólica del extracto y a las propiedades antioxidantes del mismo (Bubonja-Sonje *et al.*, 2011; Tornuk *et al.*, 2011; Vegara *et al.*, 2011; Álvarez *et al.*, 2012). Este hecho favorece la reducción de los aditivos químicos sintéticos que serían necesarios para reducir la oxidación y proliferación de patógenos alimentarios, convirtiendo así al romero en un condimento de gran valor para los mismos (Castano *et al.*, 2010; Bañón y Méndez, 2012).

En los trabajos llevados a cabo por, Bernardes *et al.*, (2010) (b); Weerakkody *et al.*, (2010); Klančnik *et al.*, (2010); Tornuk *et al.*, (2011); Vegara *et al.*, (2011) se describen el MIC y MBC de los extractos de romero comerciales contra bacterias gram-positivas y gram-negativas. Para estos autores, la actividad antimicrobiana y antioxidante dependía de la naturaleza y concentración química de los compuestos fenólicos en los extractos, siendo las bacterias Gram positivas las que destacaron por ser más sensibles que las Gram negativas, especialmente frente a la acción de estratos solubles de donde el componente mayoritario fuera el ácido carnósico; estas conclusiones coinciden con las obtenidas por Romano *et al.*, (2009) y Castano *et al.*, (2010), quienes estudiaron la actividad de estos extractos metanólicos de romero frente a *Shigella sonnei*, *Salmonella Typhimurium* y *Listeria monocytogenes*.

Esta acción antimicrobiana, se cree que se debe a la eficacia de los extractos como inhibidores del crecimiento microbiano (Castano *et al.*, 2010; Klančnik *et al.*, 2010; Raiciu *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2011; Okoh *et al.*, 2010; Mathenjwa *et al.*, 2012). También se

ha detectado la existencia de un sinergismo entre el extracto de romero y antibióticos que potencian su actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* (Jarrar *et al.*, 2010), una posible explicación al hecho de que estos extractos sean más eficaces sobre Gran positivas que Gran negativas podría ser debido a la existencia de mecanismos adaptativos a situaciones de estrés presentes en bacterias Gran negativas que no tienen las Gran positivas (Klancnik *et al.*, 2009).

Por otro lado, a nivel antioxidante, el estudio comparativo entre la actividad antioxidante y la composición química del extracto de Romero ha sido abordado por distintos investigadores. Algunos de ellos afirman que una mayor proporción de carnosol y ácido carnósico favorece la actividad antioxidante de esos extractos (Rizlner Hras *et al.*, 2000; Lo *et al.*, 2002; Hernández-Hernández *et al.*, 2009; Terpin *et al.*, 2009; Romano *et al.*, 2009; Bernardes *et al.*, 2010(b); Bubonja-Sonje *et al.*, 2011), siendo en los trabajos publicados por Bañón y Méndez, (2012) y Aruoma *et al.*, (1992), donde estos autores le atribuyen a estos compuestos más del 90% de la actividad antioxidante.

Aunque otros artículos, afirman que el ácido rosmarínico seguido por ácido carnósico y carnosol son los principales componentes responsables de la actividad antioxidante de los extractos de romero (Peshev *et al.*, 2011). Erkan *et al.*, (2008), propuso a esos dos ácidos como los constituyentes mayoritarios en extractos de romero y como una posible relación sinérgica entre ellos con otros componentes minoritarios.

No obstante también se ha encontrado actividad antioxidante asociada a otros compuestos de menor abundancia en el extracto de romero como es la hesperidina, a la cual se le pueden atribuir

propiedades antioxidantes (Okamura *et al.*, 1994; González y Nazareno, 2011); y estas propiedades antioxidantes tienen efectos fisiológicos actuando como un remedio eficaz frente a la depresión (Souza *et al.*, 2012) y actividad anticancerígena (Pradeep *et al.*, 2008; Hosseinimehr *et al.*, 2009; Ming-Hsien *et al.*, 2009). Así mismo una situación similar se han detectado con la apigenina donde se han mostrado actividades biológicas como agente antioxidante y preventiva de cáncer (Prince *et al.*, 2004; Shukla y Gupta, 2010; Al Shaal *et al.*, 2011).

Como podemos ver no está claro el papel de los diferentes compuestos polifenólicos del extracto de romero sobre la actividad biológica, tanto a nivel antimicrobiano como antioxidante, a la vez que hay que tener en cuenta que las condiciones donde la planta se desarrolla pueden tener un papel decisivo en su composición química y por tanto sobre la actividad que el extracto va a presentar. Es por ello que algunos autores afirman que podría existir una reorganización de los fenoles (carnosol, ácido rosmarínico, y ácido carnósico) que podría cambiar de acuerdo a la estación, encontrando los mayores niveles durante el botón floral y floración plena (Celiktas *et al.*, 2007; Hamrouni Sellami *et al.*, 2009).

También se han realizado trabajos en los que se estudia la capacidad que estos compuestos tienen de pasar a través de la madre durante la gestación y lactancia a sus crías en ganado caprino y ovino, como un medio a través del cual inducir propiedades antioxidantes y conservantes para el futuro consumo (Jordán *et al.*, 2010; Moñino, 2010).

#### 4. Interés económico

En general se puede apreciar un renovado interés por las plantas aromático-medicinales debido a que el consumidor demanda cada vez más productos de mayor calidad y ausentes de agentes contaminantes.

Pero este incremento en la demanda aún no está correlacionado con sistemas de plantación y explotación apropiados, puesto que todavía la casi totalidad de la producción se realiza mediante la recolección de material espontáneo, lo que en algunas zonas del sureste ibérico puede originar una sobreexplotación de los hábitats naturales, lo que unido a la alta heterogeneidad de las producciones, como consecuencia de la enorme diversidad genética, hace que cada vez sea más necesario plantearse el desarrollo de áreas de explotación controlada de esta planta para poder abastecer esta demanda en continuo desarrollo por parte de la sociedad (Lange, 1998).

A continuación se muestra una lista detallada de las localidades pertenecientes a la región de Murcia, en las cuales se han solicitado permisos a la Consejería de Medio Ambiente para la recolección de *R. officinalis* L en los últimos años, tanto en fincas privadas (Tabla 2) como en monte público (Tabla 3). Con respecto a las fincas privadas, solo hay constancia de las solicitudes a partir del 2011, ya que en años previos, se trataban de autorizaciones puntuales para la recogida de plantas aromáticas en las que se indicaba el término municipal al que pertenecía y se excluían las zonas de protección como Espacios Naturales Protegidos, LICs, ZEPAs y montes públicos.

**Tabla. 2.** Autorizaciones para la recolección de romero (fincas privadas, por localidades). (Fuente: Dirección General del Medio Natural).

<i>Área/Año</i>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>
<b>Águilas</b>		X	X
<b>Alhama de Murcia</b>		X	X
<b>Bullas</b>		X	X
<b>Calasparra</b>		X	X
<b>Caravaca</b>		X	X
<b>Cartagena</b>	X		
<b>Cehegín</b>		X	X
<b>Cieza</b>		X	X
<b>Fuente Álamo</b>		X	X
<b>La Unión</b>	X		
<b>Las Torres de Cotillas</b>		X	X
<b>Lorca</b>	X	X	X
<b>Mazarrón</b>		X	X
<b>Moratalla</b>			X
<b>Mula</b>		X	X
<b>Murcia</b>	X	X	X
<b>Pliego</b>			X
<b>Puerto Lumbreras</b>	X	X	X
<b>Santomera</b>		X	X

**Tabla. 3.** Área y cantidades recolectadas anualmente en monte:

(Fuente: Dirección General del Medio Natural).

Año/ Área	Alhama de Murcia	Calasp-arra	Caravaca de la Cruz	Cieza	Lorca	Moratalla	Mula	Murcia	Pliego	Total por año(t):
1999		25	87,5		10	45	600			227,5
2000		25	37,5			62,5			10	135
2001	25	27,5	28		10	62,5				153
2002		27,5	75	10,5	10	62,5				185,5
2003	25	52,5	37,5		10	62,5				187,5
2004		52,5			24,8	54,5				131,8
2005	25	53,5								78,5
2006		77,5				2,5				80
2007		105			10					115
2008		52,5								52,5
2009		32,5								32,5
2010		32,5			10					42,5
2011		32,5				25		10		67,5
2012		45						10		55
2013		55								55
<b>Suma por área (t):</b>	<b>75</b>	<b>696</b>	<b>265,5</b>	<b>10,5</b>	<b>84,8</b>	<b>377</b>	<b>60</b>	<b>20</b>	<b>10</b>	

#### 4.1. Mercado internacional.

Atendiendo al informe emitido por WWF España (ADENA) en 1996, se estima que la flora medicinal y aromática en España, ronda las 350 especies, entre las que únicamente 60 se destinan al consumo, referido tanto a plantas individuales como a la combinación de diferentes mezclas.



Ya en la década de los 80 el valor de las medicinas obtenidas de plantas por los países miembros de la OCDE (34 países entre los que se encuentra España), ascendía a 43 000 millones de dólares anuales, siendo 1 500 millones los correspondientes a la producción de España (Palacio, 2000).

Es importante remarcar que la explotación agrícola a pequeña y gran escala de plantas aromáticas y medicinales, proporciona grandes beneficios tanto medioambientales como económicos y sociales, a lo que se le añaden las aplicaciones en el campo de las industrias alimentarias, farmacéutica y perfumes-cosmética (Palacio, 2000). Este mercado internacional de las plantas aromáticas ha experimentado grandes cambios, de tal manera que actualmente son los propios productores, quienes de forma directa se encargan de vender y exportar sus productos (Palacio, 2000).

Así mismo, es en las industrias farmacéutica y alimentaria donde se ejerce una mayor demanda de los productos derivados de plantas aromáticas. Siendo la demanda en la industria farmacéutica del 35% de la producción mundial y destacando especialmente el sector de la perfumería, que se abastece del 30% de la producción mundial de plantas de esencias.

Por otro lado en la industria alimentaria se emplea el 40% de la producción mundial, donde destacan el uso que dan a estas plantas aromáticas tanto la industria cárnica, para la elaboración de salazones, charcutería y conservas, como la láctea, principalmente para la elaboración de quesos (Palacio, 2000).

El principal mercado de estas plantas se encuentra en la Unión Europea siendo los países mediterráneos los principales productores de esta planta (Marruecos, España, Túnez y los que

conformaban la extinta ex–Yugoslavia), en donde crece salvaje (Palacio, 2000; Muñoz, 2002; Del Baño, 2005). Fuera de Europa es producida mayoritariamente por E.E.U.U (Del Baño, 2005).

Así mismo, dentro de los principales países europeos consumidores de los derivados de romero se destacan Alemania y Francia, debiéndose este incremento en el consumo general a la creciente preocupación por la salud y al reconocimiento de las numerosas propiedades beneficiosas que poseen estas plantas por parte de Estados Unidos. Es por tanto cada vez más usada en la industria alimentaria tanto con fines condimentarios, como especiante, o como potenciante del sabor.

Otra de las ventajas de estas plantas es la posibilidad de usarlas con fines de plaguicidas, sin necesidad de recurrir a los de origen sintético, evitando así el acúmulo de sustancias tóxicas o residuales (Palacio, 2000).

Desafortunadamente, no ha sido posible encontrar datos referentes a importación/exportación de plantas de romero en la Región de Murcia, ya que según las directrices europeas los datos referentes al comercio de esta planta no poseen un apartado individual y se encuentran agrupados junto a otras plantas como “*los demás*”, según la base de datos de comercio exterior “TARIC”. Pero si podemos encontrar el romero en las siguientes dos categorías:

- Correspondiente a “Semillas y frutos oleaginosos; Semillas y frutos diversos; Plantas industriales o medicinales; Paja y Forraje”. En la sección de “los demás” (1211908590), donde junto al romero también están: rosa, salvia, tilo, pimienta, mejorana, manzanilla, etc.

- Correspondiente a “Aceites esenciales y resinoides; preparaciones de perfumería, de tocador o de cosmética”. En la sección “los demás” (3307900000) junto a eucalipto, hinojo, orégano, salvia, timol...

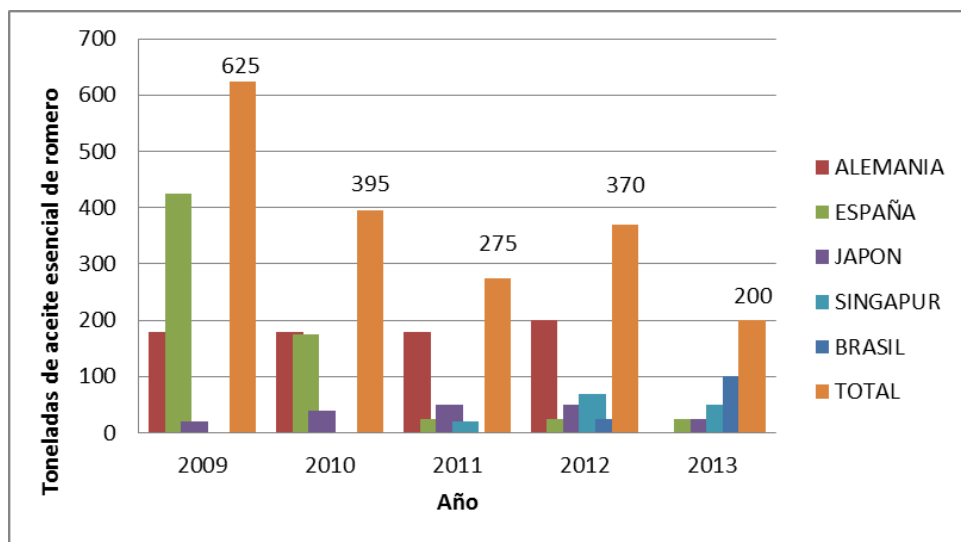
#### **4.2. Mercado de aceite esencial.**

Tradicionalmente el mercado internacional de las plantas aromáticas ha estado dominado por grandes firmas compradoras de materia prima por todo el mundo, aunque actualmente el mercado europeo ha experimentado cambios en sus canales de distribución donde son los productores de forma directa quienes se encargan de vender y exportar sus productos (Palacio, 2000).

Dentro de los productos más demandados por el consumidor se encuentran los aceites esenciales, esto se debe a las numerosas aplicaciones que poseen. La demanda de estos aceites se ha mantenido estable durante muchos años, aunque ha sido recientemente cuando ha experimentando un ligero aumento frente a los productos de síntesis. Este cambio en el consumo se debe en gran medida a la tendencia por parte del consumidor de adquirir productos cada vez más ecológicos y naturales.

El principal mercado internacional para el aceite de las plantas aromáticas es la Unión Europea, Francia, Grecia, Italia, Portugal, España y especialmene Alemania, como consecuencia de la tradición de consumo que posee estos países, lo que los convierte en un mercado estable. Aunque esta ampliamente extendido a nivel mundial siendo de especial mención en países como, Bulgaria, la ex-Yugoslavia, Rusia, Australia, Canadá, EEUU, Brasil, China, Egipto, India, Indonesia, Marruecos, Turquía (Moñino, 2010).

Así mismo, entre los principales productores a nivel internacional de aceite esencial de plantas aromáticas-medicinales se encuentran Estados Unidos con un 24%, China con un 18%, mientras que el aporte ejercido por España se sitúa en el 1,6% del total de aceite esencial (Moñino, 2010). Aunque los comerciantes que importan plantas aromáticas-medicinales en Europa ejercen una gran influencia en los mercados, a pesar de ser un número muy reducido, debido principalmente a los controles de la calidad que realizan en sus productos (Kuipers, 1995). A continuación se muestra una figura de la evolución de la venta de aceite esencial de romero en los últimos cinco años a varios países (Figura 6)



**Figura 6.** Comercio de aceite esencial de romero.

Por otro lado, los países en vías de desarrollo se manifiestan como grandes exportadores de plantas aromático-medicinales frente a los países desarrollados (Moñino, 2010).

Según Tewari y Virmani (1987), en España se producirían unas 180 toneladas anuales de aceite esencial de romero, de los cuales el rendimiento de aceite esencial de esta planta es próximo al 0,6% del peso fresco de la misma, según los datos publicados por Sotomayor, (1998).

En las últimas décadas la demanda de romero ha experimentado un importante crecimiento, debido al aumento de la preocupación por la salud. El reconocimiento de las posibilidades terapéuticas y medicinales de estos productos se ha convertido en un factor clave para el desarrollo de este mercado más allá de las fronteras europeas.

En la Unión Europea existen enfoques diversos acerca del reconocimiento de las posibilidades terapéuticas de las plantas medicinales. Un factor que restringe el crecimiento de la demanda, es la falta de acuerdo entre los distintos países industrializados sobre la clasificación de este grupo de productos. En países como Gran Bretaña y Holanda la mayoría de los fitofármacos se consideran suplementos alimenticios sin indicaciones medicinales, mientras que en Alemania, Francia e Italia, el tratamiento con fitomedicinas se encuentra bien afianzado y regulado por las autoridades sanitarias (Moñino, 2010).

Debido al uso comercial a nivel medicinal, aromático o condimentario que se hace tanto de las plantas de romero como de sus derivados (aceite y extracto) es evidente el creciente interés tanto por parte del cliente como de la propia industria en lo que a los parámetros de calidad se refiere. Con el fin principal de evitar fraudes y la heterogeneidad del producto, la industria hace controles de calidad para verificar la idoneidad de las muestras puestas a la venta, estos controles son cada vez más exigentes y consisten en

comparar la muestra con referencias establecidas en la NORMA ISO o de los propios clientes del producto.

Aunque actualmente, ya hay algunas prospecciones de romero que proceden de zonas especialmente diseñadas para tal propósito, la mayoría de las recolecciones para la Región de Murcia y zonas limítrofes de Albacete y Cuenca) se realiza sobre sus hábitas naturales, con lo cual esta vegetación silvestre podría no mostrar los valores esperados de los aceites (Pascual, 2000). Lo que nos lleva a la necesidad -ya comentada- de establecer más cultivos propios para estas plantas y así, no solo asegurar el abastecimiento de la misma sin necesidad de verse afectada la flora silvestre, sino también poder obtener unos productos de calidad y que sean rentables para su posterior comercialización. Ya que controlando el cultivo y desarrollo de estas plantas, podremos garantizar que nuestras materias primas son de la calidad exigida por el ciudadano y la industria.

Actualmente se dispone de la NORMA ISO 1342:2012, con la que se lleva a cabo esta normalización del sector. Con la creación de normativas se fijan los parámetros de calidad de los aceites esenciales, donde se establecen métodos de análisis, características fisicoquímicas y organolépticas y el perfil cromatográfico de dichos aceites. Así mismo, la normalización de este sector ha facilitado el comercio a nivel mundial ya que es de gran importancia para caracterizar y verificar la autenticidad de los aceites esenciales y detectar posibles adulteraciones. Estos cambios son un reflejo de la creciente exigencia en materia de calidad, especialmente en lo que a normas sanitarias se refiere, cada vez más rigurosas, especialmente respecto a limpieza y niveles admitidos de pesticidas y herbicidas.

## **5. Posibilidades de cultivo.**

Las plantas aromáticas-medicinales han sufrido un incremento en su demanda durante los últimos años, esto se debe en gran medida al interés que muestran los ciudadanos por productos más naturales. Aunque este incremento de demanda de producto natural no está correlacionado con un incremento significativo de los cultivos de estas plantas, las cuales en la inmensa mayoría de casos se recogen del medio natural, a esta sobreexplotación le añadimos el problema de la heterogeneidad, tanto en calidad como cantidad de los principales compuestos de interés comercial e industrial en los productos recolectados, debido a la falta de cultivos de quimiotipos definidos y bajo condiciones ambientales controladas.

Así mismo en España hay tierras que no son rentables para cultivos de cereales, debido sus condiciones edáfico-climáticas, pero si serían aptas para el cultivo y desarrollo de estas plantas (Moñino, 2010). Desde un punto de vista medio ambiental hemos de destacar que estos cultivos ayudarían a mantener el medio vegetal, siendo una pieza clave en la formación y recuperación de los suelos y protegiendo de la erosión de los mismos por lluvias torrenciales como las que se dan en la Región de Murcia.

Es por tanto necesaria una orientación enfocada en la obtención de cultivos establecidos de plantas con un perfil químico más definido y comercial, con el fin de optimizar los actuales recursos naturales y respetar las poblaciones silvestres evitando por tanto que estas poblaciones silvestres se vean amenazadas por una demanda cada vez mayor de materia prima en el futuro.

Un nuevo impulso en esta actividad debe pasar ahora por un enfoque más comercial, organizado y tecnológicamente adecuado,

que sintonice, con las tendencias de la Política Agraria, Rural y Medioambiental, sin olvidar que el cultivo y manipulación de estas plantas es una fuente importante de trabajo, debido a la gran cantidad de mano de obra necesaria, junto con los departamentos que necesita para investigación, comercio y distribución del producto final (Palacio, 2000; Fernández, 2006).



### **III. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La presente Memoria contempla la caracterización química – a nivel de aceite esencial y extracto polifenólico- y la determinación de actividades antioxidantes y antimicrobianas de poblaciones silvestres de *Rosmarinus officinalis* L. procedentes de los cinco pisos bioclimáticos definidos en la Región de Murcia.

De acuerdo a los objetivos definidos para el desarrollo de este trabajo, en concreto, se ha determinado la incidencia de factores ambientales y del estado fenológico de las plantas sobre su composición química y actividades antioxidantes y bactericidas frente a patógenos de alimentos (*Escherichia coli*, *Staphilococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium).

## **1. Aceite esencial.**

En relación a la producción, calidad y actividad antimicrobiana del aceite esencial de romero, cabe destacar el hecho de que los factores medioambientales del área en la cual estos arbustos crecen, pueden estimular en cierta medida el rendimiento en aceite

esencial obtenido de estas plantas. De este modo se determinó que en áreas de bajo índice de termicidad (pisos Termomediterráneo Superior y Supramediterráneo) el nivel de producción de aceite es superior al obtenido en zonas más calidas (Termomediterráneo inferior). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Angioni *et al.*, (2004), quienes obtienen variaciones en los rendimientos de aceite en romeros recolectados en diferentes áreas de Cerdeña (norte y sur). Posteriormente Zaouali *et al.*, (2010), también corroboran este comportamiento, es decir, bajos índices de termicidad favorecen el rendimiento de aceite esencial de romero recolectado en diferentes áreas naturales (zonas sub-húmedas y semiáridas de Túnez). Por lo tanto, parece confirmarse que los factores medioambientales ejercen una influencia decisiva sobre el rendimiento en aceite esencial de las plantas de romero.

Del análisis del perfil volátil del aceite esencial de romero procedente de las cinco áreas bioclimáticas estudiadas, se determina que, aunque a nivel cuantitativo se observan diferencias en las concentraciones de determinados volátiles, las concentraciones relativas de los tres componentes mayoritarios que definen el quimiotipo de estas plantas (1,8-cineol, alcanfor y  $\alpha$ -pineno) no varían significativamente entre las poblaciones analizadas. Por lo tanto, no es posible determinar un patrón de distribución de los distintos quimiotipos por piso bioclimático en nuestra región. Coincidiendo con los resultados publicados por Zaouali *et al.*, (2010), las variaciones detectadas en la composición deben atribuirse a factores genéticos propios de las plantas en cada población estudiada. Contrariamente, Tigrine- Kordjani *et al.*, (2007), sí que asocian variaciones en la composición química del aceite esencial de romero recolectado en diferentes áreas de Argelia, estableciendo correlaciones entre composición y procedencia. Estas diferencias deben atribuirse a los diferentes métodos de extracción del aceite esencial empleados, los que sin duda afectan en gran

medida a la composición cuantitativa de los mismos (Sotomayor *et al.*, 2001).

La enorme variabilidad en composición, encontrada entre individuos procedentes incluso de las mismas poblaciones, ha impedido marcar diferencias en quimiotipos, pero ha facilitado la posibilidad de conocer cómo afecta la relación de concentración relativa -entre los componentes que definen este parámetro- a la actividad antimicrobiana de estos aceites. Para esto, se seleccionaron aceites esenciales con composiciones similares, en los que la suma de concentración de los tres componentes que definen el quimiotipo es próxima, variando el orden de abundancia relativa entre los mismos. Se ensayaron los quimiotipos (1,8-cineol- $\alpha$ -pineno-alcanfor; 1,8-cineol-alcanfor- $\alpha$ -pineno; alcanfor-1,8-cineol- $\alpha$ -pineno; alcanfor- $\alpha$ -pineno-1,8-cineol;  $\alpha$ -pineno-1,8-cineol-alcanfor). Los resultados obtenidos mediante el ensayo de difusión en disco concluyen la existencia de una relación entre la composición química del aceite y su actividad antibacteriana frente a determinados patógenos. Para el caso de *S. Typhimurium*, la actividad antimicrobiana se ve favorecida por la presencia de 1,8-cineol y  $\alpha$ -pineno, mientras que alcanfor no parece jugar un papel importante en la inhibición. Esto hecho, según afirma Bjapai *et al.*, (2012), se puede deber a un efecto sinérgico entre los diferentes componentes del aceite esencial.

Frente a *S. aureus*, la actividad antimicrobiana mejora con la presencia de  $\alpha$ -pineno como componente mayoritario, mientras que si el componente en mayor proporción relativa es alcanfor la actividad es moderada, y si es 1,8-cineol la eficacia decrece considerablemente. Estos datos están en concordancia con los publicados por Zaouali *et al.*, (2010) quienes afirman que aceites esenciales ricos en 1,8-cineol no son eficaces frente a esta bacteria,

por tanto se deduce que a mayores concentraciones de  $\alpha$ -pineno y alcanfor, mayor es su actividad antimicrobiana.

Este efecto se puede correlacionar con el hecho de que los terpenos pueden desorganizar la membrana celular, y así, favorecer la lisis de la misma, tal y como afirman Bjpai *et al.*, (2012).

La efectividad del aceite esencial de romero frente a *E. coli*, se relaciona con la actuación combinada de los diferentes componentes minoritarios presentes en su fracción volátil y no debe asociarse a la acción de ningún componente en particular, conclusión coincidente con la publicada por Zaouali *et al.*, (2010).

Atendiendo a los datos publicados por Roldán *et al.*, (2010), la actividad antimicrobiana no solo depende de la concentración de sustancias activas en el aceite, sino también de la susceptibilidad del microorganismo a los citados componentes. Tal es el caso de la bacteria *L. monocytogenes*, ya que la efectividad del aceite no se vio afectada por la abundancia relativa entre los compuestos mayoritarios. Los resultados relativos a la actividad antimicrobiana procedentes de la determinación del MIC y MBC, manifiestan la gran efectividad que poseen las plantas de romero de la región de Murcia. Todos los quimiotipos estudiados poseen una elevada actividad, con la única excepción de los aceites ricos en 1,8-cineol frente *E coli* que, en este caso, la efectividad es moderada.

En línea con los objetivos planteados para el desarrollo de la presente memoria de Tesis, el estudio sobre el efecto del estadio fenológico de las plantas de romero sobre la composición y actividad antimicrobiana de sus aceites esenciales se desarrolla analizando plantas procedentes de las dos áreas bioclimáticas extremas de nuestra región. De acuerdo con la bibliografía consultada, hasta la fecha existe controversia sobre el estadio fenológico, principalmente

floración y fructificación, en el cual las plantas rinden máximos rendimientos en producción y calidad.

Los primeros resultados rinden mayores niveles de producción de aceite en el estadio fenológico de fructificación, en ambas áreas bioclimáticas, coincidiendo en su composición volátil con niveles relativos de concentración más abundantes en  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -terpineno, terpinoleno, y óxido de cariofileno.

La controversia en relación al rendimiento de aceite en labiadas en función del estado fenológico, viene marcada por autores entre los que se encuentran Zaouali *et al.*, (2013). Para estos investigadores el romero rinde el máximo aceite en la etapa de floración, lo que está en coherencia con el trabajo realizado por Hamrouni-Sellami *et al.*, (2009) en plantas de orégano. Por otro lado Salido *et al.*, (2003) y posteriormente Singh y Guleria (2013), afirman, coincidiendo con nuestros resultados, que es en la etapa de fructificación donde se produce el mayor rendimiento en aceite esencial.

En cuanto a la composición química en ambos estadios fenológicos, los resultados de Zaouali *et al.*, (2013) coinciden con los nuestros; estos autores encuentran en las plantas que estudian un incremento en la concentración de monoterpenos hidrocarbonados en la etapa de fructificación. Sin embargo, contrariamente a lo publicado por estos investigadores, entre las plantas recolectadas en ambos estadios fenológicos, no se detectan diferencias entre las concentraciones relativas de los monoterpenos oxigenados y los sesquiterpenos. Estas diferencias deben atribuirse al hecho de que la composición química del aceite de las plantas de romero está altamente influenciada por la genética de la planta y en menor medida por los factores ecológicos en los que se desarrolla la misma (Dutta *et al.*, 2005).

La correlación entre la variación en composición de los aceites, dependiente del estadio fenológico, y la actividad antimicrobiana frente a patógenos de alimentos Gram positivos (*L. monocytogenes* y *S. aureus*) y Gram negativos (*S. Typhimurium* y *E. coli*), también revela la mayor efectividad de aceites procedentes de plantas recolectadas en el estadio de fructificación.

Son numerosos los autores que afirman que *E. coli*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*, son bacterias muy resistentes y resaltan la importancia de la composición química y la proporción entre los componentes de los aceites sobre su eficacia antimicrobiana (Solominos *et al.*, 2009; Alexopoulos *et al.*, 2011; Tornuk *et al.*, 2011; Teixeira *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos en nuestro ensayo muestran una actividad moderada de los aceites frente a *Salmonella Typhimurium* y *Staphylococcus aureus*, que podría correlacionarse con el incremento en la concentración de  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -terpineno, terpinoleno y óxido de cariofileno durante el estadio de fructificación.

Este fenómeno también fue observado por diversos investigadores entre los que se incluyen, Romano *et al.* (2009); Ait.-Ouazzou *et al.* (2011) e Ivanovic *et al.* (2012). De acuerdo con estos autores, la efectividad de aceites esenciales, procedentes de diversas labiadas, frente a *E coli*, se favorece con cambios en la proporción de concentración relativa existente entre determinados componentes.

La mayor parte de la literatura científica se refiere al hecho de que los componentes mayoritarios son los responsables de esta actividad antimicrobiana (Jian *et al.*, 2011; Ivanovic *et al.*, 2012; Teixeira *et al.*, 2013), pero en este trabajo se definen otros componentes minoritarios que podrían estar relacionados con esa actividad biológica, ya que según autores, entre los que se incluyen Deba *et al.*, (2008), este tipo de compuestos son en parte los



responsables de destruir la integridad celular y de inhibir la respiración celular. Este hecho se corrobora en el trabajo llevado a cabo por Ulubelen *et al.*, (1994), quienes ponen de manifiesto la capacidad antibacteriana del óxido de cariofileno, componente minoritario en el aceite esencial de romero.

## 2. Extracto polifenólico.

El creciente interés en la búsqueda de compuestos bioactivos procedentes de fuentes naturales es evidente, numerosos trabajos reflejados en publicaciones científicas avalan este hecho (Aruoma *et al.*, 1992; Erkan *et al.*, 2008; Klancnik *et al.*, 2009; Romano *et al.*, 2009; Bernardes *et al.*, 2010 (b); Katalinic *et al.*, 2010; Rodríguez Rojo *et al.*, 2012). En esta línea en particular, los subproductos derivados de la destilación de plantas aromático-medicinales, tras la extracción del aceite esencial, constituyen una reserva importante de componentes polifenólicos con, entre otras, marcadas actividades antioxidantes y antimicrobianas (Jordán *et al.*, 2009; Ben Farhat *et al.*, 2009).

El perfil polifenólico del romero ha sido ampliamente descrito en la literatura científica, los trabajos más recientes se corresponden con los publicados por Piskernik *et al.*, (2011); Vegara *et al.*, (2011); Zegura *et al.*, (2011); Rodríguez-rojo *et al.*, (2012); Visentin *et al.*, (2012); Sasaki *et al.*, (2013) y Kontogianni *et al.*, (2013). Sin embargo hasta la fecha no se ha tenido constancia de la riqueza del romero en estas fracciones polifenólicas dependiendo de su distribución a lo largo de toda la geografía murciana.

Con objeto de estudiar la variabilidad y riqueza en composición polifenólica, de los subproductos de la destilación, de plantas de romero procedentes de cinco de los pisos bioclimáticos definidos por Rivas-Martínez (1987) en la Región de Murcia, en la

presente Memoria se exponen los resultados obtenidos de un total de 150 plantas individuales recolectadas de 31 poblaciones silvestres.

El perfil polifenólico de estas plantas se caracteriza por la presencia de ácido carnósico, carnosol, ácido rosmarínico y hesperidina como componentes mayoritarios, dato coincidente con los publicados previamente por Bernardes *et al.*, (2010)(b) y Tai *et al.*, (2012). El estudio de la variabilidad e incidencia del piso bioclimático sobre la composición polifenólica de estas plantas no rindió resultados concluyentes, es decir, la variabilidad en composición cuantitativa encontrada entre plantas individuales no permite establecer una relación entre la riqueza en compuestos polifenólicos y el piso bioclimático de procedencia. En la literatura científica consultada, se describen controversias en cuanto a la variabilidad en composición de plantas de romero. Autores entre los que se encuentran, Luis *et al.*, (2007); Luis y Johnson (2005) y Munné-Bosch (1999) definen una posible relación entre el estrés abiótico sufrido por la planta y la síntesis de compuestos polifenólicos en la misma. Sin embargo Martin y Hernandez-Bermejo (2000), coincidiendo con nuestra hipótesis de partida para futuros estudios, propone que las diferencias en composición cuantitativa entre plantas de romero han de atribuirse a factores genéticos.

El estudio de la relación entre la capacidad antioxidante y bacteriostática de los extractos polifenólicos y su composición, dependiendo de la procedencia, rinde como principal conclusión que elevados índices de termicidad favorecen estas actividades. En este sentido, los extractos polifenólicos con mayor capacidad antioxidante proceden de ambos pisos Termomediterráneos (superior e inferior), asociando este incremento a la mayor presencia de ácido carnósico, ácidos fenólicos y algunos flavonoides. No obstante, a pesar de que la bibliografía científica define al ácido carnósico como el principal

componente asociado a la elevada capacidad antioxidante del romero, los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que la presencia de ácidos fenólicos, como el ácido rosmarínico, y flavonoides, como la hesperidina, en elevadas concentraciones pueden compensar la capacidad antioxidante de extractos con niveles inferiores en este diterpeno. Estos resultados coinciden con los publicados por Moreno *et al.*, (2006) y Mi Yoo *et al.*, (2008), quienes afirman que la actividad antioxidante de los extractos polifenólicos de romero está influenciada por la relación de concentración existente entre sus principios activos.

A nivel antimicrobiano no se detecta una relación clara entre el perfil químico del extracto y la actividad bacteriostática. El estudio de la efectividad de los extractos frente a *L. monocytogenes*, indica que el mayor porcentaje de plantas activas proceden del piso Mesomediterráneo inferior, aunque la mayor efectividad bacteriostática ha sido detectada en plantas procedentes del Termomediterráneo superior. De este dato podría deducirse que la elevada actividad antimicrobiana en estas plantas está ligada a la presencia de ácido carnósico como componente mayoritario en el extracto polifenólico. Este resultado es coincidente con el publicado por Vegara *et al.*, (2011), para estos autores la efectividad del ácido carnósico frente a bacterias patógenas es superior a la de cualquier otro componente mayoritario del extracto, incluyendo el ácido rosmarínico.

Frente a esto, diversas publicaciones científicas muestran controversia sobre las posibles relaciones que pueden existir entre la composición del extracto polifenólico y su actividad antimicrobiana. Tal es el caso de Moreno *et al.*, (2006) e Ivanovic *et al.*, (2012), quienes demuestran que la efectividad del romero está relacionada con un posible sinergismo entre el ácido fenólico rosmarínico y el diterpeno ácido carnósico. Otros autores, entre los que se incluyen

Bernardes *et al.*, (2010)(b), sin embargo afirman que existe una estrecha relación entre los niveles de concentración de los diterpenos ácido carnósico/carnosol y la actividad antimicrobiana de estos extractos.

La disparidad de afirmaciones entre autores y la enorme variabilidad encontrada entre plantas individuales, relativo a la composición cuantitativa polifenólica, invita a estudiar en qué medida la relación de concentración entre los componentes mayoritarios de los extractos afecta a las actividades biológicas de los mismos (considerando capacidades antioxidantes y antimicrobianas). Siguiendo esta línea de investigación, se seleccionaron plantas individuales en las que la suma en concentración de sus componentes mayoritarios era próxima, no siendo así la relación de concentración entre los principios activos (ácido carnósico/carnosol) considerados como agentes primarios responsables de las actividades biológicas estudiadas (Aruoma *et al.*, 1992). Los ratios de concentración (ácido carnósico/carnosol) seleccionados se corresponden con: 40/60; 50/50; 60/40.

Los resultados más relevantes confirman a nivel de capacidad antioxidante que a igualdad en concentración de ácido rosmarínico, la relación de concentración entre los dos diterpenos mayoritarios, del extracto polifenólico de romero, no afecta a esta actividad, es decir, ambos componentes poseen un peso específico similar en relación a su actividad antioxidante. Sin embargo, en extractos en los que la relación de concentración entre diterpenos es próxima a 1, se pone de manifiesto la efectividad del ácido rosmarínico. La actividad antioxidante de este último componente ha sido cuestionada por Wellwood y Cole (2004), quienes no encuentran correlación entre esta capacidad y la concentración de este activo en el extracto. Sin embargo, coincidiendo con los resultados obtenidos en la presente Tesis, Pérez-Fons *et al.*, (2010), describen la mayor

efectividad del ácido rosmarínico, en medios hidrosolubles, frente a los diterpenos ácido carnósico y carnosol. Por lo tanto, independientemente de la naturaleza del medio, debe existir una relación directa entre las concentraciones de estos tres componentes mayoritarios del extracto de romero y su actividad antioxidante, dato coincidente con el publicado por Del Baño *et al.*, (2003).

La efectividad de los extractos seleccionados frente a bacterias patógenas de alimentos Gram positivas (*S. aureus*, *L. monocytogenes*), como cabría esperar según los trabajos publicados por Bozin *et al.*, (2007) y Klančnik *et al.*, (2011), ha sido superior a la detectada frente a las Gram negativas testadas (*E. coli*, *S. Typhimurium*).

El estudio de la relevancia de la relación de concentración entre los activos mayoritarios del extracto y su relación con la capacidad bactericida pone de manifiesto la escasa eficacia del ácido rosmarínico en extractos en los que la proporción entre diterpenos es próxima. Sin embargo, la presencia de carnosol en concentración superior a la de ácido carnósico incrementa la efectividad de los extractos frente a *L. monocytogenes* y *S. aereus*. Contrariamente a lo publicado por Klančnik *et al.*, (2011) y Bubonja-Sonje *et al.*, (2011) -quienes asocian la actividad antimicrobiana de los extractos de romero a la presencia de ácido carnosico como componente mayoritario en el extracto- estos resultados ponen de manifiesto el papel fundamental del carnosol en la actividad antimicrobiana del romero.

La determinación del estadio fenológico óptimo para la recolección de plantas de romero, en relación a la composición química y actividades antioxidantes y antimicrobianas de sus extractos, ha sido, al igual para aceites esenciales, estudiado en los estados fenológicos de floración y fructificación.

Las variaciones encontradas en cuanto a composición química son cuantitativas y se relacionan directamente con los niveles de concentración de hesperidina y los ácidos caféico, ferúlico, rosmarínico y carnósico. En concreto, en floración (en la estación de primavera, cuando las temperaturas son suaves) se favorece la producción de los ácidos caféico, ferúlico y carnósico, mientras que en fructificación (correspondiente a la estación de verano, cuando las temperaturas son elevadas) se induce la producción de hesperidina, carnosol y ácido rosmarínico. Este hecho se podría justificar atendiendo al trabajo realizado por Luis *et al.*, (2007), quienes relacionan el estrés abiótico por frío con un incremento en la síntesis de los ácidos caféico y carnósico. Con anterioridad, Munné-Bosch (1999) estudió el efecto del estrés hídrico sobre la producción de polifenoles en romero, destacando un descenso en la concentración de estos componentes asociado a la protección de los cloroplastos frente a la oxidación. Este hecho podría justificar el incremento en carnosol detectado en las muestras recolectadas en fructificación, el papel protector del ácido carnósico frente al estrés producido por las altas temperaturas justificaría el incremento de la concentración de su lactona derivada carnosol.

Estas variaciones asociadas a la estacionalidad también reflejan cambios en la actividad antioxidante de los extractos analizados. El incremento en concentración de polifenoles, entre los que se incluyen el carnosol, el ácido rosmarínico y la hesperidina durante la etapa de fructificación, está directamente relacionado con la mejora de la capacidad antioxidante de los extractos. Esta afirmación se avala con trabajos científicos previamente publicados por Cui *et al.*, (2012) y Kontogianni *et al.*, (2013), quienes consideran a la lactona carnosol como principal responsable de esta actividad. Así mismo, el ácido rosmarínico y la hesperidina han sido citados en bibliografía como importantes captadores de radicales libres

(Hosseinimehr *et al.*, 2009; Yehb *et al.*, 2009; Ahmad *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013).

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS



## **IV. CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1.- En la Región de Murcia, la elevada variabilidad química encontrada entre individuos pertenecientes al género y especie *Rosmarinus officinalis* no permite definir quimitipos ni composiciones polifenólicas diferenciadas por pisos bioclimáticos concretos. Las diferencias en concentración han de atribuirse a factores genéticos, todavía por determinar.

2- La disparidad encontrada en cuanto a rendimiento en producciones de aceite esencial -favorecida por bajos índices de termicidad- y de extractos polifenólicos –elevados en zonas próximas al nivel del mar- invitan a concluir que las zonas ubicadas en el piso Termomediterráneo superior son las más indicadas para la recolección o establecimiento del cultivo de estas plantas.

3.- La variabilidad química detectada entre individuos ha permitido definir quimiotipos y composiciones polifenólicas específicas que determinan diferente efectividad en capacidades antioxidantes y antimicrobianas en estas plantas.

Así, en el aceite esencial elevadas actividades antimicrobianas se asocian a quimiotipos ricos en 1,8-cineol y  $\alpha$ -pineno.

4.- En relación al extracto polifenólico y su capacidad bacteriostática, se concluye la elevada especificidad de la lactona carnosol, que en concentraciones superiores a su precursor ácido carnósico, incrementa la reactividad de estos extractos.

Sin embargo, este efecto no es extrapolable a la actividad antioxidante *in vitro*, ya que extractos con concentraciones próximas en contenido diterpénico total, diferentes ratios de concentración entre ambos componentes no modifican la citada actividad.

5.- Atendiendo a riqueza en producciones y actividades antioxidantes y antimicrobianas, el estado fenológico de fructificación es el más indicado para la recolección de estas plantas.

## V. RESUMEN

## RESUMEN

La Región de Murcia se caracteriza por poseer una gran abundancia de flora aromática espontánea, entre la que destaca la especie *Rosmarinus officinalis* L., de la que, dada su riqueza en principios activos con elevadas actividades biológicas, es considerada por numerosas empresas e industrias del país, como una importante fuente de materia prima.

La demanda cada vez mayor de productos con actividad biosaludable, ha llevado a las industrias farmacéuticas y cosméticas a retomar el estudio de estas plantas. Esta reintroducción de los extractos de romero en el mercado se debe en gran medida a la identificación de determinados compuestos químicos, que parecen ser los principales responsables de la aplicación tradicional de estas plantas para tratar ciertas clases de dolencias y enfermedades.

El romero, a diferencia de otras especies aromáticas, no se encuentra establecido como un cultivo comercial todavía en España. El material utilizado por la industria procede mayoritariamente de su

recolección en monte, lo que origina problemas de disponibilidad y homogeneidad en la calidad de las producciones.

El estudio del perfil químico en plantas de romero procedentes de diferentes regiones muestra la diferente composición cuantitativa, e incluso en ocasiones cualitativa, existente. Esta heterogeneidad, según origen, debe ser un factor a tener en cuenta, ya que afecta tanto a la calidad de los extractos, como a la actividad de los mismos. Hasta el momento, se cree que factores abióticos y genéticos son los principales responsables de estas variaciones en composición.

Es por esto que la presente Tesis aborda, como factor diferenciador, el estudio de la variabilidad que la naturaleza ofrece, analizando de forma individual plantas de romero. La correlación entre el área de procedencia, la composición química y la actividad biológica (medida como capacidad antioxidante y antimicrobiana), nos permitirá tener una idea más acertada de cómo influyen los factores ambientales en los extractos y aceites finalmente obtenidos.

Para llevar a cabo este proyecto se ha procedido al estudio de 150 plantas de romero procedentes de cinco pisos bioclimáticos definidos en nuestra Región.

Los resultados obtenidos confirman que los factores genéticos podrían jugar un papel muy importante en la elevada variabilidad química detectada incluso entre individuos pertenecientes a una misma población. Esta heterogeneidad impide asociar quimiotipos o composiciones polifenólicas específicas a determinadas áreas bioclimáticas. Sin embargo, ofrece la ventaja de correlacionar perfiles químicos diferentes con marcadas actividades antioxidantes y antimicrobianas.



De los principales resultados, se concluye, que aceites esenciales con quimiotipos ricos en 1,8-cineol y  $\alpha$ -pineno presentan elevada capacidad bactericida frente a patógenos de alimentos. A su vez, la presencia, en los extractos polifenólicos, de carnosol en concentraciones superiores a las de su precursor ácido carnósico incrementa significativamente la actividad bacteriostática de los mismos.

En cuanto a la capacidad antioxidante, asociada en el romero fundamentalmente a sus extractos polifenólicos, se comprueba que a igualdad de concentración de ácido rosmarínico, la relación de concentración entre los dos componentes -ácido carnósico y carnosol- con mayor actividad no afecta a esta propiedad.

Como objetivo final de la presente Memoria de Tesis se contempla la transferencia del conocimiento al sector agroalimentario. La selección de plantas con máximos rendimientos y actividades biológicas -tanto de sus aceites esenciales como de sus extractos polifenólicos- atendiendo al piso bioclimático de procedencia, permitiría su posible establecimiento como cultivo comercial. Se confirma que en zonas con bajos índices de termicidad y en el estadio fenológico de fructificación, se obtienen los máximos rendimientos en aceite esencial; sin embargo, para los extractos polifenólicos, los máximos rendimientos y actividades se alcanzan en plantas ubicadas fundamentalmente en el piso Termomediterráneo inferior.

Por lo tanto, en la Región de Murcia, zonas ubicadas en el piso Termomediterráneo superior parecen ser las más indicadas para el establecimiento de este cultivo, con la finalidad de obtener máximo rendimiento y calidad en sus producciones.

## RESUMEN

## **VI. SUMMARY**

## SUMMARY

The province of Murcia (Région de Murcia), in south-eastern Spain, is well known for its abundance of spontaneous aromatic plants. Among the different species, rosemary, *R officinalis* L., should be highlighted, mainly because of its characteristic chemical profile, in which many active components have proved to exhibit important biological activities. This is probably the main reason why rosemary is an important source of raw materials for several companies and industries in Spain.

The increasing demand for natural products with bio-healthy activities for use in the pharmaceutical and cosmetic industries has led to a re-initiation of the study of rosemary, whose introduction to the global market is related to the new chemical structures that have been identified in its extracts - active components that are probably the basis of the plant's use in folk medicine.

Contrary to other aromatic and medicinal plants, rosemary has not been established as a commercial crop in Spain, and the main source of raw material for industry is still the spontaneous

populations, which would explain the lack of availability and homogeneity of the product at certain times during the year.

According to the scientific literature, the geographical area in which rosemary grows dramatically affects its chemical composition. Such variability should be taken into account, since the quality and biological activity of rosemary extracts vary, depending on their composition. To date, it has been thought that abiotic and genetic variations are two of the principal factors responsible for this heterogeneity.

Based on the above, the present doctoral thesis addresses, as a novelty, the chemical variability exhibited by individual plants belonging to spontaneous rosemary populations. The correlation between the growing area, the chemical composition and the biological properties (measured as antioxidant and antimicrobial activities) has allowed us to increase the knowledge available about how these environmental factors affect the quality of the essential oil and polyphenolic extracts obtained from rosemary.

For this thesis, a total of 150 individual plants were harvested from five different bio-climatic areas of the province of Murcia.

Among the major results is that genetic factors are confirmed as having a relevant impact on the chemical variability detected, even among individuals belonging to the same population. This heterogeneity does not allow for the establishment of any possible relation between specific essential oil chemotypes or polyphenolic compositions and particular bioclimatic areas. Nevertheless, this situation opens up the opportunity to correlate the different chemical profiles observed with some of rosemary's outstanding antioxidant and antimicrobial activities.

Along this line, the presence of eucalyptol and  $\alpha$ -pinene as the major components in the volatile fractions increases the bactericide capacity shown by these oils against food-borne pathogens. Also, and related to the polyphenolic fractions, higher bacteriostatic activities were observed when the concentration of carnosol was higher than that of its corresponding precursor, carnosic acid.

With respect to the antioxidant activity, which is mainly related to the polyphenolic fraction in rosemary, at equal rosmarinic acid amounts the relative concentrations of carnosic acid and carnosol do not affect to this bioactivity.

The transfer of new knowledge to the agricultural and food industry sectors is thanother goal of the present thesis. The selection of individual plants with the highest yields and biological activities - considering growth and bioclimatic areas - should allow for the establishment of commercial crops in the near future.

Low thermicity indexes favoured the production of the essential oil yielded by rosemary plants during the phenological stage of fruit maturation. Contrary to this, and related to the polyphenolic fraction, the highest yields and biological activities were reached by plants taken from the Lower Thermo-Mediterranean area.

Hence, in the province of Murcia, the best yields and quality will be obtained if rosemary plants are established commercially in the Upper Thermo-Mediterranean areas of the same.

-

## SUMMARY



## VII. BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, S. T., Arjumand, W., Nafees, S., Seth, A., Ali, N., Rashid, S., Sultan, S. (2012). Hesperidin alleviates acetaminophen induced toxicity in wistar rats by abrogation of oxidative stress, apoptosis and inflammation. *Toxicology Letters*, vol. 208 (2): 149–161.
- Ait-Ouazzou, A., Cherrat, L., Espina, L., Loran, S., Rota, C., Pagan, R. (2011). The antimicrobial activity of hydrophobic EO constituents acting alone or in combined processes of food preservation. *Innovative Food Science and Emerging Technologie*, vol. 12: 320–329.
- Alexopoulos, A., Kimbaris, A. C., Plessas, S., Mantzourani, I., Theodoridou, I., Stavropoulou, E., Polissiou, M. G., Bezirtzoglou, E. (2011). Antibacterial activities of essential oils from eight Greek aromatic plants against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Anaerobe*, vol. 17 (6): 399–402.
- Al Shaal, L., Shegokar, R., Müller, R. H. (2011). Production and characterization of antioxidant apigenin nanocrystals as a

- novel UV skin protective formulation. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 420: 133–140.
- Alcaraz, F. J., Sanchez-Gomez, P., Correal, E. (1989). Catálogo de plantas aromáticas, condimentarias y medicinales de la Región de Murcia. Monografía INIA MAPA, nº 67: 56pp.
- Almela, L., Sánchez-Muñoz, B., Fernández-López, J. A., Roca, M. J., Rabe, V. (2006). Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography A*, vol. 1120: 221–229.
- Álvarez, A., García García, B., Jordán, M. J., Martínez-Conesa, C., Hernández, M. D. (2012). The effect of diets supplemented with thyme essential oils and rosemary extract on the deterioration of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) during storage on ice. *Food Chemistry*, vol. 132: 1395–1405.
- Angioni, A., Barra, A., Cereti, E., Barile, D., Coisson, J. D., Arlorio, M., *et al.* (2004). Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, vol. 52: 3530-3535.
- Arango-Mejia, M. C. (2006). Usos medicinales del Romero: botánica de interés médico.
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Aesbach, R., Loliger, J. (1992). Antioxidant and pro-oxidant properties of active Rosemary constituents: Carnosol and carnosic acid. *Xenobiotic*, vol. 22: 257-268.
- Bajpai, V. K., Kwang-Hyun Baek, K., Kang, S. C. (2012). Control of Salmonella in foods by using essential oils: a review. *Food Research International*, vol. 45: 722-734.

- Bañón, S., Méndez, L. E. (2012). Effects of dietary rosemary extract on lamb spoilage under retail display conditions. *Meat Science*, vol. 90: 579–583.
- Ben Farhat, M., Jordán, M. J., Chaouech-Hamada R., Landoulsi A., Sotomayor, J. A.(2009). Variations in essential oil, phenolic compounds, and antioxidant activity of tunisian cultivated *Salvia officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57(21): 10349-10356.
- Bernardes, W. A., Lucarini, R., Tozatti, M. G., Lúzio, G., Flauzino, B., Souza, M. G. M., Turattib, I. C. C., Silva, M. L., Martins, C. H. G., Da Silva Filhoa, A. A., Cunha, W. R. (2010). Antibacterial Activity of the Essential Oil from *Rosmarinus officinalis* and its Major Components against Oral Pathogens. *Zeitschrift für Naturforschung*, vol.65: 588 – 593. (a)
- Bernardes, W. A., Lucarini, R., Tozatti, M. G., Souza, M. G. M., Silva, M. L., Filho, A. A., Gomes Martin, C. H., Crotti, A. E. M., Pauletti, P. M., Groppo, M., Cunha, W. R. (2010). Antimicrobial Activity of *Rosmarinus officinalis* against Oral Pathogens: Relevance of Carnosic Acid and Carnosol. *Chemistry & Biodiversity*, vol. 7: 1835-1840. (b)
- Borrás Linares, I., Arráez-Román, D., Herrero, M., Ibáñez, E., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2011). Comparison of different extraction procedures for the comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in *Rosmarinus officinalis* by reversed-phase high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, vol. 1218: 7682– 7690.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Jovin, E. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage

- (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol.55: 7879–7885.
- Brenes, A., Roura, E. (2010). Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 158: 1–14.
- Brewer, M. S. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Food Science and Food Safety*, vol. 10: 221-247.
- Brines, R., Bautista, A., Bonanad, I., Fernandez, N., Lopez S., Ortega, JD., Primo, B., Serrano., M., Soler, S. (2007). Atlas ilustrado de las hierbas y plantas aromáticas medicinales y culinarias. *Susaeta*, ISBN: 978-84-305-5971-884-305-5971-X.
- Bubonja-Sonje, M., Giacometti, J., Abram, M. (2011). Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*, vol. 127: 1821–1827.
- Carvalho, A. M. (2010). Plantas y sabiduría popular del Parque Natural de Montesinho: un estudio etnobotánico en Portugal. Madrid, *CSIC*.
- Castano, P., Hader, I., Ciro, G., Zapata, J.E., Jimenez, S.L. (2010). Bactericidal activity of methanolic leaf extract and leaf essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. on some foodborne bacteria. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, vol. 17 (2): 149–154.
- Celiktas, O. Y., Hames Kocabas, E. E., a, Bedir, E., Sukan, F. V., Ozek, T., Baser, K. H. C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, vol. 100: 553–559.

- Consentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., Palmas, F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, vol. 29: 130–135.
- Correal, E., Sotomayor, J. A. (2001). Romero en la Horticultura Española. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, Cordoba, ISBN: 84-87729-37-1. 222-225pp.
- Cowan, M. M. (1999). Plant Products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 12(4): 564-582.
- Cui, L., Kim, M. O., Seo, J. H., Kim, I. S., Kim, N. Y., Lee, S. H., Park, J., Kim, J., Lee, H. S. (2012). Abietane diterpenoids of *Rosmarinus officinalis* and their diacylglycerol acyltransferase-inhibitory activity. *Food Chemistry*, vol. 132: 1775–1780.
- Cuvelier, M. E., Richard, H., Berset, C. (1996). Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 73(5): 645-652.
- D'Andrea, L. (1998). La coltivazione del rosmarino. *Erboristeria Domani*, vol. 38: 7-8.
- Deba, F., Xuan, T. D., Yasuda, M., Tawata, S. (2008). Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. *Food Control*, vol. 19: 346–352.
- De Rivera, D. (1994). Introducción al mundo de las plantas medicinales en Murcia. Murcia: Ayuntamiento, Concejalía de Sanidad y Medio Ambiente.
- De Rivera, D., Obón, C. (1991). Las plantas medicinales de nuestra región. *Editora regional de Murcia*.

- De Rivera, D., Obón, C. (1995). Las plantas, las esencias y los perfumes. *Editora ayuntamiento de Murcia*. 78-79.
- Del Baño, M. J., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-Garcia, O., Del Rio, J. A., Ortuño, A., Quirin, K. W., Gerard, D. (2003) Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51: 4247–4253.
- Del Baño Zapata, M. J. (2005). Caracterización, distribución, biosíntesis y propiedades antioxidantes de los principales compuestos polifenólicos presentes en *Rosmarinus officinalis*. *Tesis Doctoral*. Universidad de Murcia.
- Dutta, A., Batra, J., Pandey-Rai, S., Singh, D., Kumar, S., Sen, J. (2005). Expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic pathway genes corresponds to accumulation of related alkaloids in *Catharanthus roseus*. *Planta*, vol. 83: 220–376.
- El Omri., Hana, J., Yamada, P., Kawada, K., Abdrabbah, M. B., Isod, H. (2010). *Rosmarinus officinalis* polyphenols activate cholinergic activities in PC12 cells through phosphorylation of ERK1/2. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 131: 451–458.
- Erkan, N., Ayranci, E., Ayranci, E. (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, vol. 110: 76–82.
- Faleiro, M. L., Miguel, M. G., Ladeiro, F., Venancio, F., Tavares, R., Brito, J. C., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G. (2002). Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in Applied Microbiology*, vol. 36: 35–40.



Fernández, A. (2006). Las plantas Aromáticas y Medicinales, PAM, un potencial con gran necesidad de reorientación. *Revista española de estudios agrosociales y pesqueros*, ISSN 1575-1198, vol. 209: 177-214.

Font Quer, P. (1999). *Plantas medicinales: el Dioscorides renovado. Peninsula.*

Gómez, Orea. (1999). *Las Plantas de Extractos. Bases para un Plan de Desarrollo del Sector. Fundación Alfonso Martín Escudero.*

González, E. A., Nazareno, M, A. (2011). Antiradical action of flavonoide ascorbate mixtures. *LWT - Food Science and Technology*, vol. 44: 558-564.

Hamrouni Sellami, I., Maamouri, E., Chahed, T., Wannes, W. A., Kchouk, M, E., Marzouk, B. (2009). Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). *Industrial Crops and Products*, vol. 30: 395–402.

Hernández-Hernández, E., Ponce-Alquicira, E., Jaramillo-Flores, M. E., Guerrero Legarreta, I. (2009). Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Science*, vol. 81: 410–417.

Horváthová, E., Slamenová, D., Navarová, J. (2010). Administration of rosemary essential oil enhances resistance of rat hepatocytes against DNA-damaging oxidative agents. *Food Chemistry*, vol. 123: 151–156.

Hosseinimehr, S. J., Ahmadi, A., Beiki, D., Habibi, E., Mahmoudzadeh, A. (2009). Protective effects of hesperidin against genotoxicity induced by <sup>99m</sup>Tc-MIBI in human

- cultured lymphocyte cells. *Nuclear Medicine and Biology*, vol. 36: 863–867.
- Ivanovic, J., Misic, D., Zizovic, I., Ristic, M. (2012). In vitro control of multiplication of some food-associated bacteria by thyme, rosemary and sage isolates. *Food Control*, vol. 25: 110-116.
- Jamshidi, R., Afzali, Z., Afzali, D. (2009). Chemical Composition of Hydrodistillation Essential Oil of Rosemary in Different Origins in Iran and Comparison with Other Countries. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, vol. 5 (1): 78-81.
- Jarrar, N., Abu-Hijleh, A., Adwan, K. (2010). Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. alone and in combination with cefuroxime against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 121-123.
- Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y., Wang, W., Luo, M., Zhao, C., Zua, Y., Liu, X. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environmental toxicology and pharmacology*, vol. 32: 63–68.
- Jordán, M. J., Martínez, R. M., Martínez, C., Moñino, I., Sotomayor, J. A. (2009). Polyphenolic extract and essential oil quality of *Thymus zygis* ssp *gracilis* shrubs cultivated under different catering levels. *Industrial Crops and Products*, vol. 29: 145–153.
- Jordán, M. J., Lax, V., Martínez, C., Aouissat, M., & Sotomayor, J. A. (2010). Chemical Intraspecific Variability and Chemotypes Determination of *Rosmarinus officinalis* L. in the Region of Murcia. Lisbon: 28th International Horticultural Congress Lisbon.

- Katalinic, V., Mozina, S. S., Skroza, D., Generalic, I., Abramovic, H., Miloš, M., Ljubenkovic, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinc, P., Boban, M. (2010). Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry*, vol. 119: 715–723.
- Klancnik, A., Guzej, B., Hadolin Kolar, M., Abramovic, H., Smole Mozina, S. (2009). In vitro antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *Journal of Food Protection*, vol. 72: 1744–1752.
- Klancnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., Smole Možina, S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 81: 121–126.
- Klancnik, A., Piskernik, S., Smole Mozina, S., Gasperlin, L., Jeršek, B. (2011). Investigation of some factors affecting the antibacterial activity of rosemary extracts in food models by a food microdilution method. *International Journal of Food Science & Technology*, vol. 46: 413–420.
- Kontogianni, V. G., Tomic, G., Nikolic, I., Nerantzaki, A., Sayyad, A., Stosic-Grujicic, N., Stojanovic, S., Gerothanassis, I. P., Tzakos, A. G. (2013). Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chemistry*, vol. 136 (1): 120–129.
- Kuipers, S. E. (1995). Trade in medical plants for conservation and health care. FAO, *Non-Wood Forest Products*, vol. 11: 35-46.
- Lange, D. (1998). Europe's medicinal and aromatic plants: Their use trade and conservation. A Traffic Species in Danger Report.

- Lawless, J. (1998). Guía familiar de aceites esenciales. *Tikal*, ISBN: 84-305-8664-4.
- Linck, V. M., Da Silva, A. L., Figueiro, M., Caramao, E. B., Moreno, P. R. H., Elisabetsky, E. (2010). Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive Behavior in mice. *Phytomedicine*, vol. 17: 679–683.
- Lo, A. H., Liang, Y. C., Lin-Shiau, S. Y., Ho, C. T., Lin, J. K. (2002). Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through. *Carcinogenesis*, vol. 23 (6): 983-991.
- López González, G. (2001). Los árboles y arbustos de la península ibérica. *Mundi-Prensa*. Madrid.
- López Piñero, JM., Costa Taléns, M. (1996). Las plantas del mundo en la historia. *Fundación Bancaja*.
- López, P., Sanchez, C., Batle, R., Nerin, C. (2005). Solid and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53(17): 6939–6946.
- Luis, J. C., Johnson, C. B. (2005). Seasonal variations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary extracts. Analysis of their in vitro antiradical activity. *Spanish Journal of Agricultural Research*, vol. 3: 106–112.
- Luis, J. C., Martín Pérez, R., Frias, I., Valdes Gonzalez, F., (2007). Enhanced carnosic acids levels in two rosemary accessions exposed to cold stress conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55: 8062–8066.
- Martin, J. P., Hernandez-Bermejo, J. E. (2000). Genetic variation in the endemic and endangered *Rosmarinus tomentosus* Huber-

- Morath & Maire (Labiatae) using RAPD markers. *Heredity*, vol. 85: 434-443.
- Mathenjwa, S. A., Hugo, C. J., Bothma, C., Hugo, A. (2012). Effect of alternative preservatives on the microbial quality, lipid stability and sensory evaluation of boerewors. *Meat Science*, vol. 91: 165–172.
- Mi Yoo, K., Hwan Lee, C., Lee, H., Moon, B., Yong Lee, C. (2008). Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry*, vol. 106: 929–936.
- Ming-Hsien, Y., Shung-Te, K., Che-Ming, H., Ching-Ju, L., Kuo-Hua, L., Chia-Chou, Y. (2009). Hesperidin inhibited acetaldehyde-induced matrix metalloproteinase-9 gene expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Toxicology Letters*, vol. 184: 204–210.
- Moghtader, M., Afzali, D. (2009). Study of the antimicrobial properties of the essential oils of rosemary. *American-Eurasian journal of agricultural & environmental sciences*, vol. 5 (3): 393-397.
- Moñino, M. I. (2010). Incorporación de hoja destilada de romero y tomillo en la dieta de la oveja segureña, estudio de la transmisión de antioxidantes a carne de cordero. *Tesis Doctoral*. Universidad de Murcia.
- Morales, R. (2014). En Flora Ibérica. Plantas vasculares de la península ibérica e Islas Baleares. 327-331 pp. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid. [www.floraiberica.es](http://www.floraiberica.es).
- Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C. S., Vojnov, A. A. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, vol. 40: 223-231.

- Munné-Bosch, S. (1999). Antioxidative function of tocopherols, carotenoids and abietane diterpenes against stress in Mediterranean plants. *Tesis Doctoral*. Universidad de Barcelona.
- Muñoz Centeno, L. M. (2002). Plantas medicinales españolas. *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) (romero)/ Spanish medicinal plants. *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) (rosemary). *Biblid*, vol. 21: 105-118.
- Napoli, E. M., Curcuruto, G., Ruberto, G. (2010). Screening of the essential oil composition of wild Sicilian rosemary. *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 38: 659–670.
- Navarrete, A., Herrero, M., Martín, A., Cocero, M. J., Ibáñez, E. (2011). Valorization of solid wastes from essential oil industry. *Journal of Food Engineering*, vol. 104: 196–201.
- Ntzimani, A. G., Giatrakou, V. I., Savvaidis, L. N. (2010). Combined natural antimicrobial treatments (EDTA, lysozyme, rosemary and oregano oil) on semi cooked coated chicken meat stored in vacuum packages at 4 °C: Microbiological and sensory evaluation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, vol. 11: 187–196.
- Okamura *et al.*, Nobuyuki Okamura, N., HAraguchi, H., Hashimoto, K., Yagi, A. (1994). Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. *Phytochemistry*, vol. 37(5): 1463–1466.
- Okoh, O. O., Sadimenko, A. P., Afolayan, A. J. (2010). Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent freemicrowave extraction methods. *Food Chemistry*, vol. 120: 308–312.

- Ortiz de Montellano, B. R. (1990). Aztec Medicine, Health and Nutrition. *Rutgers University Press*, New Brunswick.
- Özcan, M. M., Arslan, D. (2011). Antioxidant effect of essential oils of rosemary, clove and cinnamon on hazelnut and poppy oils. *Food Chemistry*, vol. 129: 171–174.
- Palacio Garcia-Nieto, L. (2000). Las plantas medicinales y aromáticas. Una alternativa de futuro para el desarrollo rural. *Boletín económico del ICE*, vol. 2652: 29 -40.
- Pamplona-Roger, J. D. (1999). Enciclopedia de las plantas medicinales. Biblioteca educación y salud, *Editorial Safeliz*.
- Pascual, P. M. (2000). Mercado en Alemania para plantas aromáticas, medicinales y aceites esenciales. *Oficina Económica y Comercial de España en Duseseldorf*. 17 pp.
- Pérez-Fons, L., Garzon, M., Micol, V. (2010). Relationship between the Antioxidant Capacity and Effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Polyphenols on Membrane Phospholipid Order. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58: 161–171.
- Peshev, D., Peeva, L. G., Peev, G., Baptista, I. I. R., Boam, A. T. (2011). Application of organic solvent nanofiltration for concentration of antioxidant extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Chemical Engineering Research and Design*, vol. 89: 318–327.
- Piskernik, S., Klancnik, A., Riedel, C. T., Brøndsted, L., Mozina, S. S. (2011). Reduction of *Campylobacter jejuni* by natural antimicrobials in chicken meat-related conditions. *Food Control*, vol. 22: 718–724.
- Pradeep, K., Park, S. H., Ko, K. C. (2008). Hesperidin a flavanoglycone protects against  $\gamma$ -irradiation induced

- hepatocellular damage and oxidative stress in Sprague–Dawley rats. *European Journal of Pharmacology*, vol. 587: 273–280.
- Prince Vijeya Singha, J. S., Selvendirana, K., Mumtaz Banua, S., Padmavathia, R., Sakthisekaran, D. (2004). Protective role of Apigenin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against hepatocarcinogenesis in Wistar albino rats. *Phytomedicine*, vol. 11 (4): 309–314.
- Raiciu, A., Mihele, D., Ionita, C. (2010). Antimicrobial activity of *Ribes nigrum*, *Rosmarinus officinalis*, *Betula pubescens*, *Salix alba*, *Vaccinium myrtillus* gemoderivatives. *Farmacia*, vol. 58: 735–748.
- Ramírez, P., Garcia-Risco, M. R., Santoyo, S., Señorans, F. J., Ibañez, E., Reglero, G. (2006). Isolation of functional ingredients from rosemary by preparative-supercritical fluid chromatography (Prep-SFC). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 41: 1606–1613.
- Rasheed, M. U., Thajuddin, N. (2011). Effect of medicinal plants on *Moraxella catarhalis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, vol. 4(2): 133-136.
- Rivas-Martínez, S. (2004). Global Bioclimatics (Clasificación Bioclimatica de la Tierra). <http://www.globalbioclimatics.org>.
- Rizlner Hras, A., Hadolin, M., Knez, E., a, Bauman, D. (2000). Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with  $\alpha$ -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry*, vol. 71: 229-233.
- Rodríguez-Rojo, S., A. Visentin, A., Maestri, D., Cocero, M. J. (2012). Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *Journal of Food Engineering*, vol. 109: 98–103.



- Roldán, L. P., Díaz, G. J., Durringer, J. M. (2010). Composition and antibacterial activity of essential oils obtained from plants of the Lamiaceae family against pathogenic and beneficial bacteria. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, vol. 23(4): 451-461.
- Romano, C. S., Abadi, K., Repetto, V., Vojnov, A. A., Moreno, S. (2009). Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. *Food Chemistry*, vol. 115: 456–461.
- Rozman, T., Jersek, B. (2009). Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. *Acta agriculturae Slovenica*, vol. 93: 51 – 58.
- Ruberto, G., Barata, M. T. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model system. *Food Chemistry*, vol. 69: 167-174.
- Salido, S., Altarejos, J., Nogueras, M., Sánchez, A., Luque, P. (2003). Chemical Composition and Seasonal Variations of Rosemary Oil from Southern Spain. *Journal of Essential Oil Research*, vol. 15(1): 10-14.
- Sánchez Gómez, P., Guerra Montes, J. (2011). Nueva flora de Murcia, Plantas vasculares. *Diego Marin, Pedro Sanchez gómez y Juan gerra Montes*.
- Sánchez-Monge. (1980). Diccionario de Plantas Agrícolas. *Ministerio de Agricultura. Madrid*. 468 pp.
- Sasaki, K., El Omri, A., Kondo, S., Han, J., Isoda, H. (2013). *Rosmarinus officinalis* polyphenols produce anti-depressant like effect through monoaminergic and cholinergic functions modulation. *Behavioural Brain Research*, vol. 238: 86–94.

- Shukla, S., Gupta, S. (2010). Apigenin and Cancer Chemoprevention. *Bioactive Foods in Promoting Health: Fruits and Vegetables*, vol. 41: 663-689.
- Singh, M., Guleria, N. (2013). Influence of harvesting stage and inorganic and organic fertilizers on yield and oil composition of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in a semi-arid tropical climate. *Industrial Crops and Products*, vol. 42: 37– 40.
- Slamenová, D., Horváthová, E., Kováčiková, Z., Katarína Kozics, K., Hunáková, L. (2011). Essential rosemary oil protects testicular cells against DNA-damaging effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and DMNQ. *Food Chemistry*, vol. 129: 64–70.
- Somolinos, M., García, D., Condón, S., Mackey, B., Pagán, R. (2009). Inactivation of *Escherichia coli* by citral. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 108: 1928–1939.
- Soria, A. C., Esteban, J., Morales, R., Martín-Álvarez, P. J., Sanz, J. (2008). Validación estadística de la presencia en plantas de quimiotipos caracterizados por la concentración de componentes volátiles obtenida mediante GC-MS. *Botanica Complutensis*, vol. 32: 225-236.
- Sotomayor, J. A. (1998). Estudio sobre Plantas Aromáticas de los géneros *Salvia* y *Thymus*, espontáneas en el SE Ibérico, para su establecimiento como cultivo. *Tesis Doctoral*. Universidad de Murcia.
- Sotomayor, J. A., Berná, J., Alcaraz, M. J., García-Moya, A. J., Correal, E. (2001). Rendimientos en hoja y aceite esencial de tres especies de tomillo cultivadas en regadío. Actas de Horticultura. IV Congreso Ibérico de Ciencias Hortícolas. Tomo IV: 2084-2089. ISBN: 84-8107-0424.

- Sotomayor Martínez (2011). Estudio de la influencia de la época de recolección sobre el rendimiento en aceite esencial, y la actividad antioxidante, en dos clones de romero (*Rosmarinus officinalis* L.). Trabajo fin de carrera, Universidad Miguel Hernández.
- Souza, L. C., de Gomes, M. G, Goes, A. T. R., Del Fabbro, L., Filho, C. B., Boeira, S. P.,. Jesse, C. R. (2012). Evidence for the involvement of the serotonergic 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the 2 antidepressant-like effect caused by hesperidin in mice Q13. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, vol. 40: 103–109.
- Soylu, E. M., Kurt, S., Soylu, S. (2010). In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 143: 183–189.
- Stockwell, C. (1988). Nature's pharmacy. Century, London United Kingdom.
- Stuart, M. (1981): Enciclopedia de Hierbas y Herboristería. *Ediciones Omega*, S.A. Barcelona.
- Tai, J., Cheung, S., Wu, M., Hasman, D. (2012). Antiproliferation effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells in vitro. *Phytomedicine*, vol. 19 436– 443.
- Tavassoli, S. K., Mousavi, S. M., Emam-Djomeh, Z., Razavi, S. H. (2011). Chemical composition and evaluation of antimicrobial properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil. *African Journal of Biotechnology*, vol. 10(63): 13895-13899.
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Saraiva, J. A., Nunes, M. L. (2013). Chemical composition

- and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, vol. 43: 587–595.
- Terpinc, P., Bezjak, M., Abramovic, H. (2009). A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. *Food Chemistry*, vol. 115: 740–744.
- Tewari, R., Virmani, O. P. (1987), Chemistry of Rosemary Oil: A Review. Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, vol. 9: 185-197.
- Thomson, W. A. R. (1978). Medicines from the Earth. *McGraw-Hill Book Co*, Maidenhead, United Kingdom.
- Thorsen, A., Hildebrandt, K. S. (2003). Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary Extracts Aspects of accurate quantification. *Journal of Chromatography A*, vol. 995: 119–125.
- Tigrine-Kordjani, N., Chemat, F., Meklati, B. Y., Tuduri, L., Giraudel, J. L., Montury, M. (2007). Relative characterization of rosemary samples according to their geographical origins using microwave-accelerated distillation, solid-phase microextraction and Kohonen self-organizing maps. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 389: 631–641.
- Tornuk, F., Cankurt, H., Ozturk, I., Sagdic, O., Bayram, O., Yetim, H. (2011). Efficacy of various plant hydrosols as natural food sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium on fresh cut carrots and apples. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 148: 30–35.
- Tounekti, T., Hernández, I., Müller, M., Khemira, H., Munné-Bosch, S. (2011). Kinetin applications alleviate salt stress and improve the antioxidant composition of leaf extracts in *Salvia*

- officinalis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 49: 1165-1176.
- Ulubelen, A., Topcu, G., Eris, C., Sonmez, U., Kartal, M., Kurucu, S., Bozok-Johansson, C. (1994). Terpenoids from *Salvia sclarea*. *Phytochemistry*, vol. 36: 971–974.
- Varela, F., Navarrete, P., Cristobal, R., Fanlo, M., Melero, R., Sotomayor, J.A., Jordán, M.J., Cabot, P., Sánchez de Ron, D., Calvo, R., Cases, A. (2009). Variability in the chemical composition of wild *Rosmarinus officinalis* L. *Acta Horticulturae*, vol. 826: 167–174.
- Vegara, S., Funes, L., Martí, N., Saura, D., Micol, V., Valero, M. (2011). Bactericidal activities against pathogenic bacteria by selected constituents of plant extracts in carrot broth. *Food Chemistry*, vol. 128: 872–877.
- Villiera, E. (2002). Diccionarios amuletos y supersticiones. *Editorial Obelisco*.
- Visentin, A., Rodríguez-Rojo, S., Navarrete, A., Maestri, D., Cocero, M. J. (2012). Precipitation and encapsulation of rosemary antioxidants by supercritical antisolvent process. *Journal of Food Engineering*, vol. 109: 9–15.
- Weerakkody, N. S., Caffin, N., Lambert, L. K., Turnera, M. S., Dykesc, G. A. (2010). Synergistic antimicrobial activity of galangal (*Alpinia galanga*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and lemon iron bark (*Eucalyptus staigerana*) extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 91: 461–468.
- Wellwood, C. R. L., Cole, R. A. (2004). Relevance of carnosic acid concentrations to the selection of rosemary, *Rosmarinus officinalis* (L.), accessions for optimization of antioxidant yield.

- Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, 6101–6107.
- Wu, Y., Huang, J., Zuo, A., Yao, L. (2011). Research on the Effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) on the Blood Lipids and Anti-lipid Peroxidation in Rats. *Journal of Essential Oil Research*, vol. 23: 26-34.
- Yang, H. L., Chen, S. C., Kumar, K. J. S., Yu, K. N., Chao, D. L., Tsai, S. Y. (2012). Antioxidant and 645 anti-inflammatory potential of hesperetin metabolites obtained from Hesperitin-646 administered rat serum: an ex vivo approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60: 522–532.
- Yang, S. Y., Hong, C. O., Lee, G. P., Kim, C. T., Lee, W. W. (2013). The hepatoprotection of caffeic acid and rosmarinic acid, major compounds of *Perilla frutescens*, against t-BHP-induced oxidative liver damage. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 55: 92–99.
- Yeh, M. H., Kao, S. T., Hung, C. M., Liu, C. J., Lee, K. H., Yeh, C. C. (2009). Hesperidin inhibited acetaldehyde-induced matrix metalloproteinase-9 gene expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Toxicology Letters*, vol. 184: 204–210.
- Zegura, B., Dobnik, D., Niderl, M. H., Filipi, M. (2011). Antioxidant and antigenotoxic effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts in *Salmonella* Typhimurium TA98 and HepG2 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 32: 296–305.
- Zaouali, Y., Bouzaine, T., Boussaid, M. (2010). Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48: 3144–3152.

- Zaouali, Y., Chograni, H., Trimech, R., Boussaid, M. (2012). Genetic diversity and population structure among *Rosmarinus officinalis* L.(Lamiaceae) varieties: *var. typicus Batt.* and *var. troglodytorum Maire.* based on multiple traits. *Industrial Crops and Products*, vol. 38: 166– 176.
- Zaouali, Y., Chograni, H., Trimech, R., Boussaid, M., (2013). Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. *var. typicus Batt.* organs during growth and incidence on the antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, vol. 43: 412– 419.
- Zoubiri, S., Baaliouamer, A. (2011). Chemical composition and insecticidal properties of some aromatic herbs essential oils from Algeria. *Food Chemistry*, vol. 129: 179–182.

## BIBLIOGRAFÍA



## VIII. APORTACIÓN CIENTÍFICA



1. Jordán, M.J.\*, Lax, V., Rota, M.C., Lorán, S., Sotomayor J.A. (2013). **Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L.**

Food Control 30: 463-468.

Elsevier SCI LTD, England.

*Índice de impacto*: 2.738.

*Área JCR* (Food Science & Technology).

**Q1: 18/124**

**Contribución específica:** Realización de los experimentos y co-redacción del artículo.

En este artículo se han estudiado de forma individual aceites de romero procedentes de cinco áreas biogeográficas diferentes en la Región de Murcia. Según los datos obtenidos el incremento en el rendimiento del mismo se podría atribuir a la influencia de los factores medioambientales en los que se desarrollan estas plantas. Tras el estudio de todos los aceites, se determinó que los componentes principales son “1,8- cineol; alcanfor, y  $\alpha$ -pineno”, los

cuales se clasificaron en cinco quimiotipos distintos en función de su abundancia relativa. Como conclusión más relavante destaca el hecho de que el quimiotipo definido no sigue un patrón de distribución en función del área bioclimática estudiada. En el estudio de la actividad antimicrobiana se detectaron diferentes sensibilidades de las bacterias testadas frente a los determinados órdenes de abundancia relativa entre los componentes principales en los aceites esenciales de romero.

2. Jordán, M.J.\*, **Lax, V.**, Rota, M.C., Lorán, S., Sotomayor J.A. (2013). **Influence of the bioclimatic area on the polyphenolic composition, and the antioxidant and bacteriostatic activities of *Rosmarinus officinalis* L.**

Natural Products Communications 8(6): 817-822.

Natural Products INC, United States.

*Índice de impacto*: 0.956.

Área JCR (Food Science & Technology).

Q2: **69/124**

**Contribución específica:** Realización de los experimentos y co-redacción del artículo.

El estudio individual de los perfiles polifenólicos de las plantas de romero en la Región de Murcia, pone de manifiesto que los principales componentes químicos en estas plantas son “ácido carnósico, carnosol, ácido rosmarínico y hesperidina”, siendo los factores genéticos quienes determinan la abundancia de los mismos en las plantas de romero, ya que no se ha encontrado una relación significativa entre las abundancias de cada componente y el área bioclimática estudiada.

Por otro lado, el estudio de la actividad antioxidante y antimicrobiana manifiesta variaciones en los pisos bioclimáticos estudiados, que parecen estar en relación a la abundancia de estos compuestos polifenólicos mayoritarios y a la relación de concentración existente entre ellos.

3. Jordán, M.J.\*, Lax, V., Rota, M.C., Lorán, S., Sotomayor J.A. (2012). **Relevance of carnosic acid, carnosol and rosmarinic acid concentrations in the *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of *Rosmarinus officinalis* (L.) methanolic extracts.**

Journal of Agricultural and Food Chemistry 60(38): 9603-9608.

Amer Chemical Soc. United States

*Índice de impacto*: 2.906.

Área JCR (Food Science & Technology).

Q1: **15/124**

**Contribución específica:** Realización de los experimentos y co-redacción del artículo.

La importancia de esta aportación científica radica en el estudio a nivel individual de extractos polifenólicos de plantas de romero cuya composición química es similar, pero la relación de abundancia entre dos de sus componentes mayoritarios (ácido carnósico y carnosol) es dispar. De esta forma se han seleccionado las plantas cuyas abundancias de ácido carnósico y carnosol comprenden los valores “40:60; 60:40 y 50:50” respectivamente.

Únicamente se encontraron diferencias significativas en la actividad antioxidante al estudiar los grupos “50:50”, donde se pone de manifiesto

que la presencia de ácido rosmarínico afecta de forma directamente proporcional a la actividad antioxidante. Al estudiar la capacidad antimicrobiana se pudo apreciar la mayor sensibilidad de las bacterias Gram positivas frente a las Gram negativas. Por otro lado, la presencia de carnosol en mayor concentración que su precursor ácido carnósico favorece significativamente la capacidad bacteriostática de los extractos de romero frente a *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.

4. Jordán, M.J.\*, Lax, V., Rota, M.C., Lorán, S., Sotomayor J.A. (2013). **Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L essential oil and its polyphenolic extract.**

Industrial Crops and Products 48: 144-152.

Elsevier Science Bv, Amsterdam, Netherlands.

*Índice de impacto*: 2.468.

Área JCR (Agronomy).

Q1: **12/78**

**Contribución específica:** Realización de los experimentos y co-redacción del artículo.

Dada la controversia existente en la bibliografía científica acerca del estadio fenológico (floración/fructificación) más adecuado para la recolección del romero, en el presente artículo se describe la composición química y actividades biológicas (capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana) de los aceites esenciales y los extractos polifenólicos de plantas individuales de romero ubicadas en dos pisos bioclimáticos extremos (termo mediterráneo inferior y supra mediterráneo) y recolectadas en los estadios fenológicos anteriormente citados.

Se concluye que la etapa de fructificación induce un incremento en la síntesis de aceite esencial por parte de la planta, hecho que va acompañado de una variación en las calidades de los aceites rendidos. Esta variación en la composición química de los aceites está estrechamente relacionada con su actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas y negativas. Así mismo, en este estadio fenológico también se producen variaciones significativas en la composición química de los extractos polifenólicos, que van a influir en las capacidades antioxidantes de sus extractos, siendo considerados como principales responsables las variaciones existentes en los compuestos “ácido rosmarínico, hesperidina y carnosol”.





## **IX. PUBLICACIONES**



## Artículo I

**“Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L.”.**

*Maria J, Jordán; Vanesa Lax; Maria C, Rota; Susana Lorán; José A, Sotomayor.*

***Food Control, Vol. 30 (2013) 463-468***



REVISTA: Food Control

DIRECCION: [www.elsevier.com/locate/foodcont](http://www.elsevier.com/locate/foodcont)

ABSTRACT:

The essential oil yield, volatile profile and antimicrobial activity of individual *Rosmarinus officinalis* L. shrubs growing wild in the different bioclimatic areas of the province of Murcia (Spain) were studied. A low thermicity index favoured the production of essential oil; however, no differentiation related to a specific chemotype depended on the geographical origin.

In individual plants, the effect of the order of abundance among the components that define the rosemary essential oil chemotype (eucalyptol, camphor,  $\alpha$ -pinene), on the antimicrobial activity was also determined. All the chemotypes showed strong antibacterial activity against four food-borne pathogens.

Determination of the diameter of inhibition in *Salmonella typhimurium* pointed to a positive contribution effect of eucalyptol and  $\alpha$ -pinene. A high proportion of  $\alpha$ -pinene increases the effectiveness of the oil against *Staphylococcus aureus*, while the presence of eucalyptol, as the most abundant compound, considerably decreases the efficiency of rosemary oil. In contrast, the efficacy of these oils against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* was not affected by this condition.

As regards the minimum inhibitory (MIC) and bactericide (MBC) concentrations, the strong activities exhibited by these essential oils (<0.5  $\mu$ L/mL) did not allow the chemotypes and antibacterial activities to be differentiated.



## Artículo II

**“Influence of the Bioclimatic Area on the Polyphenolic  
Composition, and Antioxidant and Bacteriostatic  
Activities of *Rosmarinus officinalis* L.”.**

*Maria J, Jordán; Vanesa Lax; Maria C, Rota; Susana  
Lorán; José A, Sotomayor.*

***Natural Product Communications, Vol. 8 (6) (2013)***

**817-822**

## PUBLICACIONES



REVISTA: Natural Product Communications

DIRECCION: [www.naturalproduct.us](http://www.naturalproduct.us)

## ABSTRACT

The effect of the ecological traits of the different bioclimatic areas of the province of Murcia on the chemical variability and antioxidant and bacteriostatic activities of individual rosemary extracts was studied. The main findings confirmed that a high thermicity index, favors both the methanolic extracts yielded by these shrubs and their biological activities. However, differences in their polyphenolic composition should be attributed to the genetic heritage of these plants rather than to the bioclimatic conditions in which they grow. As regards the relationship between the chemical composition of these extracts and their biological activities, it was noted that a high phenolic acid content, especially of rosmarinic acid, may increase the antioxidant activity exhibited by extracts containing high levels of carnosic acid. The bacteriostatic activity was higher ( $p < 0.05$ ) in those extracts in which carnosic acid was the major component quantified.

## PUBLICACIONES

## Artículo III

**“Relevance of Carnosic Acid, Carnosol, and  
Rosmarinic Acid Concentrations in the in Vitro  
Antioxidant and Antimicrobial Activities of Rosmarinus  
officinalis (L.) Methanolic Extracts”.**

*Maria J, Jordán; Vanesa Lax; Maria C, Rota; Susana  
Lorán; José A, Sotomayor.*

***Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 60  
(2012) 9603–9608***



REVISTA: Journal of Agricultural and Food Chemistry

DIRECCION: <http://pubs.acs.org/journal/jafcau>

## ABSTRACT

The importance of the diterpenic and rosmarinic acid content in the biological activities of rosemary extracts has been studied previously, but how the relationship between the concentration of these components affects their antioxidant and antibacterial activities has received little attention. Accordingly, from a total of 150 plants, 27 methanolic extracts were selected, for their similar diterpene contents but different ratios between carnosic acid and carnosol concentrations. In extracts with similar rosmarinic acid contents but differing proportions between carnosic acid and carnosol, the two diterpenes were seen to equally affect the *in vitro* antioxidant activity; however, and related with the antibacterial efficiency, this biological activity improved when carnosol was the major diterpene component.



## Artículo IV

**“Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils and its polyphenolic extract”.**

*Maria J, Jordán; Vanesa Lax; Maria C, Rota; Susana Lorán; José A, Sotomayor.*

***Industrial Crops and Products, Vol. 48 (2013) 144–152***





REVISTA: Industrial Crops and Products

DIRECCION: [www.elsevier.com/locate/indcrop](http://www.elsevier.com/locate/indcrop)

## ABSTRACT

Individual *Rosmarinus officinalis* plants from two extremes of the growing areas of the province of Murcia (southeastern Spain) were collected at the full bloom and fruit maturation phenological stages. It is known that the quantitative chemical composition of plants and consequently their biological activities vary throughout the vegetative cycle. Nevertheless, it has not been clear until now, in which of the two vegetative stages mentioned above, rosemary plants should be harvested in order to obtain maximum benefits. The results obtained from both bioclimatic areas revealed that the essential oils and the polyphenolic extracts from plants harvested at the fruit maturation phase provide better antimicrobial and antioxidant activities than those collected at the full bloom stage. These improvements could be explained by higher concentrations of  $\gamma$  terpinene,  $\alpha$ -terpinene, terpinolene and caryophyllene oxide determined in the essential oils and of rosmarinic acid, hesperidin, and carnosol in the polyphenolic extracts

## PUBLICACIONES

## **X. ANEXO I**



## OTRAS PUBLICACIONES

### 1. VOLÚMENES COLECTIVOS (REVISADOS POR PARES)

- a) Jordán, M.J\*., Aouissat, M., Lax, V., Martínez, C., Ghali, M., Fares, S., Sotomayor, J.A. (2011). Chemical variability of wild *Rosmarinus officinalis* L. from Algeria. Acta Horticulturae 925: 103-108. ISHS. Á. Máthé, Barata, A.M., Carlen, C. Bélgica. ISBN: 978-90-6605-644-2.
- b) Jordán, M.J\*., Lax, V., Martínez, C., Aouissat, M., Sotomayor, J.A. (2011). Chemical intraspecific variability and chemotype determination of *Rosmarinus officinalis* L. in the Region of Murcia. Acta Horticulturae 925: 109-114. ISHS. Á. Máthé, Barata, A.M., Carlen, C. Bélgica. ISBN: 978-90-6605-644-2.
- c) Jordán M.J\*., Martínez C., Moñino, I., Lax, V., Quílez, M., Sotomayor J.A. (2009). Chemical characterization of *Salvia lavandulifolia* subsp. *velerea* in Murcia (Spain). Acta Horticulturae 826: 317-323. ISHS. Turgut, K., Ônus A.N., Mathe, A. Bélgica ISBN: 978-90-6605-468-4.
- d) Sotomayor, J.A., Martínez, C., Moñino, I., Lax, V., Quílez, M., Jordán M.J. (2009). Effect of altitude on *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in Murcia (Spain). Acta Horticulturae 826: 309-316. ISHS. Turgut, K., Ônus A.N., Mathe, A. Bélgica ISBN: 978-90-6605-468-4.

## 2. COMUNICACIONES CIENTÍFICAS

### Internacionales

- a) Jordán, M.J., Lax, V., Martínez, C., Aouissat, M., Sotomayor, J.A. (2010). Chemical intraspecific variability and chemotypes determination of *Rosmarinus officinalis* L. in the Region of Murcia. 28<sup>th</sup> International Horticultural Congress. Lisboa (Portugal). Acta Horticulturae 925:109-114. ISSN: 0567-7572.
- b) Jordán, M.J., Aouissat, M., Lax, V., Martínez, C., Sotomayor, J.A. (2010). Chemical variability of wild *Rosmarinus officinalis* L. from Algeria 28<sup>th</sup> International Horticultural Congress. Lisboa (Portugal). Acta Horticulturae: 925:103-108. ISSN: 0567-7572.
- c) Jordán, M.J., Lax, V., Sotomayor J.A. (2008). Seasonal variation of *Salvia lavandulifolia* subsp. *lavandulifolia* essential oil yield and composition. 39<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils. ISEO. Quedlinburg (Alemania). Libro de Resúmenes. Página 161.
- d) Herraiz D., Usano-Alemaní J., Cuadrado, J., Lax, V., Jordán, M.J., Sotomayor J.A., Palá-Paúl J. (2008). Exploration of wild populations of *Salvia lavandulifolia* Vahl. from Castilla-La Mancha province (Spain): compilation, chemical composition and storage of the seeds. 39<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils. ISEO. Quedlinburg (Alemania). Libro de Resúmenes. Página 161.
- e) Lax, V., Jordán, M.J., Martínez, C., Moñino, M.I., Martínez, R.M., Sotomayor, J.A. (2007). Chemical variability and radical scavenging activity of *Thymus hyemalis* L. essential oil

cultivated at the Region of Murcia (Spain). 38<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils. Graz (Austria). Libro de Resúmenes.

- f) Jordán M.J., Martínez C., Moñino, I., Lax, V., Quílez, M., Sotomayor J.A. (2007). Chemical characterization of *Salvia lavandulifolia* subsp. *velerea* in Murcia (Spain). I International Medicinal and Aromatic Plants Conference on Culinary Herbs. Antalya (Turquia). Acta Horticulturae 826: ISHS: 317-323
- g) Sotomayor, J.A., Martínez, C., Moñino, I, Lax, V., Quílez, M., Jordán M.J. (2007). Effect of altitude on *Rosmarinus officinalis* essential oil in Murcia (Spain). I International Medicinal and Aromatic Plants Conference on Culinary Herbs. Antalya (Turquia). Acta Horticulturae 826: ISHS: 309-316.

## Nacionales

- a) Moñino, M.I., Martínez, C., Sotomayor, J.A., Lafuente, A., Lax, V., de Haro, M.P Gamaza, A.M., Jordán, M.J. (2008). Estabilidad oxidativa de la carne de cordero segureño alimentado con hoja destilada de tomillo . II Congreso Internacional de Seguridad Alimentaria. Murcia.
- b) Martínez, C., Moñino, M.I., Jordán, M.J., Lafuente, A., De Haro, M.P., Lax, V Quílez, M., Sotomayor, J.A. (2008). Incorporación de subproductos de romero a la dieta de cabra Murciano-Granadina. Una vía para la obtención de leche con valor añadido. II Congreso Internacional de Seguridad Alimentaria. Murcia.

