

Antimicrobial bioactivity of the phenolic extract assisted by ultrasound from the solid waste post-distillation of essential oil of *Rosmarinus officinalis*

Joel Americo Alejandria-Lopez¹; Niels Carl Marquez-Soto¹; Roberto Chuquilín-Goicochea¹

¹Universidad Privada del Norte, Perú, N00286446@upn.pe, N00258850@upn.pe, roberto.chuquilin@upn.edu.pe

Abstract— The post-distillation residues of essential oil from medicinal and aromatic plants represent 98% of the raw material and can be utilized as natural sources of bioactive compounds with various types of bioactivities. This work aims to evaluate the effect of three extraction methods on the total polyphenol content and the antimicrobial activity of the phenolic extracts obtained from these residues. The total polyphenol content (TPC) was evaluated using the Folin-Ciocalteu method, and the antimicrobial activity was assessed using disk diffusion and dilution methods of the extracts obtained with three methods: maceration (M), ultrasound and maceration (US+M), and ultrasound (US) against *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* ranging from 31.25 to 500 mg/L. The M extracts showed the highest total polyphenol content (7911 ± 51 GAE mg/mL), while the highest antimicrobial activity was observed against *E. coli*. The minimum inhibitory concentration for *E. coli* was 500 mg/L, and for *B. subtilis*, it could not be determined within the study range. The experimental findings pointed to the potential use of post-distillation residue extracts of rosemary essential oil as antimicrobials in foods susceptible to *E. coli*.

Keywords—Herbs, solid residues, ethanolic extracts, antibacterial effect, biological activity, valorization.

Bioactividad antimicrobiana del extracto fenólico asistido por ultrasonido de los residuos sólidos post-destilación del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*

Joel Americo Alejandria-Lopez¹; Niels Carl Marquez-Soto¹; Roberto Chuquilín-Goicochea¹
¹Universidad Privada del Norte, Perú, N00286446@upn.pe, N00258850@upn.pe, roberto.chuquilin@upn.edu.pe

Resumen— Los residuos post-destilación de aceite esencial de plantas medicinales y aromáticas representan el 98% de la materia prima y pueden aprovecharse como fuentes naturales de compuestos bioactivos con diversos tipos de bioactividad. Este trabajo busca evaluar el efecto de tres métodos de extracción en el contenido de polifenoles totales y la actividad antimicrobiana de los extractos fenólicos obtenidos a partir de estos residuos. Se evaluó el contenido de polifenoles totales (CPT) mediante el método Folin-Ciocalteu y la actividad antimicrobiana, usando métodos de difusión en discos y dilución de los extractos obtenidos con tres métodos: maceración (M), ultrasonido y maceración (US+M) y ultrasonido (US) contra *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* en concentraciones de 31,25 a 500 EAG mg/L. Los extractos M mostraron el mayor contenido de polifenoles totales (7911 ± 51 mg/L), mientras que la mayor actividad antimicrobiana se presentó contra el *E. coli*. La concentración mínima inhibitoria para *E. coli* fue de 500 EAG mg/L y para *B. subtilis* no pudo determinarse dentro del rango de estudio. Los hallazgos experimentales apuntaron al uso potencial de extractos de residuos postdestilación de aceite esencial de romero como antimicrobianos en alimentos susceptibles a *E. coli*.

Palabras clave—Hierbas; residuos sólidos; extractos etanólicos, efecto antibacteriano; actividad biológica; valorización.

I. INTRODUCCIÓN

La valorización de residuos agroindustriales adquirió un gran interés en la investigación actual debido a su potencial para obtener compuestos bioactivos con muy buenas aplicaciones funcionales, así como para reducir el impacto ambiental relacionado en todo el trayecto de la disposición de estos desechos o subproductos. En singular, los residuos sólidos de post-destilación de plantas aromáticas como el romero representan una fuente abundante de polifenoles que conservan las actividades biológicas significativas luego de la extracción de aceites esenciales, permitiendo su aprovechamiento como materias primas de alto valor añadido [1].

Rosmarinus officinalis L. (romero) es una planta aromática de la familia Lamiaceae, es muy utilizada en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética por sus propiedades antioxidantes y bioactivas, principalmente atribuidas a compuestos fenólicos como el ácido rosmarínico, carnosol y sus derivados [1]. Aunque el principal producto industrial es el aceite esencial, que representa aproximadamente entre 0,3% y 2,5% del peso seco de la planta, después de la destilación queda una gran cantidad de residuo sólido con un contenido considerable de compuestos antioxidantes que no han sido completamente eliminados durante el proceso [2].

La extracción de los polifenoles mediante los métodos sostenibles, como la maceración sólido-líquido con solventes hidroalcohólicos, facilita la recuperación de dichas sustancias bioactivas sin comprometer su integridad química, resultando en extractos con alta capacidad antioxidante y con un potencial aplicación biológica [3]. La cuantificación de compuestos fenólicos totales se realiza comúnmente mediante el método de Folin-Ciocalteu, expresándose como equivalentes de ácido gálico (EAG), lo que permite comparar la abundancia relativa de estas moléculas en distintos extractos [3].

Muy aparte de la actividad antioxidante, los polifenoles vegetales han mostrado capacidad para interactuar con estructuras celulares de microorganismos y alterar sus funciones fisiológicas esenciales, lo cual puede conducir a la inhibición del crecimiento bacteriano o incluso a la muerte de las células patógenas que tienen una multiplicación en un corto tiempo [4]. Especialmente extractos de *Rosmarinus officinalis* han demostrado efecto antimicrobiano en estudios *in vitro*, tanto con bacterias Gram-positivas como *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*, como frente a bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*, con efectos dependientes de la concentración de extracto y de la composición de los compuestos fenólicos presentes [1].

La eficacia antimicrobiana de extractos de romero se ha observado también en diversos estudios independientes, donde se reporta que extractos etanólicos o hidroalcohólicos de esta planta pueden inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*, con diámetros de halos de inhibición observados en ensayos de difusión en disco y concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) relevantes según la metodología microbiológica empleada [5]. Semejante a ello, otros compuestos fenólicos presentes en estos extractos, como ácido rosmarínico y diterpenos fenólicos, han sido asociado con mecanismos de interacción a nivel de membrana celular y procesos metabólicos bacterianos que culminan en efectos bacteriostáticos o bactericidas [1].

No obstante, existe aún una brecha en la literatura científica respecto a los estudios integrales que relacionan la valorización del residuo post-destilación de romero, la obtención de polifenoles mediante maceración sostenible y la evaluación directa de su actividad antibacteriana frente a bacterias tanto Gram – positivas como *Bacillus spp.* Como Gram-negativas como *Escherichia coli*. Superar esta brecha contribuirá a diversificar las aplicaciones de productos naturales para actividades biológicas comprobadas y abrir oportunidades para

su uso funcional en sectores alimentarios, farmacéuticos y ambientales.

Este trabajo ofrece respaldo experimental para la revalorización de los desechos de post-distilación de *Rosmarinus officinalis*. A través del análisis comparativo entre la extracción convencional y la asistida por ultrasonido, se vincula el rendimiento de los polifenoles con su capacidad antimicrobiana. El valor diferencial de esta investigación radica en conectar el método extractivo con el impacto biológico, proponiendo alternativas sostenibles para la gestión de residuos agroindustriales.

En este sentido, el presente estudio tiene como objetivo valorar el residuo post-distilación de *Rosmarinus officinalis* mediante maceración para la obtención de polifenoles y evaluar su efecto antibacteriano frente a *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* proporcionando evidencia científica sobre el uso de residuos aromáticos como fuente de agentes naturales con actividad antimicrobiana y promoviendo enfoques sostenibles para su aprovechamiento integral.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Material

El residuo sólido resultante de la destilación de aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) (RPAER) consistió en hojas empobrecidas en aceite esencial, suministradas por la empresa Agroensancha S.R.L., una empresa que comercializa aceite esencial de orégano con elevados estándares de calidad a escala global. Se sometieron a un proceso de deshidratación a 50 °C en una estufa (Mettler, SF160, Alemania) durante 17 horas, antes de ser envasados al vacío.

B. Reactivos

El compuesto Folin-Ciocalteu (Merck, Alemania), el ácido gálico (Merck, Alemania) como referencia, y el carbonato de sodio (Merck, Alemania), todos de grado analítico. Las soluciones fueron elaboradas mediante el uso de agua destilada. Adicionalmente, agar agar (Millipore, Alemania) y caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Millipore, Alemania), ambos con un alto grado de microbiactividad. Solución salina de cloruro de sodio (SSF) (Hamburger, Países bajos) todos los medios de cultivo y los reactivos microbiológicos se elaboraron siguiendo las directrices del fabricante y se sometieron a esterilización previo a su aplicación.

C. Obtención del extracto

Las muestras fueron sometidas a inspección manual con el objetivo de eliminar impurezas perceptibles y garantizar la uniformidad del material. Se elaboró una solución extractora de etanol con una concentración del 50%. Posteriormente, se diluyeron 50 g de RPAER en 1 L de solución extractora. La asignación de la disolución se realizó bajo tres condiciones diferenciadas: RPAER macerado (M), RPAER sometido a ultrasonido y posterior maceración (US+M), y RPAER sometido a ultrasonido (US). La extracción mediante ultrasonido (US) se efectuó utilizando una probeta ultrasonido

(Biobase, UCD 950, China), con una potencia de 400 watts, un tiempo de 1 hora, un intervalo de 20 segundos y una temperatura menor a los 35 °C. La maceración se efectuó durante un periodo de 60 días en ambos casos (M y US+M). Las muestras se conservaron en contenedores de esterilización de color ámbar, resguardados de la luz y la humedad, hasta su procesamiento. La molienda ni el fraccionamiento por tamaño de partícula fueron llevados a cabo, dado que el propósito del estudio fue contrastar la eficiencia extractiva entre diversos métodos de procesamiento, evitando así la evaluación de efectos granulométricos.

Se estableció un periodo de maceración de 60 días fundamentado en investigaciones previas, las cuales sugieren que tiempos extensos optimizan la difusión de compuestos fenólicos y el equilibrio sólido-líquido. Esta duración es crucial al trabajar con matrices residuales de post-distilación, ya que las estructuras celulares más rígidas de estos desechos requieren una exposición prolongada al solvente para facilitar la liberación y recuperación de los compuestos bioactivos retenidos. [6].

D. Diseño de la curva de calibración

Se elaboraron diez soluciones de referencia con concentraciones de ácido gálico que oscilaban entre 10 y 100 mg/L, con incrementos de 10 mg/L. La determinación del contenido total de fenoles (TPC) en los extractos se realizó mediante el uso del reactivo Folin-Ciocalteu, siguiendo el procedimiento de Singleton et al. [7], utilizando un espectrómetro UV-Vis T90+ (T90+, PG Instruments, Leicestershire, Reino Unido). El análisis se llevó a cabo por triplicado, empleando una dilución de 1/150 y se elaboró la curva de calibración requerida (Fig. 1).

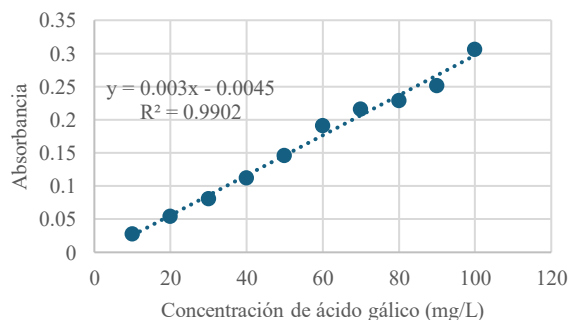


Fig. 1 Curva de calibración de polifenoles totales.

E. Determinación de polifenoles totales

Para cada muestra de extracto RPAER (diluida 1/100) y solución patrón, se tomó un volumen de 0,5 mL, al que se añadieron 2,5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu al 10% (V/V). La mezcla fue sometida a reposo durante cinco minutos, tras lo cual se incorporaron dos mililitros de solución de carbonato de sodio al 10% (P/V). La reacción se llevó a cabo en un baño maría a una temperatura de 45 °C por 15 minutos. Tras el enfriamiento, se llevó a cabo la medición de absorbancia a una

temperatura de 765 nm. La absorbancia corregida se determinó sustrayendo el valor del blanco, elaborado con los mismos reactivos, pero sin la inclusión de una muestra [8].

F. Preparación de las cepas bacterianas

Las muestras de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* empleadas en esta investigación se extrajeron del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional de Trujillo, Perú. Cada cepa fue inicialmente plantada en agar nutritivo en tubos inclinados con el objetivo de preservación temporal. Los cultivos fueron sometidos a incubación a una temperatura de 36 °C durante un período de 24 horas con el objetivo de garantizar que ambas bacterias alcanzaran su fase logarítmica de desarrollo. Tras el proceso de incubación, las colonias formadas fueron resuspendidas en 1 mL de caldo BHI estéril y posteriormente homogenizadas en 20 mL de una mezcla 1:1 de solución salina estéril (0,9%), resultando en la obtención del inóculo base para los ensayos microbiológicos [9].

G. Preparación del ensayo microbiológico

Se utilizó el extracto de RPAER para los ensayos antimicrobianos; teniendo en cuenta una concentración mínima inhibitoria (CMI) teórica de 3000 EAG mg/L [1] se realizaron siete diluciones sucesivas. Para las dos primeras diluciones se empleó solución salina de cloruro de sodio (SSF – NaCl) como diluyente y las cinco diluciones posteriores del extracto utilizando caldo BHI estéril como diluyente. Todas las diluciones se elaboraron bajo condiciones asépticas y se homogeneizaron de manera adecuada antes de su incorporación en los ensayos antimicrobianos en tubos; para las pruebas microbiológicas se emplearon las cinco últimas diluciones [10].

H. Ensayo de difusión en discos para la evaluación de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana del extracto de RPAER presente en el residuo fue examinada a través del procedimiento de difusión en discos de agar. Se procedió a la preparación de discos de papel de filtro de tipo Whatman mediante el uso de un perforador. Estos fueron colocados en placas Petri, sellados con papel Kraft y esterilizados en autoclave a 121 °C durante un período de 15 minutos. Se llevaron a cabo cinco diluciones del extracto en tubos de ensayo conteniendo caldo Brain Heart Infusion (BHI), impregnando los discos estériles en cada una de las diluciones [9]. A continuación, se emplearon las placas Petri con medio sólido previamente inoculado con los cultivos bacterianos recientes para la colocación de los discos impregnados, los cuales fueron meticulosamente distribuidos sobre la superficie del agar. Las placas fueron sometidas a incubación en condiciones propicias para el desarrollo bacteriano. Al concluir el período de incubación, la actividad antimicrobiana se evaluó a través de la cuantificación de los halos de inhibición que se formaron alrededor de cada disco, expresados en milímetros. Se consideró que la presencia de áreas claras sin proliferación bacteriana es un indicativo de efecto antimicrobiano. Como tratamiento control se empleó una

solución de extracción de etanol al 50%, en la misma proporción utilizada para la obtención del extracto; dicha solución, libre de extracto vegetal, fue sometida al mismo procedimiento experimental, impregnándose discos de papel de filtro estériles con el control y colocándolos sobre las placas Petri previamente inoculadas, con la finalidad de descartar cualquier efecto antimicrobiano atribuible al solvente y asegurar que los halos de inhibición observados se debieran exclusivamente a la acción del extracto de RPAER.

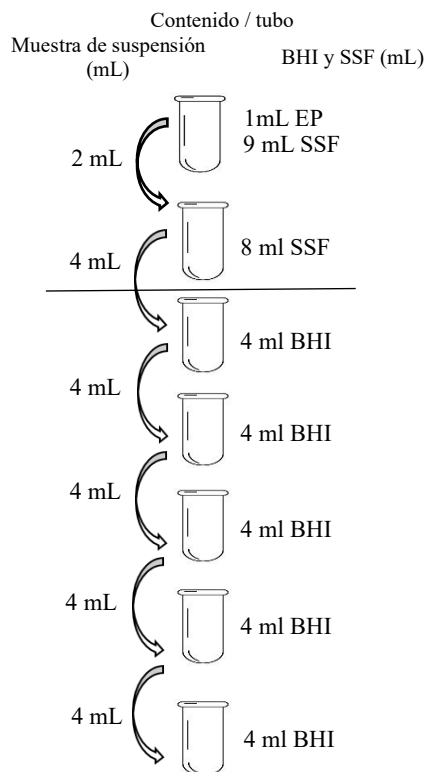


Fig. 2 Diluciones para determinación del CMI

Una limitación metodológica de este trabajo fue la omisión de un control positivo en las pruebas microbiológicas, lo que impide contrastar la potencia del extracto frente a antibióticos comerciales. Para fortalecer la validez de los resultados en estudios posteriores, se sugiere integrar agentes de referencia que permitan situar la efectividad del extracto en un contexto clínico o industrial más preciso.

I. Análisis estadístico

La información referente al contenido total de polifenoles fue sometida a un análisis de varianza (ANVA) para un diseño completo al azar (DCA) [11]. Adicionalmente, se empleó un gráfico de tipo boxplot. Se utilizó la versión 19 del software Minitab.

III. RESULTADOS

A. Contenido de polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales (CPT), expresado en mg de equivalente de ácido gálico por L de extracto de RPAER (EAG mg/L), de los tres extractos de RPAER se muestra en la Tabla I. El extracto que se obtuvo mediante la maceración hidroetanólica presentó un mayor contenido de polifenoles totales (7911 EAG mg/L) determinado mediante el método de Folin-Ciocalteu. Además, se puede observar que el extracto US + M le precede con un CPT estadísticamente similar (7689 ± 51 EAG mg/L). El resultado con el tratamiento US mostró el menor CPT (2756 ± 107 EAG mg/L) y fue estadísticamente diferente a los dos tratamientos anteriores.

TABLA I
CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES EN LOS EXTRACTOS OBTENIDOS
CON LOS TRES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Réplica	Método de extracción		
	M	US+M	US
1	7900	7667	2833
2	7867	7600	2800
3	7967	7800	2633
Promedio (EAG mg/L)	7911 ^a	7689 ^a	2756 ^b
Desviación estándar (EAG mg/L)	51	102	107
Coefficiente de Variación (%)	1%	1%	4%

Este resultado confirma que el proceso de destilación realizado del aceite esencial de romero no remueve completamente los compuestos fenólicos y permanece una fracción considerable en biomasa residual, denominada en este trabajo como RPAER. En un estudio, donde se analizaron los CPT en residuos de aceite esencial de romero, el RPAER contenía el más bajo CPT de los residuos [4].

En la Tabla II, se observa el análisis de varianza, y se observa que, existen diferencias significativas ($p < 0,05$). Se esperaba que la extracción con US supere a los otros 2 tratamientos; sin embargo, no se dio dicho resultado (Fig. 4) Diversos autores han señalado a la tecnología de extracción asistida por ultrasonido como una alternativa verde de alto rendimiento para la recuperación de polifenoles de residuos de la industria del té y del *Phellodendron amurense* [12], [13]. La eficiencia de la extracción de polifenoles con US se puede atribuir a la reducción de la cantidad e intensidad de la cavitación acústica, que destruye las paredes celulares y permite el paso de los metabolitos secundarios [14].

Se exponen resultados similares de Psarrou et al. [2] y de Bouloumpasi et al. [1], quienes demostraron que los residuos sólidos del romero conservan altas concentraciones de ácido rosmarínico, carnosol y ácido carnósico, incluso después de procesos térmicos como la hidrodestilación de aceite esencial. Asimismo, Skendi et al. [15] señalaron que estos residuos pueden contener concentraciones de polifenoles comparables o

incluso superiores a las de la materia prima original, dependiendo del método de extracción aplicado.

TABLA II
ANÁLISIS DE VARIANZA DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES EN
LOS EXTRACTOS DE RPAER

Fuente	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	P
Factor	2	50966914	25483457	0.000*
Error	6	48889	8148	
Total	8	51015802		

*Significativo a $p < 0,05$.

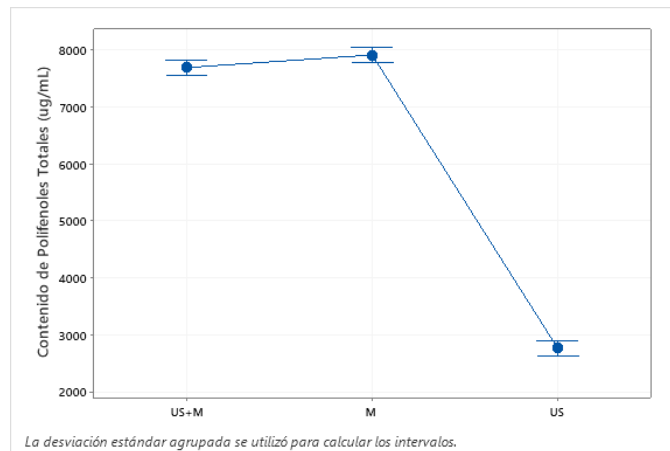


Fig. 3. Boxplot de contenido de polifenoles totales.

La eficiencia del proceso de maceración empleado en este estudio coincide con lo reportado por Vella y Laratta [3] quienes destacan que los solventes hidroetanólicos favorecen la solubilización de compuestos fenólicos de naturaleza polar y semipolar presentes en matrices vegetales residuales. Por otro lado, Bouloumpasi et al. [1] indican que la maceración prolongada favorece la difusión de compuestos fenólicos desde la matriz vegetal, especialmente en RPAER donde las estructuras de las células pueden requerir de un mayor tiempo para una extracción eficiente. Hcini et al. [16] comenta que, aunque el ultrasonido es reconocido por mejorarla ruptura celular y acelerar la transferencia de masa, su aplicación aislada puede generar degradación parcial de compuestos fenólicos sensibles a la cavitación, de igual manera lo señalaron en sus estudios previos en residuos aromáticos [15], [17].

De acuerdo con Munekata et al. [18], la maceración superó a la extracción asistida por ultrasonido (UAE) en la obtención de polifenoles de *Rosmarinus officinalis*. Esto sugiere que la UAE no garantiza necesariamente un mayor rendimiento fenólico en esta planta, aunque sí puede ser más efectiva para otros metabolitos como los carotenoides. Según los autores, mientras que la maceración aprovecha el tiempo prolongado para facilitar la difusión, la cavitación del ultrasonido podría generar selectividad o incluso la degradación de ciertos

compuestos dependiendo de las condiciones operativas y el solvente empleado.

De acuerdo con Deng et al. [19], la maceración puede exhibir una mayor eficiencia al tratar matrices residuales complejas. En estos materiales, los polifenoles que permanecen tras la destilación requieren periodos de extracción extensos para facilitar su difusión y recuperación total. Por el contrario, la efectividad del ultrasonido está estrictamente sujeta a la optimización de sus parámetros; de lo contrario, la cavitación podría degradar compuestos sensibles. Así, la superioridad de un método no es absoluta, sino que está condicionada por la naturaleza de la muestra y el ajuste de las variables operativas.

Si bien las técnicas intensificadas, como el ultrasonido y los campos eléctricos, son altamente eficientes en tejidos vegetales frescos, los hallazgos de este estudio posicionan a la maceración prolongada como una alternativa superior para procesar matrices residuales complejas. En el caso de subproductos de extracción industrial, la rigidez y dureza de las paredes celulares dificultan la accesibilidad de los solventes; por tanto, los tiempos de contacto extendidos de la maceración favorecen una recuperación más efectiva de los polifenoles [20].

B. Efecto antimicrobiano: Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI)

La variabilidad en la actividad antimicrobiana se debe a las diferencias estructurales en las envolturas celulares de las bacterias. Las Gram negativas, como *Escherichia coli*, presentan una membrana externa rica en lipopolisacáridos que actúa como una barrera selectiva. En contraste, las Gram positivas (por ejemplo, *Bacillus subtilis*) carecen de esta membrana, lo que suele aumentar su susceptibilidad [21]. Los compuestos fenólicos pueden alterar la permeabilidad de estas membranas e interferir con procesos metabólicos vitales. En este estudio, la inhibición observada en *E. coli* sugiere que los compuestos extraídos tienen la capacidad de comprometer la integridad de su membrana externa, superando su barrera natural [22].

La Tabla III muestra la actividad antimicrobiana del extracto de RPAER frente a *E. coli* en sistema líquido. Se observó la concentración mínima de inhibición de crecimiento microbiano en los tubos de ensayo con 5 concentraciones y un blanco negativo.

La inhibición de *Escherichia coli*, que se observa en la Fig. 4, muestra que el tubo blanco negativo (Tubo 0) presentó turbidez y crecimiento floculento, evidenciando que no hubo inhibición microbiana, y del mismo modo ocurrió en el tubo 5 (31,25 EAG mg/L). El tubo 1 (500 EAG mg/L) no mostró turbidez y, por lo tanto, se evidenció inhibición total del crecimiento microbiano. Del tubo 2 al tubo 4, sí hubo una menor turbidez, demostrando inhibición parcial. Se concluyó que el extracto de RPAER tiene una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 500 EAG mg/L sobre el *Escherichia coli*. Este resultado confirma que los polifenoles extraídos del

RPAER ostentan actividad antimicrobiana frente a Gram negativas.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE RPAER FRENTE A *ESCHERICHIA COLI* (ENSAYO EN CALDO BHI)

Tubo	Concentración (EAG mg/L)	Observación	Interpretación
1	500	Ausencia de turbidez	Inhibición total
2	250	Turbidez mínima	Inhibición parcial
3	125	Turbidez mínima	Inhibición parcial
4	62,5	Turbidez mínima	Inhibición parcial
5	31,25	Turbidez completa y flóculos	Sin inhibición
0	Control (BHI + <i>E. coli</i>)	Turbidez completa y flóculos	Sin inhibición

Diversos estudios indican que *Escherichia coli* tiene resistencia estructural debido a su membrana externa rica en polisacáridos; sin embargo, los polifenoles del extracto de RPAER tienen capacidad para alterar dicha barrera, provocando pérdida de la integridad celular [4].

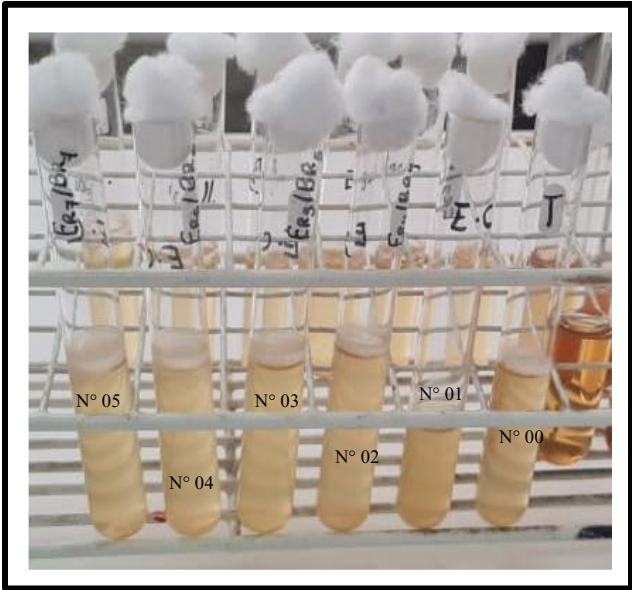


Fig. 4 Determinación del CMI de RPAEO contra *Escherichia coli*

El efecto antimicrobiano observado concuerda con lo reportado por Bouloumpasi et al. [1], quienes observaron actividad de moderada a significativa de extractos fenólicos de residuos sólidos de romero frente a *E. coli*, con una concentración de 500 a 3000 EAG mg/L. El ácido rosmarínico, un polifenol propio del romero ejerce efectos inhibidores contra el crecimiento de *Escherichia coli* K-12, al disminuir el recuento y el número de células [23].

TABLA IV
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE RPAER FRENTE A
BACILLUS SUBTILIS (ENSAYO EN CALDO BHI)

Tubo	Concentración (mg EAG/L)	Observación	Interpretación
1	500	Turbidez mínima	Inhibición parcial
2	250	Turbidez mínima	Inhibición parcial
3	125	Turbidez mínima	Inhibición parcial
4	62,5	Turbidez mínima	Inhibición parcial
5	31,25	Turbidez completa y capa superficial	Sin inhibición
0	Control (BHI + E. coli)	Turbidez completa y capa superficial	Sin inhibición

El extracto fenólico de RPAER mostró inhibición parcial o moderada frente a *Bacillus subtilis* de 62,5 a 500 EAG mg/L; mientras que a 31,25 EAG mg/L y en el control no hubo inhibición (Tabla IV y Fig. 5). Esto no concuerda con la literatura científica, que señala mayor susceptibilidad de bacterias Gram positivas a los fenólicos debido a la ausencia de una membrana externa protectora [2], [24].

Es probable que los efectos sean diferentes en este caso, pues la extracción se realizó con metanol al 75% y baño de ultrasonido con 35 Hz y periodos de [4], mientras que en este trabajo se realizó con etanol al 50%, por escalabilidad.

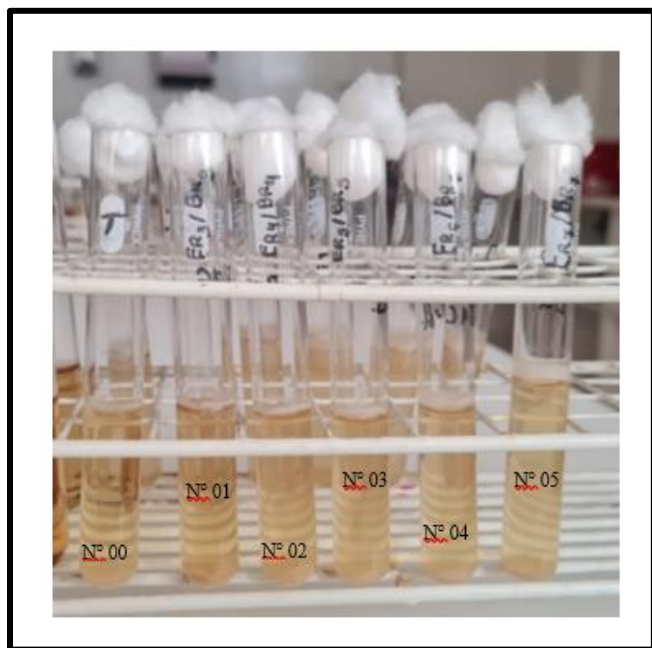


Fig. 5 Determinación del CMI de RPAER contra *Bacillus subtilis*

Los extractos de residuos de romero son ricos en polifenoles como el ácido rosmarínico, carnosol y ácido carnósico, que son muy eficaces como antibacterianos frente a *Bacillus cereus* ATCC 10876 (CMI: 62,5 EAG mg/L) [4], en

otro trabajo se encontró que en *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* la inhibición se dio a 3000 EAG mg/L [1]. Esta menor susceptibilidad observada en *Bacillus subtilis* podría atribuirse a la mayor resistencia estructural de su pared celular Gram positiva y a su capacidad de formar esporas, lo cual limita la acción de compuestos antibacterianos naturales, tal como fue descrito por Kabir et al. [25].

Se puede concluir que no se obtuvo la concentración mínima inhibitoria en *B. subtilis* con las concentraciones trabajadas en esta investigación.

C. Actividad antimicrobiana: Ensayo de difusión en discos

Se evaluó la actividad antimicrobiana mediante microplacas de los extractos fenólicos derivados de RPAER con etanol al 50 % frente a microorganismos seleccionados como *Escherichia coli* (Tabla V y Fig. 6) y *Bacillus subtilis* (Tabla VI y Fig. 7).

Se examinó la actividad antibacteriana de los extractos RPAEO a cinco concentraciones diferentes (500, 250, 125, 62,5 y 31,25 EAG mg/L) enumeradas del 1 (mayor concentración) al 5 (menor concentración).



Fig. 6. Ensayo de difusión en discos para la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de RPAEO contra *Escherichia coli*

Los resultados muestran que el extracto M presentó inhibición del crecimiento del *Escherichia coli* (Tabla V) utilizando como indicadores los halos de inhibición. Se puede observar que dichos halos de inhibición disminuyen en longitud con la disminución de la concentración del extracto de RPAER. La similitud entre ambas placas permitió confirmar la reproducibilidad del ensayo y la precisión del cultivo bacteriano.

TABLA V
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE RPAEO FRENTE A
ESCHERICHIA COLI MEDIANTE DIFUSIÓN EN AGAR

Placa	Disco 1	Disco 2	Disco 3	Disco 4	Disco 5
M R1	0,80 mm	0,70 mm	(-)	(-)	0,70 mm
M R2	1,80 mm	1,15 mm	0,90 mm	0,70 mm	(-)

En contraste, los resultados obtenidos en las placas inoculadas (Figura 6) con *Bacillus subtilis* evidenciaron una

menor actividad antimicrobiana de los extractos. En la placa 1 y 2 se observan similares resultados, tanto en el disco con 500 y 250 EAG mg/L hubo una mínima inhibición, y a menores diluciones no tuvo ningún efecto en este microorganismo.



Fig. 7. Ensayo de difusión en discos para la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de RPAEO contra *Bacillus subtilis*

Estos resultados indican que los extractos fenólicos del RPAER presentaron un mayor efecto inhibitorio frente a *Escherichia coli* que frente a *Bacillus subtilis*, lo cual podría estar relacionado con las diferencias estructurales de la pared celular entre bacterias Gram negativas y positivas [25] y al perfil de polifenoles del extracto obtenido de RPAER, pues los datos cuantitativos de los terpenos se ven significativamente alterados en comparación con la hidrodestilación [4]. Conclusiones similares se reportaron en trabajos previos [26].

TABLA VI
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE RPAEO FRENTE A
BACILLUS SUBTILIS MEDIANTE DIFUSIÓN EN AGAR

Placa	Disco 1	Disco 2	Disco 3	Disco 4	Disco 5
M R1	0,80 mm	0,70 mm	(-)	(-)	(-)
M R2	0,80 mm	0,70 mm	(-)	(-)	(-)

Desde un enfoque aplicado, los resultados confirman que los residuos de post-destilación de *Rosmarinus officinalis* son una fuente valiosa de agentes bioactivos con capacidad antimicrobiana. Esta evidencia es consistente con investigaciones previas [27], las cuales demuestran que incluso en concentraciones reducidas, los fenoles del romero inhiben eficazmente a patógenos como *Escherichia coli*. Estos hallazgos no solo validan su uso como conservantes naturales en la industria alimentaria, sino que también impulsan modelos de economía circular al transformar subproductos en recursos de alto valor, mitigando así el impacto ambiental.

IV. CONCLUSIONES

Este estudio ha demostrado que el extracto de RPAER obtenido por maceración (M) mostró un mayor rendimiento de extracción de polifenoles. No se encontró la CMI del extracto de RPAER en *Bacillus subtilis*; sin embargo, mediante el método de difusión en discos, se observó un mejor efecto antimicrobiano en *E. coli* que en *B. subtilis*. El CMI para

Escherichia coli fue de 500 EAG mg/L. Se recomienda realizar el perfil de polifenoles que permita determinar la calidad de los extractos para fines antimicrobianos y se recomienda hallar el CMI con mayores concentraciones. Así mismo, se debería probarse moliendo el RPAER y con un tratamiento más severo de ultrasonido para poder reducir el tiempo de extracción que propone la maceración.

En conclusión, los extractos obtenidos demuestran un alto potencial para ser utilizados como conservantes naturales en el sector alimentario, particularmente en productos vulnerables a la contaminación por *Escherichia coli*. Esta aplicación representa una alternativa prometedora y sostenible frente a los aditivos sintéticos, promoviendo la seguridad alimentaria y fomentando la revalorización de subproductos agroindustriales.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen el patrocinio de la Universidad Privada del Norte por hacer posible esta publicación. Asimismo, al Dr. Pedro Pablo Arteaga Llacza por su apoyo incondicional en el desarrollo de este trabajo de investigación.

REFERENCIAS

- [1] E. Bouloumpasi *et al.*, "Assessment of Antioxidant and Antibacterial Potential of Phenolic Extracts from Post-Distillation Solid Residues of Oregano, Rosemary, Sage, Lemon Balm, and Spearmint," *Processes*, vol. 12, no. 1, p. 140, Jan. 2024, doi: 10.3390/pr12010140.
- [2] I. Psarrou, A. Oreopoulou, D. Tsimogiannis, and V. Oreopoulou, "Extraction Kinetics of Phenolic Antioxidants from the Hydro Distillation Residues of Rosemary and Effect of Pretreatment and Extraction Parameters," *Molecules*, vol. 25, no. 19, p. 4520, Oct. 2020, doi: 10.3390/molecules25194520.
- [3] F. M. Vella and B. Laratta, "Rosemary Essential Oil Extraction and Residue Valorization by Means of Polyphenol Recovery," in *Foods 2023*, Basel Switzerland: MDPI, Oct. 2023, p. 8. doi: 10.3390/Foods2023-15024.
- [4] S. V. Luca *et al.*, "Value-Added Compounds with Antimicrobial, Antioxidant, and Enzyme-Inhibitory Effects from Post-Distillation and Post-Supercritical CO₂ Extraction By-Products of Rosemary," *Antioxidants*, vol. 12, no. 2, p. 244, Jan. 2023, doi: 10.3390/antiox12020244.
- [5] M. Montero-Recalde, J. Revelo I., D. Avilés-Esquivel, E. Valle V., and D. Guevara-Freire, "Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de Canela (*Cinnamomum zeylanicum*) sobre Cepas de Salmonella," *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, vol. 28, no. 4, pp. 987–993, Dec. 2017, doi: 10.15381/rivep.v28i4.13890.
- [6] J. Azmir *et al.*, "Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review," *J. Food Eng.*, vol. 117, no. 4, pp. 426–436, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014.
- [7] V. L. Singleton, R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventós, "[14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent," *Methods Enzymol.*, vol. 299, pp. 152–178, 1999.
- [8] J. Aguayo Rojas, "Compuestos fenólicos, minerales, capacidad antioxidante y antihipertensiva de pingüica (*Arctostaphylos pungens*)," *Acta Univ.*, vol. 32, pp. 1–15, Feb. 2022, doi: 10.15174/au.2022.3231.
- [9] A. Aydin, A. A. Suleymanoglu, A. Abdramanov, P. Paulsen, and E. Dumen, "Detection of Extended Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* with Biofilm Formation from Chicken Meat in Istanbul," *Foods*, vol. 13, no. 7, p. 1122, Apr. 2024, doi: 10.3390/foods13071122.
- [10] F. Valerio, G. N. Mezzapesa, A. Ghannouchi, D. Mondelli, A. F. Logrieco, and E. V. Perrino, "Characterization and Antimicrobial Properties of Essential Oils from Four Wild Taxa of Lamiaceae

- Family Growing in Apulia,” *Agronomy*, vol. 11, no. 7, p. 1431, Jul. 2021, doi: 10.3390/agronomy11071431.
- [11] R. H. Myers, D. C. Montgomery, and C. M. Anderson-Cook, *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. John Wiley & Sons, 2016.
- [12] I. C. Ozsefil and A. Ziyilan-Yavas, “Green approach for polyphenol extraction from waste tea biomass: Single and hybrid application of conventional and ultrasound-assisted extraction,” *Environ. Res.*, vol. 235, p. 116703, Oct. 2023, doi: 10.1016/j.envres.2023.116703.
- [13] H. Huo, H. Bao, J. Li, and H. Li, “Optimization and antioxidant evaluation of clean and efficient recovery of polyphenols from Phellodendron amurense waste leaves via ultrasound-assisted extraction,” *Ultrason. Sonochem.*, vol. 120, p. 107512, Sep. 2025, doi: 10.1016/j.ultsonch.2025.107512.
- [14] F. Chemat, N. Rombaut, A.-G. Sicaire, A. Meullemiestre, A.-S. Fabiano-Tixier, and M. Abert-Vian, “Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review,” *Ultrason. Sonochem.*, vol. 34, pp. 540–560, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.06.035.
- [15] A. Skendi, M. Irakli, P. Chatzopoulou, E. Bouloumpasi, and C. G. Biliaderis, “Phenolic extracts from solid wastes of the aromatic plant essential oil industry: Potential uses in food applications,” *Food Chemistry Advances*, vol. 1, p. 100065, Oct. 2022, doi: 10.1016/j.focha.2022.100065.
- [16] K. Hcini, A. A. Lozano-Pérez, J. Luis Cenís, M. Quílez, and M. José Jordán, “Extraction and Encapsulation of Phenolic Compounds of Tunisian Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Extracts in Silk Fibroin Nanoparticles,” *Plants*, vol. 10, no. 11, p. 2312, Oct. 2021, doi: 10.3390/plants10112312.
- [17] M. Takó *et al.*, “Phenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Hawthorn (*Crataegus orientalis*) Fruit Extracts Obtained via Carbohydrase-Assisted Extraction,” *Applied Sciences*, vol. 14, no. 21, p. 9790, Oct. 2024, doi: 10.3390/app14219790.
- [18] P. E. S. Munekata *et al.*, “Impact of ultrasound-assisted extraction and solvent composition on bioactive compounds and in vitro biological activities of thyme and rosemary,” *Food Research International*, vol. 134, p. 109242, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.foodres.2020.109242.
- [19] J. Deng *et al.*, “Comparative evaluation of maceration and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from fresh olives,” *Ultrason. Sonochem.*, vol. 37, pp. 328–334, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.ultsonch.2017.01.023.
- [20] S. Moharrami and H. Hashempour, “Comparative study of low-voltage electric field-induced, ultrasound-assisted and maceration extraction of phenolic acids,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 202, p. 114149, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.jpba.2021.114149.
- [21] R. Suručić *et al.*, “In Vitro and In Silico Analysis of Differential Antibacterial Activity of Pomegranate Polyphenols Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria,” *Antibiotics*, vol. 14, no. 9, p. 912, Sep. 2025, doi: 10.3390/antibiotics14090912.
- [22] J. Ribeiro *et al.*, “Phenolic Compounds from *Pyrus communis* Residues: Mechanisms of Antibacterial Action and Therapeutic Applications,” *Antibiotics*, vol. 14, no. 3, p. 280, Mar. 2025, doi: 10.3390/antibiotics14030280.
- [23] S. Sriyarak, C. Bayrasy, H. Schmidt, P. Villenelve, and J. Weiss, “Impact of Fatty Acid Chain Length of Rosmarinate Esters on Their Antimicrobial Activity against *Staphylococcus carnosus* LTH1502 and *Escherichia coli* K-12 LTH4263,” *J. Food Prot.*, vol. 76, no. 9, pp. 1539–1548, Sep. 2013, doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-254.
- [24] S. Moreno, T. Scheyer, C. S. Romano, and A. A. Vojnov, “Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition,” *Free Radic. Res.*, vol. 40, no. 2, pp. 223–231, Jan. 2006, doi: 10.1080/10715760500473834.
- [25] M. S. Kabir, Y.-H. Hsieh, S. Simpson, K. Kerdahi, and I. M. Sulaiman, “Evaluation of Two Standard and Two Chromogenic Selective Media for Optimal Growth and Enumeration of Isolates of 16 Unique *Bacillus* Species,” *J. Food Prot.*, vol. 80, no. 6, pp. 952–962, Jun. 2017, doi: 10.4315/0362-028X.JFP-16-441.
- [26] S. V. Luca, T. Kittl, and M. Minceva, “Supercritical CO₂ extraction of spices: A systematic study with focus on terpenes and piperamides from black pepper (*Piper nigrum* L.),” *Food Chem.*, vol. 406, p. 135090, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.135090.
- [27] B. T. Abd-Elhalim, E. S. Mohamed, G. M. Gamar, and H. Moawad, “Biological activities and application of *Rosmarinus officinalis* extract to improve the preservation and microbial qualities of some local meat products,” *Sci. Rep.*, vol. 15, no. 1, p. 30806, Aug. 2025, doi: 10.1038/s41598-025-14247-x.