



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

**Memoria del Trabajo de Fin de Grado**

**Efectos de los compuestos activos y funcionales  
del romero (*Rosmarinus officinalis*) en el control  
del peso corporal y del metabolismo energético**

Jorge Ricardo Soliz Rueda

**Grado de Bioquímica**

Año académico 2014-15

DNI del alumno: Y0021670H

Trabajo tutelado por el Dr. Joan Ribot Riutort  
Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud

Se autoriza la Universidad a incluir mi trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación

Palabras clave del trabajo:

*Rosmarinus officinalis*, Carnosic Acid, energy metabolism, body fat, adipocytes.



## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	5
1.1. ¿Qué es el romero?	5
1.2. Cultivo y producción del romero	5
1.3. Propiedades atribuidas al romero	6
1.4. Historia y usos tradicionales	6
<b>2. OBJETIVOS</b>	7
2.1. Trabajo bibliográfico	7
2.2. Trabajo experimental	8
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS (trabajo bibliográfica)</b>	8
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN (trabajo bibliográfica)</b>	8
4.1. Composición química del romero	9
4.1.1. Terpenos	10
4.1.2. Compuestos fenólicos	12
4.1.3. Preparaciones de romero	13
4.1.3.1. Aceite esencial de romero	13
4.1.3.2. Alcohol de romero	14
4.1.4. Compuestos puros más destacados	15
4.1.4.1. Ácido carnósico	15
4.1.4.2. Ácido rosmarínico	17
4.2. Propiedades demostradas	18
4.3. Efectos negativos del romero. ¿Toxicidad?	20
<b>5. OBJETIVO CONCRETO Y BACKGROUND</b>	21
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS (trabajo experimental)</b>	21
6.1. Células 3T3-L1 y cultivo celular	21
6.2. Diferenciación celular	21
6.3. Tratamiento	21
6.4. Extracción del ARN	22
6.5. Transcripción reversa y PCR a tiempo real	22
6.6. Análisis estadístico	23
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN (trabajo experimental)</b>	23
7.1. El ácido carnósico induce adipogénesis/lipogénesis	23
7.2. El ácido carnósico induce algunos genes relacionados con el proceso de marronización en adipocitos maduros	24
<b>8. CONCLUSIÓN GENERAL</b>	24
<b>9. AGRADECIMIENTOS</b>	26
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>	27

## ABSTRACT

The Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) is very a common aromatic plant that grows in Mediterranean shores. Nevertheless, nowadays this Mediterranean native plant can be grown in several places in the world, because of its low nutritional requirements. From ancient times, the rosemary has been considered to have many beneficial health properties, some of them have been studied and demonstrated. For this reason, this plant has been widely used in different fields, as well as medicine, religion and even in the kitchen.

Rosemary is composed by terpenes and phenolic compounds, two main families of bioactive compounds that include a huge number of phytochemicals. These wide variety of bioactive compounds may be responsible of some of the beneficial properties seen, studied and demonstrated of rosemary. The aim of the first part of this project is consists on carrying out an in-depth bibliographic research about the current study aimed to show rosemary's health properties.

For the second part of the project an experiment study will be proposed and carried out to show the effect of carnolic acid in mouse adipocytes. To run the experiment 3T3-L1 cell line was used. Briefly, cells were induced to differentiation, from pre-adipocytes to mature adipocytes, during 7 days of cell culture. Once differentiation was confirmed, adipocytes were treated during 24 h with carnolic acid at different doses: 0.1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$ . Results showed that carnolic acid had differential effect depending on the differentiation status. Particularly, in mature adipocytes major adiposity was observed, as well as  $\beta$ -oxidation of fatty acids and browning.

## RESUMEN

El romero (*Rosmarinus officinalis*) es una planta aromática común en las costas del Mediterráneo pero que se ha conseguido cultivar en casi todo el mundo gracias a sus bajas exigencias de cultivo. Debido a su uso desde la antigüedad en los campos de la medicina, cocina, religión, etc. al romero se le han atribuido una gran cantidad de propiedades curativas, algunas de ellas se han podido estudiar y demostrar.

El romero está compuesto principalmente por terpenos y compuestos fenólicos, entre estas familias químicas se han encontrado una gran cantidad de fitoquímicos que pueden explicar algunas de las propiedades otorgadas a lo largo de los años a esta planta aromática. Concretamente se pueden destacar el ácido rosmarínico y el ácido carnólico, siendo los componentes más abundantes y de mayor estudio del romero. El objetivo de la primera parte de este trabajo es conocer el estado actual del estudio y de la investigación del romero y de sus propiedades demostradas sobre la salud.

Para finalizar el trabajo, se propondrá y se realizará un trabajo experimental donde se pretende demostrar el efecto del ácido carnólico sobre adipocitos maduros de ratón. Para llevarlo a cabo, se utilizó la línea celular 3T3-L1. Estas células se indujeron a la diferenciación, de preadipocitos a adipocitos maduros, durante 7 días. Una vez diferenciadas se trataron durante 24 horas con ácido carnólico a diferentes concentraciones: 0.1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ . Los resultados obtenidos demostraron que tras la diferenciación el ácido carnólico no tiene el mismo efecto que se ha observado cuando el tratamiento se realiza en preadipocitos, sino que hay un aumento de la adiposidad y de forma paralela una inducción a la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y al proceso de marronización.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 ¿Qué es el romero?

El romero (*Rosmarinus officinalis* L.) es una planta aromática que mide entre 50 y 150 cm de altura, frondoso, muy ramificado y de hoja perenne<sup>1,2</sup>. Las hojas del romero permanecen verdes todo el año, sus flores son azuladas o blanquecinas y crecen en todas las estaciones del año, menos en los meses más secos del verano<sup>3</sup>. Las hojas desprenden un fuerte olor y sabor aromático aunque áspero y algo picante<sup>1,4</sup>.

El nombre *Rosmarinus* proviene del latín, de las palabras “ros” y “marinos”, significa “roció de mar”. Esto es debido a que crece de forma silvestre en las zonas cercanas a las costas del Mediterráneo, siendo común en toda la cuenca del Mediterráneo, además se ha cultivado en Inglaterra, Alemania, Francia, Dinamarca, Estados Unidos, México, Centroamérica, Venezuela y Filipinas y, probablemente, es una planta nativa de Irán, antigua Persia<sup>2,4,5</sup>. Hay científicos que interpretan el nombre del romero de otra forma, así *ros* vendría de la palabra griega “*rhops*” que significa arbusto, y *marinus* vendría de “*myrinos*” que significa aromático, significando “arbusto aromático”<sup>6</sup>.

Este arbusto pertenece a la familia de las labiadas (Lamiaceae), que comprende alrededor de 245 géneros y más de 3000 especies diferentes, son mayoritariamente arbustos, hierbas o plantas de poco porte. Estas plantas vivaces y muy aromáticas, las podemos encontrar principalmente en zonas cálidas, como el Mediterráneo, donde encontramos un gran número de labiadas<sup>6-8</sup>.



Figura 1. Aspecto del *Rosmarinus officinalis* (romero). En la figura se puede observar la planta del romero y las flores que produce.

### 1.2 Cultivo y producción del romero

Para el cultivo del romero se recomienda un clima frío o templado, entre 19° y 25°C, o de montaña. Respecto al suelo, el romero no es muy exigente, se adapta fácilmente a cualquier tipo de superficie, creciendo en suelos ligeros, permeables, arenosos, arcillosos, calcáreos y laderas de montaña áridas (soleadas). Sin embargo crece mejor en suelos arenosos. Para tener un buen rendimiento, la profundidad del suelo debe ser entre 1 m y 1,5 m, con un sistema de drenaje adecuado, ya que la planta no aguanta el encharcamiento. En cuanto a los requerimientos de luminosidad y humedad, la planta necesita mucha luz y una humedad relativa no muy alta, entre 10% y 60%, por lo que se recomienda cultivarla en campo abierto<sup>9,10</sup>.

La propagación de la planta de romero se puede llevar a cabo mediante dos métodos: la siembra por semilla o por esquejes. La siembra por semillas es más compleja y requiere más tiempo, mientras que la siembra por esquejes es más sencilla y suele ser el método llevado a cabo en la industria. En este último método, la reproducción es asexual y como resultado da una plantación uniforme del romero. Para llevarlo a cabo, se tiene que seleccionar la planta que se desea propagar. Una vez seleccionada se corta una rama de la planta de unos 20 cm de longitud, de estos 20 cm a los 10 cm inferiores se les arranca las hojas del tallo para enterrarlo con las hojas verdes de la parte superior del tallo hacia la luz del sol. La tierra tiene que ser humedecida previamente para realizar la siembra y se debe realizar de otoño a primavera. La recolección se realiza unos 2 a 3 años después de la plantación y cuando la planta se encuentra en el comienzo de la floración. La plantación se debe renovar cada 6-8 años o cuando se vea que la producción se reduce considerablemente<sup>9,10</sup>.

Hoy en día, el cultivo a nivel comercial de romero se lleva a cabo para su uso como condimento y aromatizante de comidas, para obtener estimulantes y tónicos medicinales, y su aceite esencial, para perfumería, y para otros usos industriales. En cuanto a producción, los países en los que se cultiva mayor cantidad de romero son España, Marruecos y Túnez<sup>1</sup>.

### 1.3 Propiedades atribuidas al romero

Las propiedades que se le atribuyen al romero son debido a la gran extensión que ha tenido su uso a lo largo del tiempo y de las distintas culturas. Algunas de estas propiedades que se dice que tiene el romero pueden deberse a su composición química. Hay propiedades que han podido ser demostradas gracias al creciente interés de la planta en investigación. Más adelante trataremos detenidamente las propiedades demostradas del romero.

### 1.4 Historia y usos tradicionales

Gracias a la experimentación con la planta a lo largo de miles de años, y comprobar que en muchos casos el romero tenía resultados favorables, la planta empezó a ser muy utilizada en gran parte de la historia de la humanidad para distintos objetivos, desde ritos mágicos, religiosos, medicinales y hasta culinarios, motivo por lo cual el romero hoy en día levanta un gran interés entre los investigadores<sup>1</sup>. En esta parte del trabajo repasaremos los usos tradicionales del romero a lo largo de la historia.

El romero se utiliza desde la antigüedad en multitud de ámbitos, así por ejemplo, en Egipto los faraones ordenaban colocar sobre su tumba un ramillete de romero para perfumar su viaje al país de los muertos. Los romanos y los griegos lo consideraban un símbolo de la regeneración y Carlomagno la incluyó en la lista de las 73 plantas de obligatorio cultivo en los jardines de los monasterios de Roma. Los musulmanes lo tenían en sus jardines y creían que combatía las plagas<sup>1,5</sup>.

El primero en aislar la esencia de romero en disolución alcohólica fue Arnau de Vilanova en 1300. En esa época se creía en Europa que el romero podía curar múltiples males además de combatir plagas, anular el efecto de los venenos, aumentar el crecimiento del cabello e incluso disminuir el peso. Se han encontrado libros donde se dan instrucciones precisas de cómo elaborar un ungüento a partir del romero con el fin de utilizarlo como medicina<sup>5,6</sup>.

Más adelante, en el siglo XVI se empieza a elaborar la famosa agua de la reina de Hungría, para obtenerlo se destilaba con alcohol las partes floridas del romero, al que se le atribuía muchas propiedades cosméticas además de dar la "eterna juventud", ya que mantenía la piel joven<sup>5,6</sup>. El romero también pasó a formar parte de muchas preparaciones medicinales, algunos ejemplos son: el Fomento contra contusiones y dislocaciones, el Bálsamo de romero, Aceite antirreumático del Fraile, Vino de ajenjos por fermentación, etc<sup>6</sup>.

El romero se conocía como la hierba de la memoria ya que le atribuían la capacidad de evitar la pérdida de la memoria en las personas, y se piensa que el baño en agua de romero, lavarse el pelo con champo de romero y beber té de romero podría ayudar a prevenir la pérdida de memoria y más a largo plazo el Alzheimer. También se usa desde hace siglos el romero en aceite de oliva para dar masajes en el cuero cabelludo para mantener el cabello sano, suave y brillante y prevenir su caída. Otra utilidad que se le ha dado al romero es evitar la aparición de arrugas y su tratamiento<sup>3,11</sup>.

El romero se puede utilizar para despertar a un individuo que ha sufrido un desmayo, machacando las hojas y acercándosela a la nariz. También se dice que el té de romero puede aliviar el dolor y un baño de romero puede aliviar dolores y relajar. Otra forma de usar el romero es el alcohol de romero que cura heridas y contusiones, además sirve para combatir los dolores articulares y para tonificar el cuerpo fatigado. Se dice que para combatir una enfermedad se debe pasar un tallo de romero por las zonas doloridas mientras se reza, repitiendo esta acción varias veces hasta que el enfermo se cure<sup>3,11</sup>.

La infusión de romero puede ayudar a hacer la digestión, o aliviar los problemas de estómago, además alivia el dolor de muelas y dientes. En la sangre, se dice que el romero es bueno para las anemias y para la circulación en general, se utiliza alcohol de romero para facilitar la circulación sanguínea, disolver la grasa de las piernas y combatir las varices. El té de romero es bueno para combatir toses y resfriados y el alcohol de romero se puede usar para aplicarlo sobre el pecho y la espalda con el mismo fin<sup>3</sup>.

Algunos de los usos tradicionales han perdurado a lo largo de la historia y hoy en día se siguen aplicando, como por ejemplo su utilización en la comida. En países como Francia o Italia el romero es un condimento más en su gastronomía. En España también se utiliza el romero en la cocina, la miel aromática que producen las flores del romero se usa para elaborar el turrón y se puede utilizar para hacer infusiones de romero con hojas secas. Antiguamente, el romero se utilizaba para conservar la comida. Sin embargo en países como Grecia, donde crece en abundancia, el romero no está considerado apto para el uso culinario, ya que tiene un aroma demasiado fuerte, y puede dar a la comida un sabor a medicina si no se utiliza en pequeñas cantidades<sup>4,11</sup>.

El conocimiento de la planta a lo largo de los años ha sido determinante para que se haya llegado a utilizar para todos estos propósitos desde la antigüedad, por lo que se han comenzado a buscar las bases científicas. A continuación analizaremos la composición química del romero y, más adelante, los usos que se hayan demostrado científicamente.

## 2. OBJETIVOS

Este Trabajo de Fin de Grado tiene como objetivo general dar a conocer el estado actual de los conocimientos sobre los efectos de los compuestos activos y funcionales del romero (*Rosmarinus officinalis*) como moduladores de procesos celulares y metabólicos que influyen en la adiposidad de los mamíferos y que permitirían intervenciones nutricionales para el tratamiento de la obesidad y sus complicaciones. Para conseguir el objetivo general desarrollaremos el trabajo en dos partes.

### 2.1 Trabajo bibliográfico

Se realizará una búsqueda y recopilación de información en esta parte del trabajo con el fin de conocer la composición química del romero, identificando los principales bioactivos y componentes funcionales que tienen efecto sobre el funcionamiento de las células y, además, comprender y analizar los efectos ya demostrados sobre la salud humana. Por lo tanto, los dos objetivos específicos de esta parte del trabajo son: conocer la composición química del romero y los efectos sobre la salud humana.

## 2.2 Trabajo experimental

Tras conseguir los objetivos anteriores y conocer mejor el romero y sus efectos, diseñaremos y llevaremos a cabo un experimento con el objetivo de demostrar o comprobar los efectos del ácido carnósico, compuesto bioactivos del romero, en tejido adiposo y su potencial como terapia anti-obesidad.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS (trabajo bibliográfico)

Para realizar la parte bibliográfica del trabajo se utilizaron bases de datos con el fin de buscar y recopilar artículos científicos de revisión o investigación que sirvan para cumplir los objetivos marcados en este trabajo. PubMed es un recurso gratuito que es desarrollado y mantenido por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), de la Biblioteca Nacional de Medicina (NLM) de los Estados Unidos. Esta base de datos comprende más de 24 millones de citas de literatura biomédica de MEDLINE, revista de ciencias de la vida<sup>12</sup>. Otra base de datos utilizada es ScienceDirect, una página web donde se puede buscar artículos científicos de más de 2500 revistas y 30000 libros<sup>13</sup>. Google es otro buscador que se utilizó, concretamente la aplicación Google Books, donde se encontraron los libros que han sido utilizados en versión online<sup>14</sup>.

Para llevar a cabo la búsqueda de la bibliografía en las bases de datos se utilizaron las siguientes palabras clave:

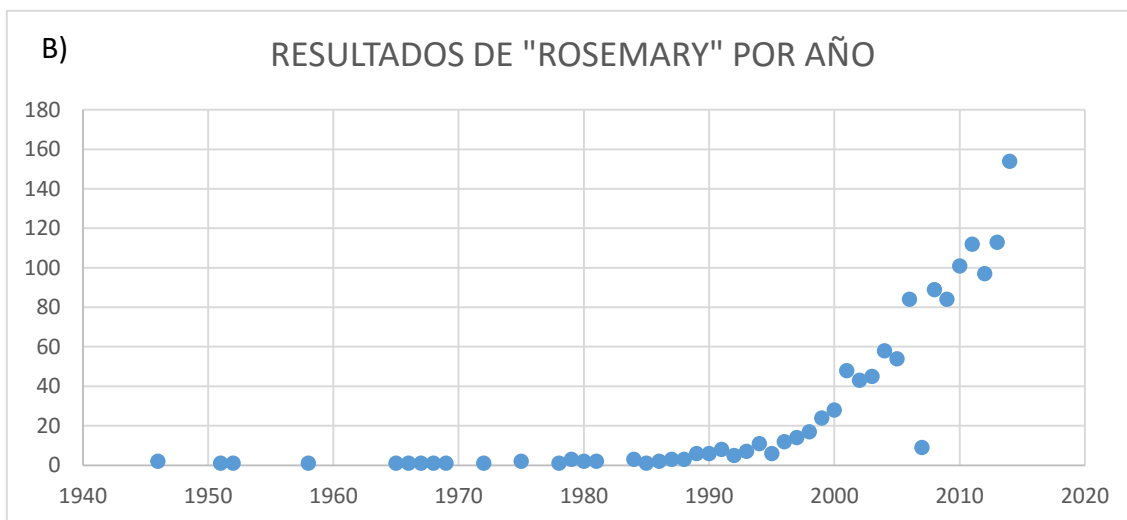
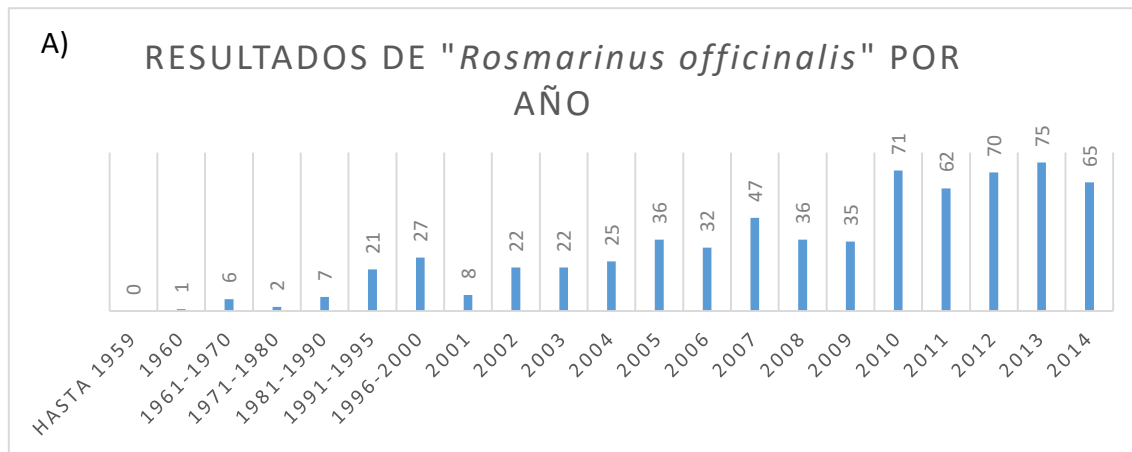
Palabras clave	Artículos
<i>Rosmarinus officinalis</i> review	15
<i>Rosmarinus officinalis</i>	686
<i>Rosmarinus officinalis</i> (últimos 5 años)	348
<i>Rosmarinus officinalis</i> (solo en humanos)	167
<i>Rosmarinus officinalis</i> essential oil	198
<i>Rosmarinus officinalis</i> extract	200
<i>Rosmarinus officinalis</i> extraction	68
Carnosic acid (últimos 5 años)	213
Rosmarinic acid (últimos 5 años)	489
<i>Rosmarinus officinalis</i> antioxidant effects	262
<i>Rosmarinus officinalis</i> energy metabolism	70
<i>Rosmarinus officinalis</i> cholesterol	10
<i>Rosmarinus officinalis</i> body fat	7
<i>Rosmarinus officinalis</i> adipocytes	2
<i>Rosmarinus officinalis</i> body mass index	1
<i>Rosmarinus officinalis</i> cancer	62
<i>Rosmarinus officinalis</i> diabetes	22

**Tabla 1. Palabras clave en la búsqueda de información en las bases de datos.** El número de artículos dado es el que se obtuvo de PubMed en el momento de la búsqueda y elaboración del trabajo, en la base de datos ScienceDirect se utilizaron las mismas palabras clave. En el caso de la aplicación Google Books se buscaron libros de botánica.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN (trabajo bibliográfico)

Los resultados obtenidos de la búsqueda bibliográfica se desarrollan a lo largo de este apartado. Como se puede ver en la tabla 1, los artículos relacionados con el romero (*Rosmarinus officinalis*) en los últimos 5 años son más de la mitad del total de estudios del romero registrados en PubMed, esto nos da una idea del reciente y gran interés que está levantando el romero y sus propiedades entre los científicos.





**Gráfica 1. Artículos registrados en PubMed por año.** A) En la gráfica se representa el número de artículos que se han registrado por año en la base de datos PubMed para la búsqueda "*Rosmarinus officinalis*". Se puede apreciar una clara subida del número en los últimos 5 años, que es considerablemente superior respecto a años anteriores al 2000, triplicando el promedio de los años comprendidos del 2001 al 2005 y duplicando a los promedios de 2005 a 2009. B) En esta otra gráfica tenemos una evolución parecida pero de la palabra "Rosemary", se ve un aumento muy notorio de los artículos registrados en los últimos 10 años.

La búsqueda en PubMed nos ha dado un resultado de 686 artículos (tabla 1) pero si la búsqueda se desglosa por años, se puede observar un aumento importante de los artículos registrados en PubMed en los últimos años, de esta forma, entre los años 2010 y 2014 el promedio de artículos registrados es de 68.6 por año, mientras que entre los años 2000 y 2009 el promedio es de 27.6 artículos por año, se aprecia un aumento claro del interés del romero en los últimos años, más concretamente en los últimos 5 años, donde el aumento es más del doble los artículos registrados por año como se puede observar en la gráfica 1A. También se ha querido saber si la palabra "Rosemary" ha tenido la misma evolución en la base de datos PubMed, se realizó una búsqueda de la palabra y el resultado fue prácticamente el mismo, la tendencia era parecida, un aumento de los artículos relacionados con el romero en los últimos 10 años (gráfica 1B)<sup>12</sup>.

#### 4.1 Composición química del romero

En el romero se han encontrado diversos compuestos químicos, estos bioactivos son los que le otorgan esas características que han sido de gran utilidad para el ser humano a lo largo de los siglos. Pero no todas las plantas presentan la misma composición química que depende de varios factores, como son: el lugar donde se cultiva, tipo de suelo, clima, altura sobre el nivel del mar. Todos estos factores generan cambios en la composición de bioactivos en los extractos y aceites de romero. Un ejemplo de

este caso son los dos tipos de aceite esencial de romero que podemos destacar en la zona del Mediterráneo: el aceite esencial procedente de Marruecos y Túnez, que tienen un elevado contenido en 1,8-cineol; y el aceite esencial español, que tiene menores concentraciones de este compuesto<sup>1</sup>.

Del romero podemos destacar dos familias químicas importantes, como son los terpenos y los compuestos fenólicos. De estas dos familias hay una gran y diversa cantidad de componentes, por ejemplo entre los terpenos podemos encontrar monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos y todos sus derivados, pero sus características físico-químicas, como se puede ver más adelante, son esenciales a la hora de extraerlos de la hoja de romero. Por ejemplo en la extracción de aceite esencial de la hoja de romero podemos destacar la presencia de monoterpenos y sesquiterpenos, mientras que en el alcohol de romero destacamos los diterpenos, triterpenos y los compuestos fenólicos, concretamente los flavonoides<sup>1</sup>.

<i>Rosmarinus officinalis</i>	<b>Terpenos</b>	<b>Aceite esencial</b>
		Monoterpenos sesquiterpenos
	<b>Compuestos fenólicos</b>	<b>Alcohol de romero</b>
		Diterpenos Triterpenos Flavonoides

**Esquema 1. Composición química del romero.** En este esquema se representa la composición de las principales formas químicas en las sustancias de extracción del romero, como son el aceite esencial y el alcohol de romero. Cada una de las sustancias tiene un procedimiento de extracción diferente.

#### 4.1.1 Terpenos

La familia de los terpenos, llamados terpenoides o isoprenoides, es un grupo muy numeroso de bioactivos naturales procedente de las plantas, alrededor de 20 mil estructuras diferentes, todas estas estructuras formadas a partir de una unidad de 5 carbonos. Dentro del grupo de los terpenos también se encuentra el subgrupo de los esteroides, aunque en muchas ocasiones se estudian por separado. Los terpenos se pueden encontrar en todas las partes de una planta superior y en algas, musgos, insectos, líquenes y microorganismos<sup>15</sup>. La clasificación de los terpenos es muy sencilla, se agrupan según el número de átomos de carbono:

Esqueleto	Subgrupo	Ejemplo
<b>C<sub>10</sub></b>	Monoterpenos	Linalol, limoneno, mentol, alcanfor, α-pineno
<b>C<sub>15</sub></b>	Sesquiterpenos	Ácido abscísico, β-cariofileno, pachulol, poligodial
<b>C<sub>20</sub></b>	Diterpenos	Fitol, vitamina A, ácido abiético, giberelinas
<b>C<sub>30</sub></b>	Triterpenos	Escualeno, lupeol
<b>C<sub>40</sub></b>	Carotenoides	B-caroteno, fucoxantina
<b>(C<sub>5</sub>)<sub>n</sub></b>	Poliisoprenoides	Caucho, gutapercha, chicle

**Tabla 2. Clasificación de terpenos.** Como se puede ver, la clasificación se basa en el número de carbonos que tienen los componentes en el esqueleto de carbono, es decir, en el número de unidades de isopreno (C<sub>5</sub>) presentes en la estructura. En el caso de los monoterpenos pueden subdividirse en lineales, monocíclicos y bicíclicos. En los sesquiterpenos de la misma forma se pueden subdividir en lineales, monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos. Por último los diterpenos se subdividen en lineales, monocíclicos, tricíclicos, tetracíclicos y macrocíclicos<sup>15</sup>, en el romero encontramos muchos terpenos tanto en el aceite esencial como en el alcohol de romero.

La biosíntesis de estos compuestos se lleva a cabo a partir de un precursor común, el ácido mevalónico, aislado por primera vez en 1956 por Folkers de una especie de *Lactobacterium*. La formación de este ácido se realiza a partir de la condensación de dos moléculas de acetil-CoA, posteriormente se añade una tercera molécula y tras la hidrólisis se obtiene 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). La conversión de HMG-CoA en ácido mevalónico (enantiómero R) supone una reducción en dos etapas

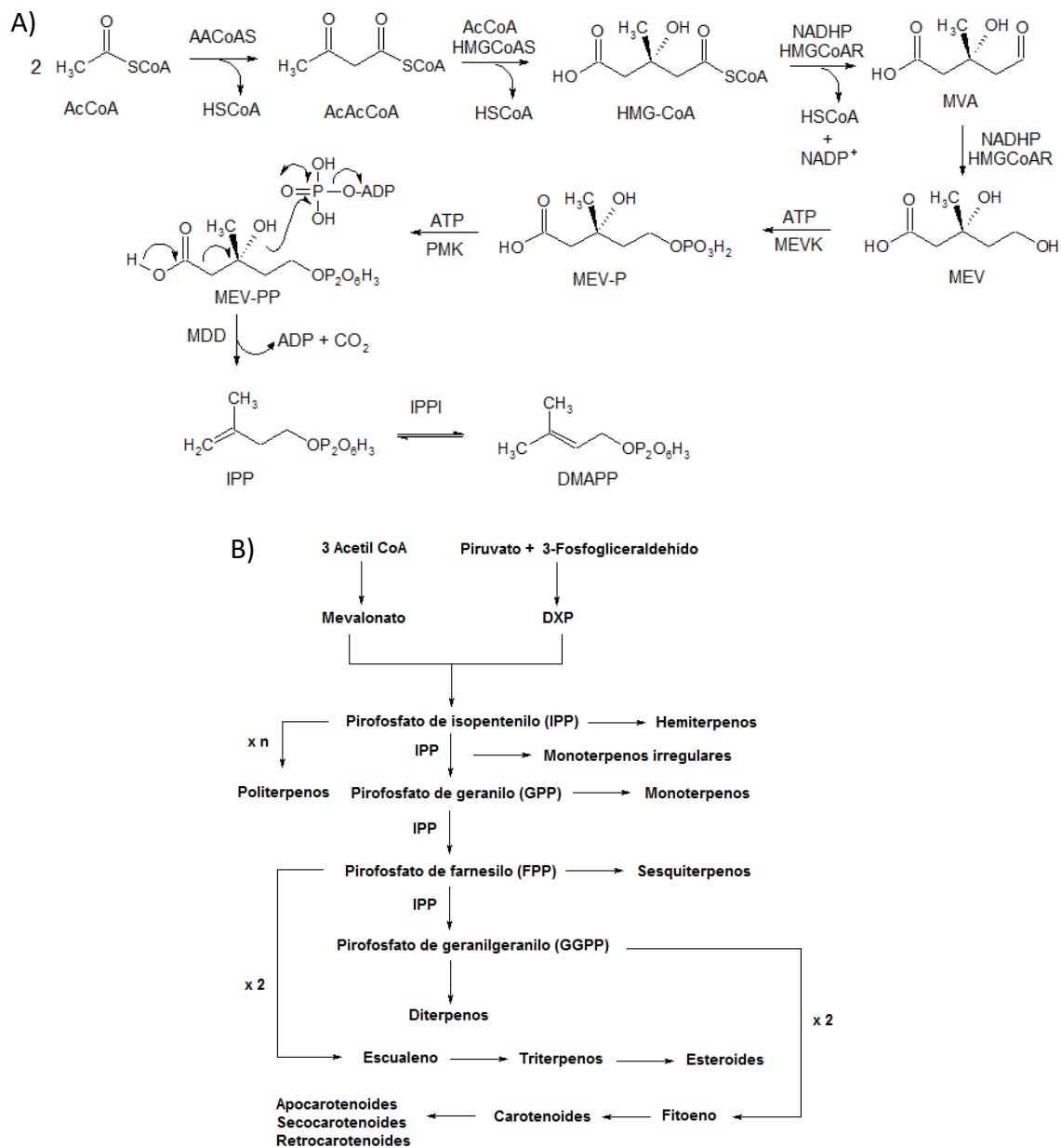


Figura 2. Biosíntesis de los terpenos. A) secuencia de biosíntesis del ácido mevalónico y la unidad básica de los terpenos (DMAPP) a partir del cual se generan todos los terpenos. B) Se puede ver un esquema de la formación de todos los terpenos a partir de la unidad básica<sup>15</sup>.

con NADPH del tioéster al alcohol primario que es irreversible y es la etapa clave de la secuencia. Por tanto, la enzima que cataliza dicho proceso y la responsable de la síntesis de todos los terpenos es la HMG-CoA reductasa (descubierta en 1959). La fosforilación del alcohol primario y finalmente la descarboxilación-eliminación mediada por ATP forma el isopreno activo o pirofosfato de isopentenilo (IPP), precursor directo de los terpenos. La isomerización de este último compuesto a pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), siendo el pirofosfato un buen grupo saliente, formando un electrófilo muy

reactivo, por lo tanto es la unidad iniciadora de la síntesis de terpenos (figura 2). La unión de estas unidades forman los distintos bioactivos del romero, formando una gran cantidad debido a que la unión de estas unidades puede ser lineal o cíclica<sup>15</sup>.

#### 4.1.2 Compuestos fenólicos

La otra familia química presente en el romero es la de los compuestos fenólicos, esta familia engloba un número elevado de compuestos aromáticos, derivados del benceno, con grupos hidroxilo como sustituyentes. Aunque la mayoría proviene de plantas, hay compuestos fenólicos de origen animal. Lo más destacado es que más de la mitad de compuestos fenólicos conocidos, pertenecen al subgrupo de los flavonoides. A la hora de aislarlos se debe tener en cuenta que los fenoles son compuestos químicamente reactivos, normalmente ácidos y pueden ser separados por su solubilidad en disolución acuosa de carbonato sódico. Estos compuestos pueden formar puentes de hidrogeno intramoleculares e intermoleculares. Los compuestos fenólicos son los responsables de darle olor y sabor a los alimentos, en el caso del romero, los compuestos fenólicos son los responsables del sabor y olor tan fuerte y característico. La clasificación de estos compuestos está determinada por su complejidad estructural y su origen biositético<sup>15</sup>:

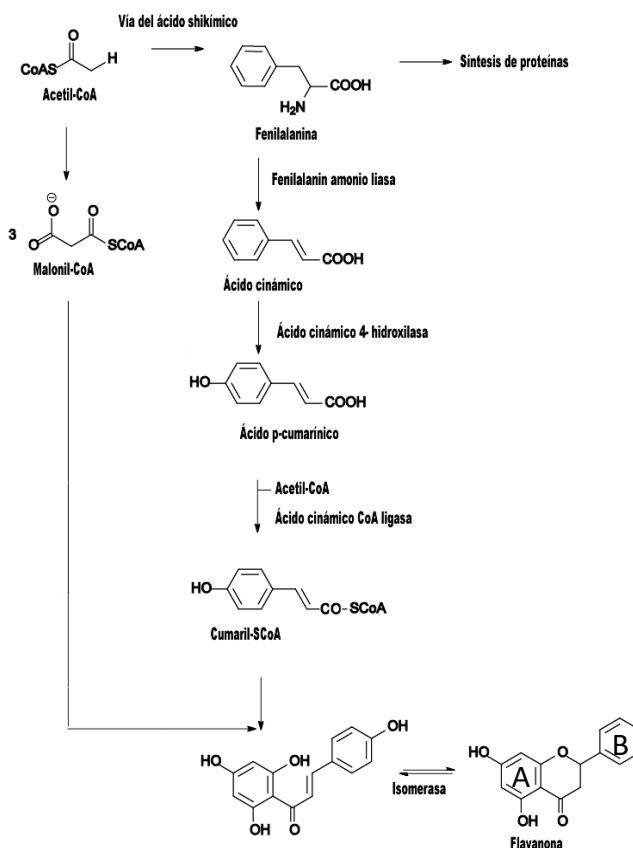


Figura 3. Biosíntesis de flavonoides. En la figura se observa la secuencia de síntesis de flavonoides, y la formación de ambos anillos (A y B).

Esqueleto básico	Tipo	Ejemplo
C <sub>6</sub>	Fenoles	Catecol, floroglucinol
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Ácidos fenólicos	p-Hidroxibenzoico, salicílico
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Ácidos fenilacéticos	p-hidroxifenilacético
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Ácidos hidroxicinámicos	Cafeico, sinápico
	Cumarinas	Umbeliferona, escopoletina
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Antraquinonas	Emodina, islandicina
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoides	Naringenina, maldivina
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanos	Podofilotoxina
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Ligninas	-
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Teninos condensados	-

Tabla 3. Principales tipos de compuestos fenólicos. Como se puede ver hay compuestos fenólicos sencillos como los fenoles o más complejos como los flavonoides. En el romero se encuentran principalmente los flavonoides y derivados, un ejemplo de compuesto fenólico es el ácido rosmarínico y todos sus derivados. Al ser compuestos solubles, su extracción está ligada mayormente al alcohol de romero<sup>15</sup>.

Los flavonoides son el tipo de compuestos fenólicos más abundantes, y de destacada presencia en el romero. Estos compuestos son los responsables de dar color a las plantas y su función biológica está ligada a la polinización y alimentación de los insectos, aunque algunos tienen un sabor amargo, para evitar que se coman las hojas. En la dieta humana, los flavonoides son beneficiosos ya que tienen un

poder antioxidante muy fuerte, y ayuda a eliminar los elementos ROS. Como se ha visto antes, la estructura de los flavonoides está basada en un esqueleto carbonado: C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, donde se detectan dos anillos aromáticos (A y B) unidos por una cadena de 3 carbonos (figura 3). La biosíntesis de los flavonoides es mixta, puesto que los dos anillos provienen de vías distintas, el anillo A proviene de la vía del acetato y el B del ácido sikímico<sup>15</sup>.

#### 4.2 Preparaciones de romero

Como se verá más adelante, las preparaciones de romero que se usan para el estudio de sus propiedades y efectos, aparte de los compuestos puros y romero en polvo, son las extracciones o preparaciones de romero. Estas preparaciones son dos, el aceite de romero y al alcohol de romero, y se extraen o preparan de manera diferente y en función de las propiedades físico-químicas de los compuestos que presenta cada una de estas preparaciones.

##### 4.2.1 Aceite esencial de romero

El aceite esencial de romero se puede obtener a partir de la extracción de las hojas frescas de la planta mediante la técnica de destilación por arrastre de vapor, donde el romero contiene alrededor de 1 a 2,5%<sup>1,16</sup>. Como se ha dicho antes, en el aceite esencial de romero se puede destacar la presencia de monoterpenos y sesquiterpenos. Un estudio de 2006 en el que se estudia la composición química y las propiedades físico-químicas asociadas al aceite de romero de las cosechas de 1998, 1999 y 2000 para conocer la calidad y estabilidad química del aceite esencial de la región del sur de Brasil. Se consiguió una composición química del aceite esencial de romero de estas cosechas de Brasil, y se identificaron una gran cantidad de componentes químicos. Los compuestos que se encuentran en mayor concentración eran  $\alpha$ -pineno (40,55% a 45,10%), 1,8-cineol (17,4% a 19,35%), canfeno (4,73% a 6,06%), verbenona (2,32% a 3,86%) y borneol (2,24% a 3,1%)<sup>16</sup>.

Componentes	1998	1999	2000
$\alpha$ -pinene	40,55	45,1	41,63
camphene	5,17	6,06	4,73
$\beta$ -pinene	2,7	2,86	2,4
sabinene	0,74	0,67	0,84
myrcene	1,39	1,59	1,71
$\alpha$ -phelandrene	0,5	0,43	0,45
limonene	3,41	3,81	3,33
1,8-cineole	17,4	17,59	19,35
$\gamma$ -terpinene	1,11	0,75	0,82
para-cynene	0,99	1,56	1,23
$\alpha$ -terpinolene	0,92	0,69	0,68
chrysanthenone	0,65	0,51	0,53
camphor	2,13	1,63	2,42
linalool	2,02	1,71	2,16
bornyl acetate	1,39	1,02	0,8
$\beta$ -caryophyllene	2,8	2,11	2,16
terpinen-4-ol	0,75	0,51	0,7
verbenone	2,83	2,32	3,86
borneol	2,97	2,24	3,1
geraniol	2,68	2,07	2,61
Non oxygenated	60,28	65,63	59,98
Oxygenated	33,82	29,6	35,53
Total	94,1	95,23	95,51

**Tabla 4. Composición química del aceite esencial.** Se ve en esta tabla, extraída del artículo original, la composición del aceite esencial de romero. Según los autores del estudio, las cosechas de los años 1998, 1999 y 2000 de Brasil son parecidas a las composiciones químicas del romero de Francia e Italia<sup>16</sup>.

En otro estudio se compara la concentración de la fracción volátil de la infusión de romero, aislados por hidrodestilación y extracción de fase sólida, con la composición química del aceite esencial de romero, en este caso se vio una composición parecida a la del estudio anterior en el caso del aceite de romero, donde se identificaron unos 38 compuestos diferentes y donde los principales compuestos

eran 1,8-cineol (41,6%), alcanfor (17%),  $\alpha$ -pineno (9,9%),  $\alpha$ -terpineol (4,9%) y borneol (4,8%). En el caso de los compuestos de la fracción volátil de la infusión de romero los principales componentes son: 1,8-cineol (42,4% a 44,7%), alcanfor (31,4% a 31,8%),  $\alpha$ -terpineol (8,6% a 8,1%) y borneol (8,3% a 7,8%). La composición no varía en demasía aunque si el rendimiento, en el caso de la extracción de la fracción volátil de la infusión del romero el rendimiento es menor (0,36% v/w) que la extracción del aceite esencial de romero directamente de las hojas (1,84% v/w)<sup>17</sup>.

Como se ha dicho antes, el aceite esencial de romero está compuesto especialmente por monoterpenos y sesquiterpenos, estos compuestos tienen actividad antimicrobiana, actividad antitumoral, actividades antiespasmódicas y anticonvulsivos y efectos hiperglucémicos que se han demostrado, algunos de estos efectos se verán más adelante en el trabajo<sup>17</sup>.

#### 4.2.2 Alcohol de romero

Como se aprecia en el esquema 1, en el romero podemos encontrar también diterpenos, triterpenos y compuestos fenólicos, especialmente flavonoides, todos estos compuestos presentes de forma destacada en el alcohol de romero. En el caso de los diterpenos, se han descrito compuestos como el ácido carnósico y el carnosol entre otros, siendo estos dos los más destacados por su gran propiedad antioxidante. Por otro lado, se puede encontrar también triterpenos, de los que se ha descrito el ácido ursólico, el betulínico y el oleanólico, con propiedades antiinflamatorias y hepatoprotectoras entre otras. Y por último, los compuestos fenólicos, de los que se destaca el grupo de los flavonoides con compuestos como el genkwanin, el cirsimaritin o el homoplantagin. Además, otros compuesto fenólicos que no pertenecen al grupo de los flavonoides y que destacan por sus propiedades son el ácido cafeico y su derivado el ácido rosmarínico<sup>18</sup>.

En un estudio de 2014 donde se pretendía conocer las concentraciones de los compuestos presentes en 20 muestras de extracto de romero de distintas zonas geográficas de Serbia. Este extracto se obtuvo del romero mediante la extracción asistida por microondas y los componentes fueron caracterizados y cuantificados<sup>18</sup>. Se detectaron más de 30 compuestos y los resultados fueron los siguientes:

Compuesto	RS 1	RS 2	RS 6	Compuesto	RS 1	RS 2	RS 6
1 Quinic acid	121 ± 2	128 ± 6	ND	18 Epirosmanol methyl ether	0.158 ± 0.005	0.70 ± 0.01	0.159 ± 0.001
2 Siringic acid	300 ± 20	ND	ND	19 Carnosol	12 ± 1	22.1 ± 0.6	5.3 ± 0.1
3 Gallic acid	9.0 ± 0.6	11.1 ± 0.5	4.8 ± 0.4	20 Carnosol isomer	0.75 ± 0.07	0.75 ± 0.10	0.19 ± 0.01
4 6-Hydroxyluteolin 7-glucoside	ND	0.81 ± 0.02	ND	21 Rosmadial	0.30 ± 0.04	0.23 ± 0.02	ND
5 Rosmarinic acid-3-O-glucoside	ND	ND	7.9 ± 0.7	22 Anemosapogenin	ND	0.457 ± 0.002	ND
6 Nepetrin	9.9 ± 0.1	10.0 ± 0.5	ND	23 Rosmaridiphenol	0.256 ± 0.001	0.62 ± 0.02	ND
7 Hesperidin	2.2 ± 0.1	2.6 ± 0.1	1.9 ± 0.2	24 2,3,4,4a,10,10a-hexahidro-5,6-dihydroxy-1,1-dimethyl-7-(1-methylethyl)-9(1H)-Phenantrenone	0.05 ± 0.02	0.24 ± 0.01	ND

8	Homoplantaginín	1.28 ± 0.06	1.51 ± 0.03	0.40 ± 0.03	25	Benthamic acid	ND	3.7 ± 0.5	ND
9	Luteolin-3'-glucuronide	10.5 ± 0.3	9.2 ± 0.4	0.68 ± 0.06	26	Augustic acid	ND	1.68 ± 0.05	ND
10	Rosmarinic acid	15.3 ± 0.5	25 ± 1	5.6 ± 0.2	27	Carnosic acid	24 ± 2	17.2 ± 0.8	3.2 ± 0.5
11	Luteolin 3'-O-(O-acetyl)-β-d-glucuronide Isomer I	4.5 ± 0.6	5.5 ± 0.2	ND	28	12-metoxycarnosic acid	2.9 ± 0.1	3.8 ± 0.1	0.084 ± 0.005
12	Luteolin 3'-O-(O-acetyl)-β-d-glucuronide Isomer II	15 ± 1	17.9 ± 0.8	0.3 ± 0.1	29	[9]-Shogaol isomer	1.03 ± 0.02	1.41 ± 0.06	ND
13	Cirsimaritin	0.47 ± 0.06	0.58 ± 0.02	0.19 ± 0.01	30	[9]-Shogaol	1.87 ± 0.08	3.4 ± 0.3	ND
14	Rosmanol	2.00 ± 0.04	1.49 ± 0.03	0.173 ± 0.005	31	Micromeric acid	1.2 ± 0.2	8 ± 1	ND
15	Epiisorosmanol	0.426 ± 0.010	0.95 ± 0.05	0.19 ± 0.03	32	Betulinic acid	7.8 ± 0.6	77 ± 1	ND
16	Epirosmanol	0.23 ± 0.01	0.41 ± 0.03	<LQ	33	Ursolic acid	1.715 ± 0.008	21.9 ± 0.1	ND
17	Genkwanin	0.44 ± 0.01	0.64 ± 0.03	0.17 ± 0.02	34	Asiatic acid	ND	1.65 ± 0.08	ND

**Tabla 5. Composición química del alcohol de romero.** La tabla, extraída del artículo original, recoge los datos de 3 de las 20 muestras del estudio y, como se puede ver, se han detectado más de 30 compuestos diferentes, además no todas las muestras presentan la misma composición ya que esto depende de muchos factores. Las muestras de romero fueron obtenidas de distintas zonas geográficas de serbia, lo que explica la diferencias en la composición<sup>18</sup>.

Se puede ver que los compuestos más abundantes son el ácido carnósico, ácido rosmarínico, el carnosol, ácido micromérico, ácido betulínico y ácido ursólico. Además el ácido quínico y siríngico se encuentran en concentraciones altas en algunas muestras como en el caso de los flavonoides nepetrin y galocatequina. Las cantidades y composición de los componentes de la planta están influenciados por numerosos factores, como se ha dicho antes, estos factores son la edad de la planta, el clima, el tipo de suelo o el estrés que puede inhibir o activar la síntesis de algunos compuestos<sup>18</sup>.

#### 4.3 Compuestos puros más destacados

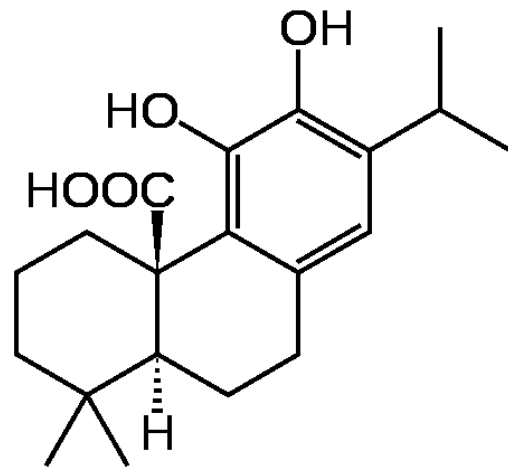
Los compuestos puros de mayor importancia en el romero son el ácido carnósico y el ácido rosmarínico debido a su gran abundancia en la planta y sus propiedades como antioxidantes, antiinflamatorias, entre otras. Estas propiedades, demostradas en diferentes estudios, han provocado que sean los compuestos puros más utilizados para la investigación de las propiedades del romero sobre la salud.

##### 4.3.1 Ácido carnósico

El ácido carnósico, que posee propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, se utiliza cada vez más en las industrias de la alimentación, nutrición y cosmética. Desde su primera extracción, hace unos 70 años, y su identificación, alrededor de 50 años, se han publicado numerosos estudios de extractos de romero abundantes en ácido carnósico y sus aplicaciones pero los estudios bioquímicos, fisiológicos o moleculares relevantes no son tan abundantes<sup>19</sup>.



Este compuesto tiene una fórmula  $C_{20}H_{28}O_4$  y puesto que contiene un grupo fenólico, a menudo lo clasifican como un polifenol, sin embargo, su biosíntesis, su distribución celular y sus propiedades de solubilidad difieren sustancialmente de la mayoría de los polifenoles, sus características se asemejan más con los terpenoides, por lo que se agrupa como un diterpeno fenólico. El ácido carnósico ha sido identificado en solo unas pocas especies, siendo exclusivo de la familia de las *labiadas*, y más concretamente, del *Rosmarinus officinalis* que es la planta donde se encuentra en mayor concentración. Y dentro de la planta del romero, el ácido carnósico no se distribuye de manera uniforme, se localiza mayormente en las partes aéreas como las hojas, sépalos y pétalos. Además, como se ha mencionado anteriormente en este trabajo, la concentración de este componente está sujeta a las condiciones ambientales, disminuyendo en altas temperaturas y bajas tasas de precipitaciones<sup>19</sup>.



**Figura 4. Estructura molecular del ácido carnósico.** Este compuesto es un terpenoide, concretamente un diterpeno (esqueleto de carbonos formado por 20 átomos) y además tiene en su estructura un grupo fenólico, de ahí que lo clasifiquen como diterpeno fenólico. Su fórmula molecular es  $C_{20}H_{28}O_4$ <sup>19</sup>.

La biosíntesis del ácido carnósico no se conoce totalmente y las investigaciones se han centrado en la biosíntesis de los terpenos en general y en otras especies de plantas como la Salvia, mientras que en el romero no se han llevado a cabo muchas investigaciones sobre la biosíntesis del ácido carnósico, en este sentido se puede suponer que el ácido carnósico sigue la misma ruta de biosíntesis general de los terpenos, a partir de unidades básicas de 5 carbonos (isoprenos)<sup>19</sup>. Sin embargo, se han llevado a cabo algunos estudios e investigaciones en el romero tanto para conocer mejor la biosíntesis del ácido carnósico, como una mayor producción de este compuesto en la planta.

Un estudio reciente, en el que se busca aumentar la concentración de los diterpenos fenólicos del romero sin hacer plantas transgénicas, puesto que no se sabe totalmente la ruta biosintética que el romero presenta para la biosíntesis del ácido carnósico y por lo tanto no se puede hacer un transgénico seguro ni de forma sencilla, se ha observado que el clima inglés favorece la producción de ácido carnósico, más incluso que los climas mediterráneos, además, se observó que el tratamiento con radiación ultravioleta de las plantas aumentaba la concentración de ácido carnósico en comparación con las plantas sin tratar. Por otro lado, la salinidad del agua y suelo, la luz intensa y el estrés por calor parecen afectar negativamente a la producción de ácido carnósico, puesto que se ve que disminuyen las concentraciones<sup>20</sup>.

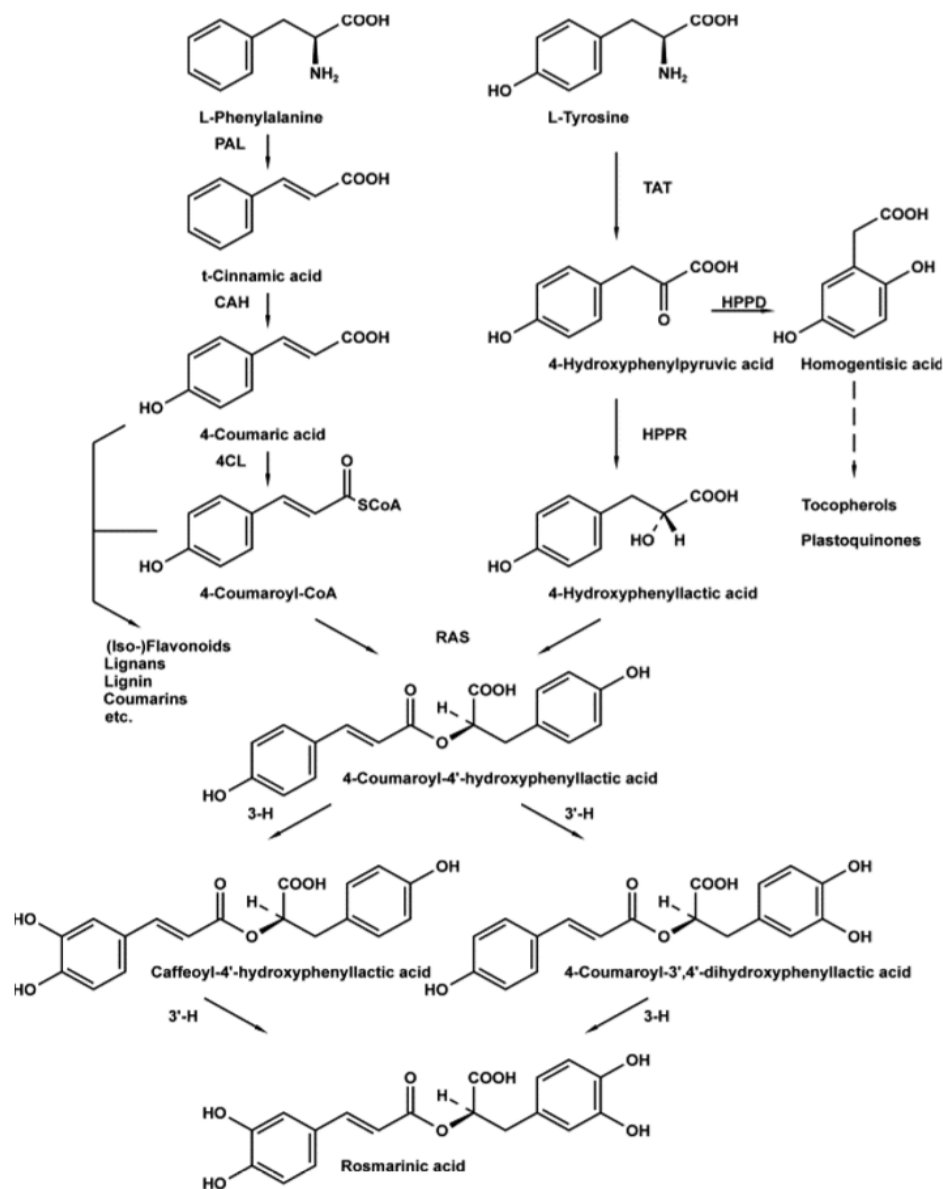
En otro estudio, se observó que la distribución del ácido carnósico en las partes aéreas no es uniforme, sino que se encuentra más concentrado en los tricomas, mientras que otros componentes como el carnosol se acumulan dentro de las hojas. Después de la eliminación de los tricomas, el material de la hoja restante contenía de forma relativa más carnosol (alrededor de 40%) que ácido carnósico. Por otro lado, los tricomas que fueron eliminados contenían principalmente ácido carnósico, y cantidades relativamente bajas de carnosol. Por tanto, el carnosol es relativamente más abundante en hojas sin tricomas pero el ácido carnósico es más abundante en hojas con tricomas (tanto en hojas jóvenes como mayores), los resultados globales indican, por tanto, que parte importante del ácido carnósico en la hoja de romero se localizan en los tricomas. Además, en el mismo estudio se demuestra que tanto RoCPS1 y RoKSL2 son genes que están bien expresados en los tricomas glandulares, más incluso que



en el resto de la hoja, esto hace pensar que los tricomas tienen un papel importante en la biosíntesis del ácido carnósico, o al menos para los primeros pasos. A partir de ahí, el compuesto y sus derivados se distribuyen por toda la planta<sup>21</sup>.

### 4.3.2 Ácido rosmarínico

Otro componente importante es el ácido rosmarínico, es un compuesto natural hidroxilado que podemos encontrar en el romero y otras especies de plantas de la familia de *Boragináceas* y la subfamilia *Nepetoideae* del *Lamiaceae*, aunque se han reportado especies fuera de esta subfamilia que contienen ácido rosmarínico, además, también hay especies fuera de estas dos familias (*Boragináceas* y *Lamiaceae*) que si presentan ácido rosmarínico. Su fórmula molecular es  $C_{18}H_{16}O_8$ . Al igual que el ácido carnósico, las investigaciones de su extracción y sus aplicaciones son muy abundantes, mientras



**Figura 5. Biosíntesis del ácido rosmarínico.** La biosíntesis del romero se consiguió dilucidar en 1991, y se ha visto que pertenece a los compuestos fenólicos. Como se puede ver en la figura, en la biosíntesis actúan 8 enzimas y se obtiene a partir de fenilalanina y tirosina, el resultado es el ácido rosmarínico que presenta la estructura que se representa en la figura y a partir del cual salen todos sus derivados<sup>24</sup>.

que los estudios moleculares son reducidos. Sin embargo, al contrario del ácido carnósico, la biosíntesis del ácido rosmarínico si se conoce mejor, sabiendo los 8 enzimas que participan. Tanto el

ácido rosmarínico como sus derivados han levantado el interés por sus actividades biológicas que son antiinflamatorias, antioxidantes, antitumorales, antiangiogénico y las funciones antimicrobianas<sup>22,23</sup>.

La propuesta de la biosíntesis del ácido rosmarínico es la que se representa en la figura 5, como se puede ver, los componentes precursores son los aminoácidos fenilalanina y tirosina. El inicio de la ruta biosintética se corresponde con la síntesis de los compuestos fenólicos, que provienen de la fenilalanina, de esta forma, el inicio de la ruta puede dar como resultado la síntesis de gran variedad de compuestos fenólicos como flavonoides, ligninas, Lignanos, etc. El primer paso consiste en la desaminación de L-fenilalanina a ácido t-cinámico por la enzima fenilalanina amoni- liasa (PAL), tras este paso, la enzima citocromo P450 monohidroxigenasa cinamato 4-hidroxilasa (CAH) añade un hidróxido en posición 4 para formar el ácido 4-cumarico, este compuesto es activado por un hidroxicinamato: coenzima A ligasa (4CL) dando el ácido 4-cumarol-CoA. Por otro lado, la L-tirosina es transformada para conseguir el otro precursor y así formar el ácido rosmarínico por esterificación, el primer producto proviene de la transaminación de la tirosina con 2-oxoglutarato como segundo sustrato para dar ácido 4-hidroxifenilpiruvato y glutamato por la enzima tirosina aminotransferasa transaminasa piridoxalfosfato dependiente (TAT). Este compuesto, el ácido 4-hidroxifenilpiruvato, se reduce al ácido 4-hidroxifenilactato por hidroxifenilpiruvato reductasa (HPPR) con NADPH o NADH como cosustrato, aunque este último con menor afinidad. El isómero R es el único que puede formar, junto con el ácido 4-cumarol-CoA proveniente de la fenilalanina, el ácido rosmarínico gracias a la enzima ácido rosmarínico sintasa (RAS). El compuesto resultante es el ácido 4-cumarol-4'-hidroxifenilactato, que es hidroxilado en las posiciones en las posiciones 3 y 3' de cada anillo aromático por dos monooxigenasas del citocromo P450 dando de esta forma el ácido rosmarínico<sup>24</sup>.

#### 4.4 Propiedades demostradas

Como se ha dicho antes, al romero se le han atribuido a lo largo de los años una gran cantidad de propiedades, y probablemente no tenga alguna de las mencionadas, por lo que una vez analizada la composición y los principales compuestos del romero, se hará una revisión de los estudios realizados para conocer sus propiedades probadas científicamente. En este sentido nos interesa más aquellas propiedades demostradas sobre la salud y en los seres humanos. Pero como se puede ver en la tabla 1, los artículos relacionados con el *Rosmarinus officinalis*, o los distintos compuestos químicos que contiene la planta, en humanos son bastante escasos y representan un porcentaje menor respecto a la totalidad de artículos en los que aparece el romero como palabra clave. La tabla que se muestra a continuación clasifica por enfermedades los diferentes estudios llevados a cabo para demostrar las propiedades reales que tiene el romero sobre la salud y que podrían tener un potencial terapéutico importante.

Enfermedad	Ensayo Clínico o Línea Celular	Compuestos	Concentración, Duración	Efectos	Referencia
Exposición UV de la epidermis	Queratinocitos humanos HaCaT	alcohol de romero y de cítricos (1:1)	12,5 a 100 µg/mL	Mayor supervivencia celular	25
	Fase 1 del ensayo clínico		250 mg/día 3 meses	Aumento de DEM*	
Enfermedades vasculares	Ratones	Romero en polvo (dieta)	0,5 g y 5 g 12 semanas	Disminución de la tasa de formación de trombos	26
Enfermedades vasculares causadas por diabetes	Ratas <i>Wistar</i> (diabetes inducida)	Ácido rosmarínico (Vía oral)	50 mg/kg al día 10 semanas	Protege el endotelio aortica y su función del daño diabético	27

Daño hepático inducido con CCl <sub>4</sub>	Ratas <i>Wistar</i> albinas	Aceite esencial (aplicación por sonda)	5 y 10 mg/kg 7 días	Disminución de los marcadores que indican daño hepático	28
Esteatosis hepática	Ratones	Ácido carnósico	Administración en dieta alta en grasas (0,01 y 0,02 w/w) 12 semanas	Disminuye la acumulación de grasa en el hígado y mejora de los trastornos metabólicos	29
Alergia respiratoria, asma	Ratones	Ácido rosmarínico (Vía intraperitoneal)	2, 20 y 200 mg/kg 1 semana	Reducción de moco e inflamación pulmonar y en los bronquios a los 200 mg/kg	30
Insuficiencia renal causada por el péptido β-amiloide (Alzheimer)	Línea celular PC12 (feocromocitoma de rata)	Ácido rosmarínico	0.0036, 0.036, 0.36, 3.6 y 36 μg/ml	Aumento de la viabilidad celular Disminuye ROS, la peroxidación lipídica y otros eventos ligados a la acción de péptidos β-amiloides	31
Toxicidad neuronal por β-amiloide (Alzheimer)	Ratas <i>Wistar</i>	Ácido carnósico	1 ml (10 mg/kg) antes del péptido 1 ml (3mg/kg) 12 días	Mejora la memoria y aprendizaje de las ratas, prevención de la degeneración neuronal	32
Sistema nervioso	Ratas <i>Wistar</i> de media edad	Alcohol de romero rico en ácido carnósico (40%)	50, 100 y 200 mg/kg al día 12 semanas	Mejora de la memoria y el sistema antioxidante del hipocampo, aumento de la actividad de SOD, GPx y CAT	33
Melanoma humano	Línea celular de melanoma humano A375	Alcohol de romero	Diluciones de: 1:120, 1:240, 1:480 y 1:960 24h, 48h y 72h	Reducción del crecimiento, actividad celular y de elementos ROS, ciclo celular afectado.	34
		Carnosol	50 μM, 20 μM, 5 μM y 1 μM 24h, 48h y 72h	Muy eficaz en el poder anti-proliferativo a concentraciones de 50 y 20 μM	
		Ácido rosmarínico	50 μM, 20 μM, 5 μM y 1 μM 24h, 48h y 72h	Solo hay resultados significativos a 50 μM tras 72 h	
Alteración de la microbiota en ratas	Ratas <i>Zucker</i> delgadas (fa/+) y obesas (fa/fa)	Alcohol de romero rico en ácido carnósico (40%)	Administrado en la dieta (0,5% w/w) 64 días	Modificación de la microbiota, reducción de la actividad β-glucosidasa en el ciego y aumento de la excreción de fibra	35

Obesidad	Línea celular 3T3-L1 (adipocitos de ratón)	Alcohol de romero	De 2.5 a 75 µg/ml Tratamiento durante la diferenciación	Marcada disminución de la acumulación de lípidos en los adipocitos, bloqueo de la expresión de PPARγ y FABP4	36
		Ácido carnósico	De 0.3 a 20 µg/ml Tratamiento durante la diferenciación		
Obesidad	Línea celular 3T3-L1 (adipocitos de ratón)	Ácido carnósico	0.1, 1, 10 µM 8 días (diferenciación completa)	Acumulación de lípidos inhibida y disminución de la expresión de PPARγ	37

**Tabla 6. Propiedades estudiadas de los compuestos del romero.** En la tabla se resumen algunos de los estudios llevados a cabo en los últimos años sobre el romero, o sus compuestos, relacionados con la salud. Se ha podido comprobar que tiene un gran potencial terapéutico para combatir o prevenir algunas enfermedades importantes que afectan a millones de personas como son la obesidad, cáncer de varios tipos, problemas de asma y neurodegenerativos entre otros. Los estudios que componen la tabla consiguen sus efectos gracias a las propiedades como antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas y antitumorales, entre otras propiedades, que presentan los diferentes componentes del romero que combaten contra los estímulos hostiles de las diferentes enfermedades. \*DEM: Dosis de eritema media, es la cantidad de radiación que se necesita para que se produzca enrojecimiento en la piel de una persona.

En la tabla 6 podemos encontrar algunos de los estudios más recientes que se han hecho sobre los efectos que tiene el romero, en diferentes enfermedades o estímulos patológicos pero la mayoría en animales. Se puede destacar un experimento donde sí se ha llegado a la fase 1 de ensayo clínico, se trata del primer estudio de la tabla 6. En él se ha visto un aumento de la dosis de eritema media (DEM), que viene a ser la cantidad de dosis de radiación que se necesita para que se produzca enrojecimiento en la piel, gracias a la ingesta de 250mg/kg de una preparación de alcohol de romero y extracto de cítricos. De modo que hay evidencias de que puede funcionar en seres humanos, como en este caso, en el que gracias a sus propiedades antioxidantes ayuda a combatir el estrés que supone la radiación solar sobre la piel.

Como conclusión, podríamos decir que gracias a la investigación de los últimos años se ha podido comprobar que el romero tiene diferentes bioactivos, ya vistos en los apartados anteriores, que pueden tener propiedades beneficiosas para la salud. Hay evidencias científicas de que el romero en polvo, sus compuestos puros o las preparaciones de romero tienen un gran potencial para combatir las enfermedades vistas en la tabla 6, si bien la mejoría se ha visto principalmente en modelos celulares y animales.

#### 4.5 Efectos negativos del romero. ¿Toxicidad?

El romero y sus extracciones, el aceite de romero y el alcohol de romero, son por lo general bien tolerados por los humanos y los animales. Pero se pueden presentar algunos problemas, como en el caso de las personas hipersensibles, que pueden presentar una reacción alérgica derivado del uso del romero como terapia. El simple contacto con el romero puede provocar dermatitis. Además, se demostró que el aceite de romero puede provocar convulsiones si se toma por vía oral, por lo que las personas epilépticas no pueden ingerir grandes cantidades del aceite, al igual que los niños. De la misma forma, las personas con cálculos biliares deben tener cuidado con el uso terapéutico del romero, ya que un aumento del drenaje de la vesícula biliar puede generar una obstrucción en los conductos biliares<sup>1</sup>.

Hay algunos estudios en los que se ha podido observar efectos dañinos del alcohol de romero, por ejemplo en un estudio de 2008, donde se observó la toxicidad del alcohol de romero provocando anomalías en los embriones en ratas tratadas con una dosis de 260 mg/kg, y con una dosis superior, de 1040 mg/kg, se provoca el aborto espontáneo en los seres humanos y en animales<sup>38</sup>.

Por otro lado, en un estudio de 2009 se trataron por sonda con dosis de 300, 1000 o 2000 mg/kg de aceite de romero, mostrando, especialmente en las dosis más altas, un aumento en el número de células micronucleadas y aberraciones cromosómicas<sup>39</sup>.

Finalmente, aunque la sobredosis por el consumo de infusiones de romero tiene una probabilidad muy baja, esta podría provocar espasmo abdominal, gastroenteritis, vómitos, irritación renal y hemorragia uterina<sup>1</sup>.

## 5. OBJETIVO CONCRETO Y BACKGROUND

Una vez conocida la composición química del romero y las propiedades que tiene sobre la salud, llegamos a la conclusión que es un buen candidato para ver los efectos sobre la obesidad, siendo el ácido carnósico el principal compuesto, en especial sobre la expresión de algunos genes relacionados con el metabolismo oxidativo de lípidos y el efecto de marronización.

El tejido adiposo presenta dos tipos celulares, el tejido adiposo blanco que está destinado al almacenamiento de lípidos, y el marrón, dedicado a la oxidación de lípidos y disipación de esta energía en forma de calor en respuesta a diferentes estímulos de estrés<sup>40</sup>. Recientemente se ha identificado adipocitos marrones en el tejido adiposo blanco en humanos y se ha sugerido que su inducción podría ser una buena terapia anti-obesidad<sup>41,42</sup>.

Para llevar a cabo el trabajo experimental utilizamos adipocitos maduros para tratarlos con ácido carnósico a diferentes concentraciones durante 24 horas y de esta manera obtener el ARN para analizar la expresión génica que tienen estas células en presencia de este compuesto.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS (trabajo experimental)

### 6.1 Células 3T3-L1 y cultivo celular

La línea celular utilizada para llevar a cabo el experimento fue la línea 3T3-L1 de la casa comercial *ZenBio*, estas células proceden del tejido de embrión de ratones *Swiss*, derivadas por el Dr. Howard Green, de la escuela de Medicina de Harvard. Esta línea celular ha sido fundamental para avanzar en la comprensión de los mecanismos celulares básicos asociados con la diabetes, obesidad y otros trastornos relacionados<sup>43</sup>.

Las células se cultivaron en una placa de 24 pocillos a 37°C, con un 5% de CO<sub>2</sub> en una incubadora hasta que lleguen a la confluencia en un medio de preadipocitos PM-1-L1. El medio se cambió cada dos días<sup>43</sup>.

### 6.2 Diferenciación celular

Una vez que las células llegaron a la confluencia se renovó el medio, marcando ese día como día -2 de la diferenciación, puesto que se deben incubar durante dos días las células antes de iniciar el proceso. Tras estos dos días de cultivo se cambió el medio PM-1-L1 por el medio de diferenciación y se incubaron las células dos días a 37°C con un 8% de CO<sub>2</sub><sup>43</sup>.

Este nuevo medio de está compuesto por *Eagle's minimal essential medium* (DMEM) con 50nM de Dexametasona, 500 µM de IBMX, 10% de *fetal bovine serum* (FBS), 2% de stock S/P (Streptomycin y penicilina), 1% piruvato de sodio y 5 µg/ml de insulina. Con el cambio de medio se inicia la diferenciación, empieza el día 1. Pasados dos días, se cambia el medio a un medio sin Dexametasona ni IBMX y se incuba durante 5 días más, renovando el medio cada dos días<sup>43</sup>.

### 6.3 Tratamiento

Para el tratamiento se utilizó el ácido carnósico, este diterpeno que se encuentra en el *Rosmarinus officinalis* ha demostrado tener la propiedad anti-adipogénica sobre estas células durante la

diferenciación, dando resultados interesantes. Nosotros realizamos el tratamiento después del proceso de la diferenciación, a diferencia del estudio llevado a cabo por Mi-Young Park en el que se realizó durante el proceso de diferenciación, y de esta manera conocer el efecto que tiene el ácido carnósico sobre adipocitos maduros<sup>37</sup>.

Una vez las células se diferenciaron a adipocitos maduros tras 7 días se hicieron 4 grupos para el tratamiento de las células en la placa de 24 pocillos. Grupo control (DMSO), grupo tratamiento de 0,1  $\mu\text{M}$ , grupo tratamiento de 1  $\mu\text{M}$  y grupo tratamiento de 10  $\mu\text{M}$ . El tratamiento duro 24h y pasado este tiempo se retiró el medio de cultivo y se congelo la placa a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Las células de esta placa se observaron con microscopio para ver si el tratamiento tuvo efectos visibles a simple vista tras 24h y después se utilizaron para la extracción de ARN y poder analizar los cambios de expresión que produce el ácido carnósico sobre las células.

#### 6.4 Extracción de ARN

Para obtener el ARN de las células se realizó una extracción en columnas con el kit E.Z.N.A. Total RNA kit I y se siguieron los pasos indicados por el protocolo. En todo momento se utilizó agua libre de ARNasas, para evitar la degradación y pérdida de los ARN que nos interesa analizar. El ARN extraído es resuspendido en agua libre de ARNasas y se utilizó para el análisis de genes que pueden sufrir alguna alteración en presencia de ácido carnósico. Para conocer la cantidad del ARN se utilizaron 2  $\mu\text{l}$  en el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 y así, poder realizar las diluciones para obtener la misma concentración de todas las muestras, 50  $\text{ng}/\mu\text{l}$ .

#### 6.5 Transcripción reversa y PCR a tiempo real

A partir de un de 4,5 $\mu\text{l}$  de ARN diluido se preparó la reacción de transcripción (RT) reversa en el Termociclador 2720 de *Applied biosystems*. Las muestras se calentaron a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos para desnaturalizar el ARN. Se preparó y añadió a cada muestra una mix (master mix) para poder iniciar la reacción de transcripción reversa que estaba compuesto de: 1.25 $\mu\text{L}$  de *M-MuLV Reverse Transcriptase Reaction Buffer* 10X, 1.25 $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25mM, 2 $\mu\text{L}$  de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 2.5mM, 0.5 $\mu\text{L}$  de *random hexamers* 50 $\mu\text{M}$ , 0.5 $\mu\text{L}$  de inhibidor de RNasas 20 U/ $\mu\text{L}$ , 0.5 $\mu\text{L}$  de transcriptasa reversa 50 U/ $\mu\text{L}$  y 1.5 $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasas. A cada muestra se añade 8  $\mu\text{l}$  de master mix.

Una vez realizada la RT y obtenidos los cDNA de las muestras se utilizó el *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* de *Applied Biosystems* para hacer una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). Se prepararon 8 mix distintas para medir los niveles de expresión del ARNm de Pparg 2, Lpl, Cd36 (estos tres relacionados con la adipogénesis/lipogénesis), Ucp1, Cd137, Tbx1, Cpt1b (estos últimos 4 genes relacionados con el proceso de marronización de adipocitos) y  $\beta$ -actina como control interno (*House Keeping*). Cada mix estaba compuesto por: 5 $\mu\text{l}$  de *Power SYBR® Green PCR Master Mix* 2X, 0.45  $\mu\text{l}$  para el *primer forward* y otros 0.45  $\mu\text{l}$  para el *reverse* y 3.1  $\mu\text{l}$  de agua libre de ARNasas. El volumen final de la reacción para cada muestra era de 11  $\mu\text{l}$  (2  $\mu\text{l}$  de cDNA y 9  $\mu\text{l}$  de mix). Los primers utilizados son:

GEN	FORWARD	REVERSE
$\beta$ -actina (Bac)	GTGGTGGTGAAGCTGTAGCG	GAGACCTCAAGACCCC
Ucp1	ACACCTGCCTCTCTCGAAA	TAGGCTGCCCAATGAACACT
Cpt1b	AAGGGTAGAGTGGGCAGAGG	GCAGGAGATAAGGGTCAAAGA
Cd137	ACAGTTTCAGTTGGATCTCATAGAC	CTCCTCCAGACAGGGATGC
Tbx1	ACCCTCGAAAAGACAGCGAG	TGCGTGATCCGGTGATTCTG
Pparg	AGACCACTCGCATTCTTTG	TCGCACTTTGGTATTCTTGG
Lpl	TTCAACCACAGCAGCAAGAC	CCACATCATTCCACCAG

Para calcular la expresión relativa de cada ARNm se utilizaron los métodos de M. W. Pfaffl (2001)<sup>44</sup>, siendo el gen de la  $\beta$ -actina el gen de normalización.

## 6.6 Análisis estadístico

Los datos son representados en forma de media con su valor de error estándar asociado (SEM). Las diferencias significativas de las observaciones experimentales han sido determinadas usando la prueba t de Student. El nivel de significación ha sido establecido a  $p < 0,05$ .

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 El ácido carnósico induce adipogénesis/lipogénesis en adipocitos maduros

Tras las 24 horas de tratamiento se observaron las células con el microscopio a 100 aumentos (figura 6). Las diferencias entre tratamientos y control (vehículo) son poco apreciables, más bien parece que hay un ligero aumento de las gotículas intracelulares de triglicéridos en los adipocitos, especialmente en las dosis de 0.1 y 1  $\mu\text{M}$  de ácido carnósico.

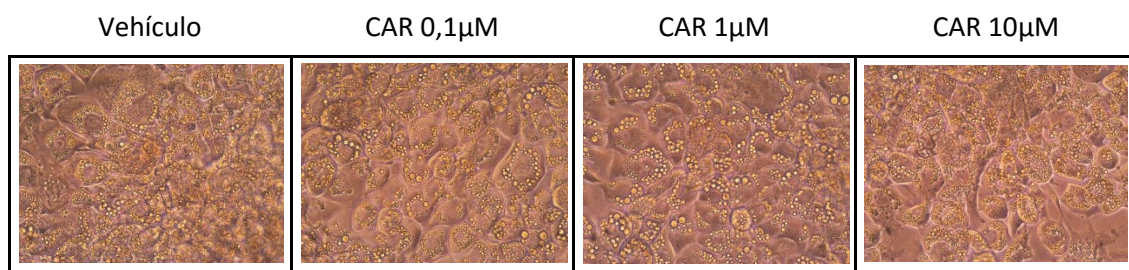


Figura 6. Micro-fotografías representativas de adipocitos 3T3-L1 diferenciados tratados durante 24h con dosis crecientes de ácido carnósico (CAR) o vehículo (DMSO). Magnificación (x100); CAR, ácido carnósico.

En concordancia con estos resultados, se observan un aumento de los niveles de expresión del ARNm para el receptor gamma activado por proliferadores peroxisomales 2 (Ppar $\gamma$  2), un receptor nuclear reconocido como regulador clave de la diferenciación y funcionalidad de los adipocitos (<sup>41,45</sup> entre otros) así como de los niveles de la lipoproteína lipasa (Lpl) y del transportador de ácidos grasos, Cd36 (Figura 7), cuya expresión está controlada por la actividad del propio Ppar $\gamma$  2 (<sup>45,46</sup> entre otros).

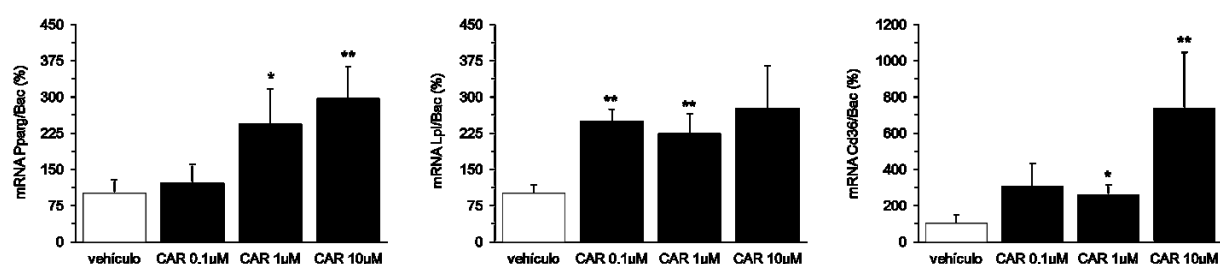


Figura 7. Niveles de ARNm de distintos genes adipogénicos en adipocitos 3T3-L1 diferenciados tratados durante 24h con dosis crecientes de ácido carnósico (CAR) o vehículo (DMSO). Se representa la media  $\pm$  SEM (n=4-5) de los valores relativos respecto a las células tratadas con vehículo (100%). Se usó la  $\beta$ -actina como gen de referencia. Las diferencias significativas versus vehículo se estudiaron con el test t-student: \* $p < 0,1$ , \*\* $p < 0,05$ ; CAR, ácido carnósico.

Estos resultados no son los mismos que los observados en preadipocitos tratados crónicamente con el ácido carnósico. Según la bibliografía consultada, cuando la línea celular 3T3-L1 es tratada durante la diferenciación con ácido carnósico se produce una disminución de la adiposidad de las células, previniendo la captación de triglicéridos. Este cambio es muy evidente con las concentraciones de 1 y 10  $\mu\text{M}$ <sup>37</sup>.

## 7.2 El ácido carnósico induce algunos genes relacionados con el proceso de marronización en adipocitos maduros

El tratamiento con ácido carnósico durante 24 horas de los adipocitos maduros incrementa (x10) los niveles de expresión Cpt1b, proteína clave de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos<sup>47</sup>, y los niveles de Cd137 (x20), proteína de función desconocida y recientemente identificado como marcador del proceso de marronización<sup>48</sup>, si bien no se observan variaciones en los niveles de Ucp1 y Tbx1, también marcadores del proceso de marronización<sup>48,49</sup>. Si bien la expresión de estos genes es muy baja en 3T3-L1 (ct>30) los resultados obtenidos a nivel de expresión génica (Cpt1b y Cd36) sugieren un incremento de la utilización de ácidos grasos y activación del proceso de marronización (Cd137), especialmente en las dosis más altas tratadas, dosis en la que precisamente el efecto del ácido carnósico sobre las gotículas intracelulares de lípidos empieza a disminuir (se ven gotículas de lípidos más pequeñas en dosis de 10  $\mu$ M, figura 6).

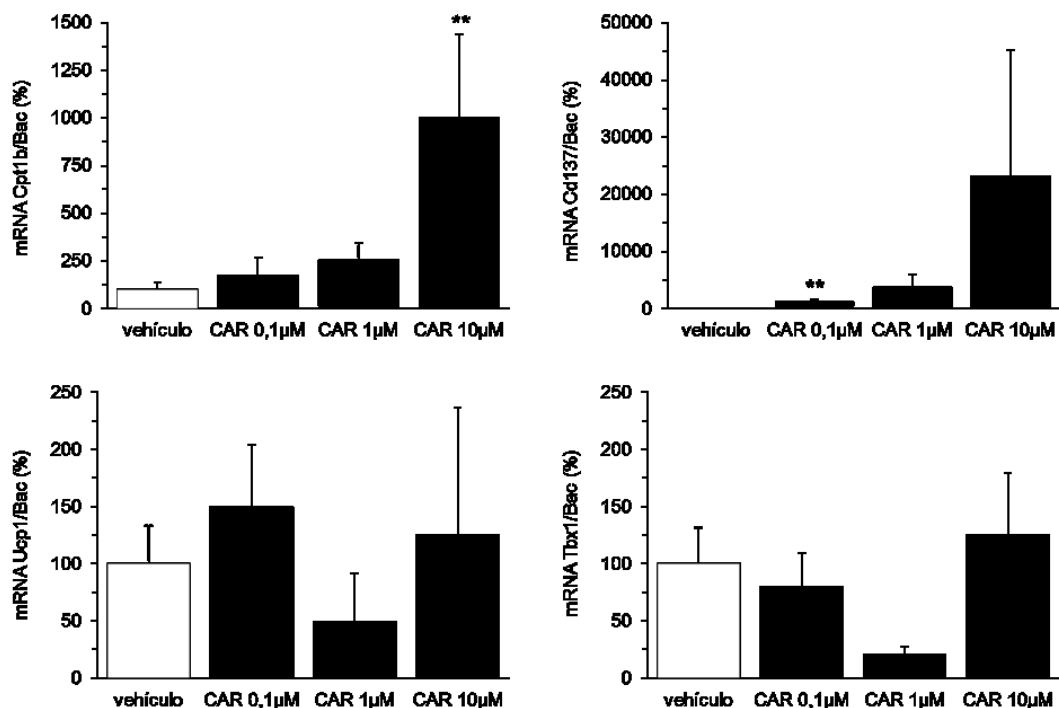


Figura 8. Niveles de ARNm de distintos genes adipogénicos en adipocitos 3T3-L1 diferenciados tratados durante 24h con dosis crecientes de ácido carnósico (CAR) o vehículo (DMSO). Se representa la media  $\pm$  SEM (n=4-5) de los valores relativos respecto a las células tratadas con vehículo (100%). Se usó la  $\beta$ -actina como gen de referencia. Las diferencias significativas versus vehículo se estudiaron con el test t-student: \*p<0,1, \*\*p<0,05; CAR, ácido carnósico.

## 8. CONCLUSIÓN GENERAL

Después de la búsqueda de información y de la realización del presente proyecto se puede concluir lo siguiente:

- El romero presenta componentes bioactivos interesantes que pueden justificar algunas de las propiedades otorgadas a la planta durante su uso en múltiples ámbitos. Una buena cantidad de compuestos que se han extraído del romero tienen un potencial muy alto para su uso en beneficio de la salud, ya sea en forma de preparados, como el aceite o el alcohol de romero, o en compuestos puros.
- La composición química del romero varía en función de su origen, siendo los compuestos puros más importantes del romero el ácido carnósico y el ácido rosmarínico, ambos se encuentran entre los compuestos más abundantes presentes en las plantas de romero, sea cual sea su lugar de origen.



- Estos compuestos puros, entre otros, y los preparados de romero han demostrado tener efectos positivos y alentadores sobre diferentes enfermedades o estímulos patológicos, como son el cáncer, enfermedades vasculares, neurodegenerativas, esteatosis hepática y obesidad, entre otras. Todos estos estudios, eso sí, realizados en animales o modelos celulares pero que son muy interesantes para una futura investigación en humanos.
- El ácido carnósico se ha presentado como principal candidato para el tratamiento de la obesidad, debido a que en diferentes estudios se ve una mejoría más notoria de la reducción de la adiposidad en preadipocitos en fase de maduración a adipocitos que cualquier otro componente del romero.
- Pese a que el romero es bastante tolerado por animales y humanos puede tener efectos secundarios sobre personas alérgicas, epilépticas y niños, siendo un alimento prohibitivo para embarazadas. Grandes dosis de aceite de romero puede provocar genotoxicidad.
- Respecto al trabajo experimental podríamos concluir, por un lado, que el tratamiento de adipocitos maduros con ácido carnósico induce a la acumulación de triglicéridos en estas células, tal y como se puede apreciar en las imágenes capturadas con el microscopio (figura 6), en especial en las dosis 0,1 y 1  $\mu\text{M}$ . Los genes Lpl y Cd36 expresan proteínas relacionados con la captación de lípidos por parte de los adipocitos y se ven alterados en presencia de ácido carnósico, la expresión de estos genes aumenta, junto con la expresión de Ppar $\gamma$  2. Este último gen contrala la expresión de los dos anteriores, Lpl y Cd36.
- Por otra parte, algunos genes relacionados con la  $\beta$ -oxidación y el proceso de marronización de los adipocitos blancos (Cpt1b, Cd137 y Cd36) son inducidos por el ácido carnósico, siendo más evidente el efecto en la dosis más alta (10  $\mu\text{M}$ ). Si bien cabe mencionar que su expresión en los adipocitos maduros es muy baja (ct <30) de ahí los grandes errores observados.
- Estos resultados nos llevan a concluir que el ácido carnósico induce el proceso de marronización de las células 3T3-L1 maduras.

## 9. AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en primer lugar a mi tutor, el Dr. Joan Ribot Riutort, por confiar en mí para elaborar el Trabajo de Fin de Grado propuesto por él, además del tiempo dedicado para poder enseñar y guiarme en la realización de este proyecto, tanto a nivel teórico como práctico. También quiero agradecerle la oportunidad que me dio al concederme la plaza como alumno colaborador y de esta manera poder aprender más y aumentar mi experiencia dentro de los laboratorios. No solo me gustaría agradecerle a nivel académico, sino también por los consejos que he recibido por su parte a nivel personal y profesional, consejos que serán útiles a lo largo de mi carrera como bioquímico.

Por otro lado, me gustaría agradecer también a los que hayan participado y colaborado en la elaboración del trabajo experimental, el estudiante de doctorado en nutrigenómica Alberto Ángel Martín, quien me ayudó en el cultivo celular, y a quien le agradezco su apoyo en todo momento durante el trabajo de laboratorio. De la misma manera, me gustaría agradecer a mi compañero de carrera, Youssef Ahmiane, alumno colaborador del Dr. Joan Ribot, por colaborar en el trabajo de laboratorio y sus consejos a lo largo del curso para la elaboración del presente proyecto.

También quiero agradecer de forma especial a mis dos compañeras de carrera, Zhi Xin Yau Qiu y Nuria Gayà Caro, por su apoyo incondicional, por sus consejos y, sin duda alguna, por su compañía a lo largo de estos 5 años. No puedo olvidarme del Sr. Mateo Gayà Llodrà, a quien agradezco su ayuda y sus consejos lingüísticos para la redacción del presente documento.

Por último, y no menos importante, me gustaría agradecer a mi familia por apoyar y animar la decisión de dedicarme a la ciencia y estudiar Bioquímica, por el gran esfuerzo realizado durante estos años por parte de mis padres, Ricardo Soliz Castro y Gloria Rueda Machicado, para que pueda disfrutar del estudio universitario en España y, por supuesto, este agradecimiento incluye a mis abuelos, Jorge Rueda Castellón y Rosario Machicado, por su apoyo y los ánimos que he recibido desde la distancia para que demuestre lo que valgo.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. LÓPEZ LUENGO, M. T. El romero. Planta aromática con efectos antioxidantes. *Offarm* **27**, 60–63 (2008).
2. al-Sereiti, M. R., Abu-Amer, K. M. & Sen, P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian J. Exp. Biol.* **37**, 124–30 (1999).
3. Castro, C. O. de & Núñez, D. R. *Las plantas medicinales de nuestra región*. (Editora Regional de Murcia, 1991). at <<https://books.google.com/books?id=tQL2Bx77d6EC&pgis=1>>
4. Green, A. *El Libro de Las Especies: Hierbas Aromáticas Y Especies*. (Ediciones Robinbook, 2007). at <[https://books.google.com/books?id=u\\_H8R3fdi8IC&pgis=1](https://books.google.com/books?id=u_H8R3fdi8IC&pgis=1)>
5. Mejía, M. C. A. *Plantas medicinales: botanica de interest medico*. (María Cristina Arango Mejía, 2006). at <<https://books.google.com/books?id=fefaqvWHHoYC&pgis=1>>
6. Quer, P. F. *Plantas medicinales: el Dioscórides renovado. Con la descripción de 678 especies, acompañada de 752 figuras originales, 58 mapas y 33 láminas fuera de texto, 20 de ellas en color*. (Península, 1999). at <<https://books.google.com/books?id=J5KaPQAACAAJ&pgis=1>>
7. Quer, P. F. i. *Diccionario de botánica*. (Labor, 2001). at <<https://books.google.com/books?id=MXPjNAAACAAJ&pgis=1>>
8. Quer, P. F. *Botánica pintoresca*. (Peninsular, 2003). at <<https://books.google.com/books?id=eYZyngEACAAJ&pgis=1>>
9. González Michel, Á., Cruz Falcón, A. & Vega Mayagoitia, J. E. Guía técnica del cultivo de romero (*Rosmarinus officinalis*). (2013). at <<http://intranet.cibnor.mx/personal/bmurillo/docs/manual-romero-final.pdf>>
10. Castro Restrepo, D. *et al.* Cultivo y producción de plantas aromáticas y medicinales. (2013). at <<http://www.uco.edu.co/investigacion/fondoeditorial/libros/Documents/Libro Plantas Aromaticas 2013.pdf>>
11. Duke, J. A. *La Farmacia natural: El experto en hierbas más renombrado del mundo revela los últimos descubrimientos sobre las hierbas curativas más poderosas para prevenir y tratar más de 100 problemas comunes de la salud*. (Rodale, 1998). at <<https://books.google.com/books?id=QXPS6H6TleYC&pgis=1>>
12. PubMed - NCBI. at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>
13. ScienceDirect. at <[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)>

14. Google Libros. at  
<<https://books.google.es/bkshp?hl=es&tab=wp&ei=n7jcVZG6B8m6aca9jLAO&ved=0CA4QqS4oDg>>
15. Ruiz, P. G. *Productos naturales*. (2002). at  
<[https://books.google.es/books/about/Productos\\_naturales.html?id=OZRXAAAACAAJ&pgis=1](https://books.google.es/books/about/Productos_naturales.html?id=OZRXAAAACAAJ&pgis=1)>
16. Atti-Santos, A. C. *et al.* Physico-chemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **48**, 1035–1039 (2005).
17. Tschiggerl, C. & Bucar, F. Investigation of the volatile fraction of rosemary infusion extracts. *Sci. Pharm.* **78**, 483–92 (2010).
18. Borrás-Linares, I. *et al.* *Rosmarinus officinalis* leaves as a natural source of bioactive compounds. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 20585–606 (2014).
19. Birtić, S., Dussort, P., Pierre, F.-X., Bily, A. C. & Roller, M. Carnosic acid. *Phytochemistry* **115**, 9–19 (2015).
20. Tounekti, T. & Munné-Bosch, S. Enhanced Phenolic Diterpenes Antioxidant Levels Through Non-transgenic Approaches. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **31**, 505–519 (2012).
21. Brückner, K. *et al.* Characterization of two genes for the biosynthesis of abietane-type diterpenes in rosemary (*Rosmarinus officinalis*) glandular trichomes. *Phytochemistry* **101**, 52–64 (2014).
22. Kim, G.-D., Park, Y. S., Jin, Y.-H. & Park, C.-S. Production and applications of rosmarinic acid and structurally related compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 2083–92 (2015).
23. Petersen, M. *et al.* Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry* **70**, 1663–79
24. Petersen, M. Rosmarinic acid. *Phytochemistry* **62**, 121–125 (2003).
25. Pérez-Sánchez, A. *et al.* Protective effects of citrus and rosemary extracts on UV-induced damage in skin cell model and human volunteers. *J. Photochem. Photobiol. B.* **136**, 12–8 (2014).
26. Naemura, A., Ura, M., Yamashita, T., Arai, R. & Yamamoto, J. Long-term intake of rosemary and common thyme herbs inhibits experimental thrombosis without prolongation of bleeding time. *Thromb. Res.* **122**, 517–22 (2008).
27. Sotnikova, R. *et al.* Rosmarinic acid administration attenuates diabetes-induced vascular dysfunction of the rat aorta. *J. Pharm. Pharmacol.* **65**, 713–23 (2013).

28. Rašković, A. *et al.* Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complement. Altern. Med.* **14**, 225 (2014).
29. Park, M.-Y. & Mun, S. T. Dietary carnosic acid suppresses hepatic steatosis formation via regulation of hepatic fatty acid metabolism in high-fat diet-fed mice. *Nutr. Res. Pract.* **7**, 294–301 (2013).
30. Costa, R. S. *et al.* *Ocimum gratissimum* Linn. and rosmarinic acid, attenuate eosinophilic airway inflammation in an experimental model of respiratory allergy to *Blomia tropicalis*. *Int. Immunopharmacol.* **13**, 126–34 (2012).
31. Iuvone, T., De Filippis, D., Esposito, G., D'Amico, A. & Izzo, A. A. The spice sage and its active ingredient rosmarinic acid protect PC12 cells from amyloid-beta peptide-induced neurotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **317**, 1143–9 (2006).
32. Rasoolijazi, H. *et al.* The protective role of carnosic acid against beta-amyloid toxicity in rats. *ScientificWorldJournal.* **2013**, 917082 (2013).
33. Rasoolijazi, H. *et al.* The effect of rosemary extract on spatial memory, learning and antioxidant enzymes activities in the hippocampus of middle-aged rats. *Med. J. Islam. Repub. Iran* **29**, 187 (2015).
34. Cattaneo, L. *et al.* Anti-Proliferative Effect of *Rosmarinus officinalis* L. Extract on Human Melanoma A375 Cells. *PLoS One* **10**, e0132439 (2015).
35. Romo-Vaquero, M. *et al.* A rosemary extract rich in carnosic acid selectively modulates caecum microbiota and inhibits  $\beta$ -glucosidase activity, altering fiber and short chain fatty acids fecal excretion in lean and obese female rats. *PLoS One* **9**, e94687 (2014).
36. Gaya, M. *et al.* Antiadipogenic effect of carnosic acid, a natural compound present in *Rosmarinus officinalis*, is exerted through the C/EBPs and PPAR $\gamma$  pathways at the onset of the differentiation program. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**, 3796–806 (2013).
37. Park, M.-Y. & Sung, M.-K. Carnosic Acid Inhibits Lipid Accumulation in 3T3-L1 Adipocytes Through Attenuation of Fatty Acid Desaturation. *J. cancer Prev.* **20**, 41–9 (2015).
38. Damasco, D. C. & Lemonica, I. P. Embryotoxicity and anti-implantation effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in pregnant rats within preimplantation period. *Rev. bras. toxicol* **12**, 47–54
39. Maistro, E. L., Mota, S. F., Lima, E. B., Bernardes, B. M. & Goulart, F. C. Genotoxicity and mutagenicity of *Rosmarinus officinalis* (Labiatae) essential oil in mammalian cells in vivo. *Genet. Mol. Res.* **9**, 2113–22 (2010).
40. Cinti, S. The adipose organ. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* **73**, 9–15 (2005).

41. Cinti, S. The role of brown adipose tissue in human obesity. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **16**, 569–74 (2006).
42. Ishibashi, J. & Seale, P. Medicine. Beige can be slimming. *Science* **328**, 1113–4 (2010).
43. 3T3-L1 Cell Care Manual Maintenance and Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes to Adipocytes. *Differentiation* 1–9 (2010).
44. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
45. Aoyagi, R., Funakoshi-Tago, M., Fujiwara, Y. & Tamura, H. Coffee inhibits adipocyte differentiation via inactivation of PPAR $\gamma$ . *Biol. Pharm. Bull.* **37**, 1820–5 (2014).
46. Shu, G. *et al.* Phloretin promotes adipocyte differentiation in vitro and improves glucose homeostasis in vivo. *J. Nutr. Biochem.* **25**, 1296–308 (2014).
47. Zammit, V. A. Carnitine palmitoyltransferase 1: central to cell function. *IUBMB Life* **60**, 347–54 (2008).
48. De Jong, J. M. A., Larsson, O., Cannon, B. & Nedergaard, J. A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **308**, E1085–105 (2015).
49. Okamatsu-Ogura, Y. *et al.* Thermogenic ability of uncoupling protein 1 in beige adipocytes in mice. *PLoS One* **8**, e84229 (2013).