

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**EVALUACIÓN DE MONOTERPENOS,
SESQUITERPENOS Y DERIVADOS SEMI
SINTÉTICOS: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA SOBRE
Escherichia coli PRODUCTORA DE TOXINA SHIGA
(STEC) Y ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA SOBRE
*Eisenia foetida***

ANDREA LETICIA CÁCERES ALVARENGA

Tesis presentada a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Ciencias Químico Biológicas mención Química de Productos Naturales.

SAN LORENZO – PARAGUAY

MARZO - 2021

**EVALUACIÓN DE MONOTERPENOS,
SESQUITERPENOS Y DERIVADOS SEMI
SINTÉTICOS: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA SOBRE
Escherichia coli PRODUCTORA DE TOXINA SHIGA
(STEC) Y ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA SOBRE
*Eisenia foetida***

ANDREA LETICIA CÁCERES ALVARENGA

TUTOR: Prof. Dr. NELSON LUIS ALVARENGA SOSA

CO-TUTORA: Prof. Dra. ROSA MARÍA GUILLÉN FRETES

Tesis presentada a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Ciencias Químico Biológicas mención Química de Productos Naturales.

SAN LORENZO – PARAGUAY

MARZO - 2021

Ficha Catalográfica

Cáceres Alvarenga, Andrea Leticia.

Evaluación de Monoterpenos, Sesquiterpenos y Derivados Semi Sintéticos: Actividad Antimicrobiana Sobre Escherichia Coli Productora De Toxina Shiga (Stec) y Actividad Antihelmíntica Sobre Eisenia foetida / Andrea Leticia Cáceres Alvarenga. - - San Lorenzo : La Autora, 2021.

73 p.: fig. ; 30 cm.

Trabajo de especialización presentado a la Facultad de Ciencias Químicas – UNA, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Ciencias Químico Biológicas mención Química de Productos Naturales.

**1. MONOTERPENOS-SESQUITERPENOS.
ESCHERICHIA COLI**

2.

I. Título.

CDD: 579.342

C118e

**EVALUACIÓN DE MONOTERPENOS,
SESQUITERPENOS Y DERIVADOS SEMI
SINTÉTICOS: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA SOBRE
Escherichia coli PRODUCTORA DE TOXINA SHIGA
(STEC) Y ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA SOBRE
*Eisenia foetida***

ANDREA LETICIA CÁCERES ALVARENGA

Aprobado en fecha 20 de Enero de 2021.

Tribunal Examinador:

Prof. Dra. Olga Yolanda Heinichen Almada	FCQ/UNA
Prof. Dr. Javier Enrique Barúa Chamorro	FCQ/UNA
Dra. María Celeste Vega Gómez	FACEN/UNA
Prof. Dra. María del Carmen Hellión de Ibarrola	FCQ/UNA

Prof. Dr. Nelson Luis Alvarenga
Sosa
Tutor

Prof. Dra. Rosa María Guillén
Fretes
Co-tutora

Prof. Lic. Laura Joy Ramírez
Directora de Postgrado

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia a Dios y la Virgen por iluminar mi camino.

A mi familia por siempre acompañarme y brindarme su apoyo en cada paso; a mi madre Jackeline Alvarenga, a mi padre Juan Carlos Cáceres y a mi hermano Carlos Manuel Cáceres.

A mi compañero de vida Darío Esteban Riveros por su paciencia y apoyo incondicional.

A mi querida amiga Olga Coronel, por su gran amistad, por su apoyo en las largas horas de los trabajos experimentales, en la que juntas atravesamos diversos desafíos para el logro de nuestras metas.

A mis tutores el Dr. Nelson Alvarenga y la Dra. Rosa Guillén por el apoyo y sus invaluable enseñanzas brindadas en el transcurso de estos años.

A todo el plantel docente de postgrado por las enseñanzas y críticas constructivas que contribuyeron significativamente a mi formación en el área de la Ciencia e Investigación.

EVALUACIÓN DE MONOTERPENOS, SESQUITERPENOS Y DERIVADOS SEMI SINTÉTICOS: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA SOBRE *Escherichia coli* PRODUCTORA DE TOXINA SHIGA (STEC) Y ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA SOBRE *Eisenia foetida*

Autor: Andrea Leticia Cáceres Alvarenga

Tutor: Prof. Dr. Nelson Luis Alvarenga Sosa

Co-tutora: Prof. Dra. Rosa María Guillén Fretes

RESUMEN

Entre los productos naturales los aceites esenciales presentan una gran variedad de actividades entre las que se destacan la actividad antimicrobiana y antiparasitaria. Sus constituyentes principales son los monoterpenos y sesquiterpenos, a los que se atribuyen sus principales actividades. Por esto existe un interés creciente en estos compuestos y sus derivados para combatir diversas infecciones que causan enfermedades severas en los humanos y que constituyen un problema para la salud pública como son las enfermedades que causan diarrea. Además de los parásitos intestinales como los helmintos, otro de los agentes causales de dicha patología (diarrea) es *Escherichia coli* productora de toxina Shiga. Estos patógenos repercuten en la salud de la población y también tienen un impacto en el comercio debido a los productos alimenticios contaminados que desembocan en pérdidas económicas importantes. En este trabajo por ende se estudió la actividad de monoterpenos, sesquiterpenos y derivados semisintéticos específicamente en cuanto a la actividad antimicrobiana sobre aislados de *E. coli* productores de toxina Shiga (STEC) y actividad antihelmíntica sobre *Eisenia foetida*. Para la actividad antimicrobiana se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en placa según el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) y la visualización del punto final con resazurina por el método de Sarker. Respecto a la actividad antihelmíntica se evaluó empleando como compuesto control al albendazol, determinándose el tiempo de parálisis y muerte para ensayar la actividad de los diversos compuestos. Se observó que los compuestos con hidroxilo en su estructura como el linalol y *cis*-verbenol mostraron una mejor actividad biológica. Se espera que el hallazgo de nuevas moléculas biológicamente activas sobre agentes patógenos tenga un gran impacto, apuntando a la búsqueda de alternativas terapéuticas frente a la creciente resistencia a antibióticos y el escaso arsenal terapéutico con que cuenta la salud pública.

EVALUATION OF MONOTERPENES, SEQUITERPENES AND SEMI-SYNTHETIC DERIVATIVES: ANTIMICROBIAL ACTIVITY AGAINST SHIGA TOXIN PRODUCING *Escherichia coli* (STEC) AND ANTHELMINTIC ACTIVITY AGAINST *Eisenia foetida*

Author: Andrea Leticia Cáceres Alvarenga

Advisor: Prof. Dr. Nelson Luis Alvarenga Sosa

Co-advisor: Prof. Dra. Rosa María Guillén Fretes

SUMMARY

Essential oils are substances that present a wide variety of activities, among which antimicrobial and antiparasitic stand out. Their main constituents are monoterpenes and sesquiterpenes, to which their activities are attributed. For this reason, there is a growing interest in these compounds and their derivatives to fight various infections that cause severe diseases in humans and that constitute a public health problem such as diarrheic diseases. Those are caused among others, by *Escherichia coli* that produces Shiga toxin and by intestinal parasites. These pathogens affect the health of the population and the trade of food products that are contaminated by them, leading to economic losses. In this work, the activity of monoterpenes, sesquiterpenes and semisynthetic derivatives was assayed against *Eisenia foetida* for anthelmintic activity and against isolates of *Escherichia coli* producing Shiga toxin for antibacterial activity. Anthelmintic activity was evaluated using albendazole as a control compound, and *Eisenia foetida* as a model. The times of paralysis and death were determined to test the activity of the compounds. Regarding antimicrobial activity, was performed the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) by the plate microdilution method according to the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) and the visualization of the end point with resazurin according to Sarker. The compounds with hydroxyl in their structure, linalool and cis-verbenol, showed better biological activity. It is expected that the discovery of new biologically active molecules in this area of infectious diseases will have a great impact in the search for therapeutic alternatives due to the problem of growing resistance to antibiotics and the limited therapeutic arsenal available in the public health services.

INDICE

Contenido

1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 Epidemiología de las enfermedades diarreicas	1
1.2 Enfermedades diarreicas	1
1.3 Descripción de los agentes patógenos asociados a enfermedades diarreicas de importancia para la Salud Pública	2
1.3.1 <i>E. coli</i>	2
1.3.1.1 <i>E. coli</i> productora de toxina Shiga	3
1.3.2 Geohelmintos.....	6
1.4 Consecuencias de las STEC y las parasitosis intestinales	7
1.5 Medicina Tradicional.....	9
1.6 Características químicas y actividad de monoterpenos y sesquiterpenos	10
1.6.1 Limoneno	10
1.6.2 Linalol	11
1.6.3 <i>Cis</i> -verbenol	12
1.6.4 <i>Trans</i> -anetol	13
1.6.5 Óxido de cariofileno	14
1.6.6 β -cariofileno	15
1.7 Relación estructura actividad	16
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo General.....	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1 Productos químicos.....	18

3.2 Características de las bacterias	18
3.3 Curva de crecimiento de <i>E.coli</i>	18
3.4 Estandarización del inóculo bacteriano	19
3.5 Actividad antimicrobiana	19
3.5.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de antibióticos	19
3.5.2 Determinación de la CMI de los productos puros	20
3.6 Actividad antihelmíntica	20
3.7 Modificaciones químicas.....	21
3.7.1 Obtención del acetato de linalilo	21
3.7.2 Obtención del acetato de <i>cis</i> -verbenol.....	22
3.7.3 Obtención del diepóxido de cariofileno.....	22
3.8 Análisis instrumental	23
3.8.1 Análisis por Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) acoplado a detector de arreglo de diodos (PDA).....	23
3.8.2 Cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a espectrómetro de masas (UPLC / MS).....	24
3.8.3 Cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masa	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
4.1 Curva de crecimiento y estandarización del inóculo bacteriano.....	26
4.2 Concentración mínima inhibitoria de los compuestos puros frente a las STEC	26
4.3 Actividad antihelmíntica frente a <i>Eisenia foetida</i>	30
4.4 Obtención de los derivados semisintéticos.....	33
4.4.1 Obtención del acetato de linalilo	33
4.4.2 Obtención de acetato de <i>cis</i> -verbenol.....	41

4.4.3 Obtención del diepóxido de cariofileno.....	48
4.5 Actividad biológica de los derivados obtenidos.....	54
4.5.1 Actividad antimicrobiana de los derivados semisintéticos	54
4.5.2 Actividad antihelmíntica de los derivados semisintéticos	55
5. CONCLUSIÓN	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXOS	71

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Epidemiología de las enfermedades diarreicas

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades diarreicas se encuentran entre las diez principales causas de muerte en países de escasos recursos o en vías de desarrollo (World Health Organization, 2018), y constituye la segunda mayor causa de muerte de niños menores de cinco años ocasionando la muerte de 525.000 de ellos cada año. En todo el mundo se producen unos 1.700 millones de casos de enfermedades diarreicas infantiles por año (World Health Organization, 2017).

Las enfermedades diarreicas, son comúnmente asociadas al consumo de alimentos contaminados, la OMS, estima que cada año enferman en el mundo unos 600 millones de personas, casi 1 de cada 10 habitantes por el consumo de alimentos contaminados y que 420.000 mueren por dicha causa, siendo la población más vulnerable niños menores de 5 años los que soportan un 40% de la carga atribuible a las enfermedades de transmisión alimentaria. Esta enfermedad puede causar discapacidad persistente y muerte en su forma más grave (World Health Organization, 2019), por lo que resulta relevante el estudio de los mismos en la actualidad.

1.2 Enfermedades diarreicas

Los cuadros diarreicos pueden tener diferentes orígenes patogénicos, entre los que se encuentran los virus (rotavirus, norovirus, astrovirus y adenovirus entéricos), bacterias (*Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli* diarrogénica, *Aeromonas*, *Yersinia*, entre otros), los protozoarios (*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cyclospora*, *Microsporidium*, *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*) (Riveros & Ochoa, 2015) y los helmintos (*Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, y *Necator americanus*, *Trichuris trichiura*, *Strongyloides stercoralis*). (Jourdan, Lamberton, Fenwick, & Addiss, 2018).

Entre estos patógenos se destaca la bacteria *E. coli* enterohemorrágica, conocida también como *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) que figura entre los patógenos de transmisión alimentaria más comunes que afecta a millones de personas cada año, a veces con consecuencias graves o mortales. Razón por la que el Comité del Codex sobre Higiene de los Alimentos (CCFH) ha centrado su interés en este patógeno de origen bacteriano ya desde el año 2015, para lo cual solicitó a la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y OMS desarrollar un informe de la situación actual de dicho patógeno en el mundo, el cual concluyó que las STEC constituye un problema global, presentando importantes repercusiones a nivel de salud pública y a nivel del comercio nacional e internacional, y por ende estos escenarios tienen un impacto económico sustancial (Food and Agriculture Organization of the United & Organization, 2018).

A la vez el Codex junto con la FAO y la OMS, han centrado su interés en parásitos asociados a los alimentos con mayor impacto a nivel mundial, ya que afecta la salud de millones de personas cada año, infectando tejidos musculares y órganos, causando epilepsia, choques anafilácticos y otra serie de problemas que afectan a la salud. Algunos parásitos pueden vivir en el cuerpo humano durante décadas, por lo que estas organizaciones se plantean como objetivo el desarrollo de nuevas normas para el comercio mundial de alimentos que ayuden a los países a controlar la presencia de estos patógenos en la cadena alimentaria (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2014).

1.3 Descripción de los agentes patógenos asociados a enfermedades diarreicas de importancia para la Salud Pública

1.3.1 *E. coli*

E. coli es una bacteria anaerobia facultativa Gram negativa que se aloja en el tracto gastrointestinal humano, protege el epitelio de otras bacterias dañinas al producir un ambiente ácido a través del metabolismo de nutrientes, a la vez que proporciona al huésped una fuente de vitaminas B y K, y activa constantemente el sistema inmune. En contrapartida, existen algunas cepas de *E. coli* que han adquirido elementos genéticos móviles como plásmidos, islas de patogenicidad, transposones y

bacteriófagos que codifican factores de virulencia que finalmente producen enfermedades importantes. Las *E. coli* se pueden clasificar en seis patotipos distintos teniendo en cuenta la presencia de factores de virulencia, epidemiología y manifestaciones clínicas de la enfermedad de la siguiente manera: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) o *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) y *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Vidal R, Chamorro N, 2016).

1.3.1.1 *E. coli* productora de toxina Shiga

Uno de los principales microorganismos bacterianos causante de enfermedades diarreicas con cuadros bastantes graves es *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) (Cabrera-Sosa & Ochoa, 2020).

El mecanismo de patogenicidad se atribuye principalmente a la producción de dos variedades de la toxina Stx que son denominadas tipo 1 y 2, que son codificadas por los genes *stx1* y *stx2* respectivamente. La Stx está compuesta por una toxina AB₅, en la que el pentámero de subunidades B se une a la globotriaosilceramida-3 (Gb3) en la célula del hospedador y subunidad A de Stx se une a los ribosomas e inhibe la síntesis de proteínas provocando la muerte de la célula (Smith & Fratamico, 2017).

Usualmente poseen otros factores significativos de virulencia, como la intimina, una proteína de superficie codificada por el gen *eae*, considerada un factor clave de virulencia para la fijación a las células epiteliales intestinales, ya que interacciona con las microvellosidades dando lugar a la lesión característica de adherencia íntima con formación de un cáliz, elongación y caída de las microvellosidades conocida como A/E adherencia y esfacelación. Aunque el gen *eae* es el principal implicado en la lesión A/E, existen otros genes involucrados en este fenómeno (*esp*, *sep*, *tir*), todos estos se agrupan en una isla de patogenicidad cromosómica LEE (Locus Enterocyte Effacement), el cual es un fragmento cromosomal que codifica varias proteínas, entre ellas produce los receptores Tir a los que se unirá la intimina. La adhesión también se puede dar por otras proteínas como adhesinas reguladas por el gen *aggR*. Otro factor de virulencia asociado a las STEC

es el plásmido que contiene el gen *ehxA* que codifica para la enterohemolisina, una proteína perteneciente a la familia de las citolisinas formadoras de poros que desempeña un papel aún no muy claro en la lisis de los eritrocitos, a fin de que estos liberen los grupos hemo necesarios para mejorar el crecimiento de este patógeno (Hannaoui Rodríguez, Villalobos, & Martínez Nazaret, 2009).

Las STEC se clasifican en función a la presencia del antígeno O del que existen más de 185 grupos y 53 antígenos H flagelares. La combinación de los antígenos O y H define el serotipo de STEC. Los serogrupos hacen referencia al tipo de antígeno O y suelen diferenciar a dos grandes categorías en base a la frecuencia con que causan síndrome urémico hemolítico (SUH) e incluyen al serogrupo STEC O157 y los restantes incluyen a los demás serogrupos y se definen como STEC “no O157” (Smith & Fratamico, 2017).

Investigaciones recientes han destacado que el riesgo de desarrollar una enfermedad grave se da en función a la presencia de factores de virulencia determinados en las STEC, por ejemplo, cepas STEC con *stx2* y genes de adherencia, *eae* o *aggR*, tienen mayor potencial para causar diarrea y llegar a desarrollar la forma más grave el SUH. En contrapartida se ha observado que no se puede tomar como criterio de virulencia al serotipo, ya que las cepas STEC con el mismo serotipo no necesariamente portan los mismos genes de virulencia ya que muchos de esos genes son móviles y pueden perderse o transferirse a otras bacterias (Food and Agriculture Organization of the United & Organization, 2018).

Este patógeno se caracteriza por generar brotes, aunque también se han observado casos esporádicos, siendo las principales vías de transmisión el consumo de alimentos contaminados, principalmente las de origen bovino, el contacto directo e indirecto con animales y la transmisión persona a persona (Griffin & Tauxe, 1991).

La clínica que desarrolla es variada puede ir desde dolor abdominal, diarrea, fiebre y vómitos, seguidos de diarrea con sangre en aproximadamente el 90% de los casos. A la vez presenta una tasa de 0 a 15% respecto a los síntomas severos como el síndrome urémico hemolítico (SUH) y se produce la muerte en aproximadamente el 5% de los pacientes. El SUH es un síndrome clínico que se caracteriza por la tríada diagnóstica de: anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e insuficiencia

renal aguda que puede llegar a ser mortal (Amézquita-López, Soto-Beltrán, Lee, Yambao, & Quiñonez, 2018), siendo el riñón y el cerebro los dos órganos principales a los que ataca (Ersan & Kocak, 2018).

Respecto a la vigilancia y la epidemiología de las STEC en América Latina es distinta para cada país, en general el informe respecto a la infección por dicha bacteria se basa principalmente en la vigilancia sindrómica a través del sistema de vigilancia de enfermedades transmitidas por los alimentos en países como Argentina, Bolivia y Paraguay, o a través del sistema de vigilancia de diarrea aguda en Argentina, Brasil, Chile, Costa Rica, Paraguay y Perú. La notificación oficial de SUH es obligatoria en países como Argentina, Bolivia, Brasil, Chile y Paraguay (Vidal R, Chamorro N, 2016). A nivel regional Argentina es uno de los países con mayor prevalencia de síndrome urémico hemolítico, una de las principales complicaciones de las STEC (Chinen & Leotta, 2006).

A nivel país también se han descrito casos clínicos de síndrome urémico hemolítico asociado a *E. coli* O157:H7 *stx2* como causante del cuadro clínico (Chamorro, 2009). En Paraguay, se ha publicado la detección molecular de *E. coli* diarreogénica (ECD) en pacientes pediátricos con síndrome diarreico agudo, en los que se observó que el 13% de las muestras fueron positivas para algún factor de virulencia compatible con patotipos de ECD con mayor predominio en niños de 1 a 3 años. Específicamente la STEC fue el patotipo de menor frecuencia con un 4% pero se destaca por su gran virulencia y patogenia (Weiler, Orrego, Alvarez, & Huber, 2017). Esto coincide en líneas generales con otro estudio realizado en el área metropolitana de Asunción y Central en el que se determinó la prevalencia de enteropatógenos causantes de enfermedades diarreicas agudas, en el que 43,1% de los casos positivos identificaron a las *E. coli* diarreogénicas como agente etiológico, seguido por Rotavirus con el 21,1%, *Campylobacter* spp. 13,2%, *Shigella* spp. 12,9% y por último *Salmonella* spp en 1,7%. En cuanto al patotipo STEC fue el de menor frecuencia con 2,6% a pesar del porcentaje bajo, la circulación de estas en el país resulta de gran importancia debido a la alta virulencia y las potenciales complicaciones de este patotipo en particular.

Ante esta situación es importante destacar que en nuestro país se realizan vigilancias rutinarias de coprocultivos que se remiten al Laboratorio Central de Salud Pública, en la búsqueda de patógenos entéricos bacterianos en muestras de heces que se limita al aislamiento de agentes etiológicos como *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Campylobacter* spp, y *E. coli* productora de toxina Shiga (Huber, Orrego, Ortiz, Álvarez, & Weiler, 2019; Weiler et al., 2017).

Cabe destacar que el tratamiento de las infecciones causadas por las STEC es controversial, ya que se ha observado que el uso de antimicrobianos exacerba el cuadro clínico debido a la liberación de la toxina Shiga. Actualmente existen investigaciones en las que se analizaron la expresión de los genes asociados a la producción de toxina Shiga, frente a diversos antimicrobianos, en donde se observó que algunos compuestos como la rifampicina a nivel *in vitro*, disminuye la producción de toxina Shiga y establecen que esta diferencia de respuesta al tratamiento depende del mecanismo de acción del antimicrobiano, de su concentración y la naturaleza de la cepa bacteriana (Nassar, Rahal, Sabra, & Matar, 2013).

1.3.2 Geohelminintos

Los parásitos biológicamente son clasificados como protozoos y helmintos, siendo una de las parasitosis más comunes en todo el mundo las helmintiasis transmitidas por el suelo (geohelmintiasis) que afectan a las comunidades más pobres y desfavorecidas. Son transmitidas por los huevos de los parásitos eliminados con las heces de las personas infectadas, los que a su vez contaminan el suelo y se propagan rápidamente en países con saneamiento deficiente. En todo el mundo, aproximadamente 1.500 millones de personas, casi el 24% de la población mundial, está infectada por helmintos transmitidos por el suelo. Las principales especies de helmintos transmitidos por el suelo que infectan al hombre son áscaris (*Ascaris lumbricoides*), el tricocéfalo (*Trichuris trichiura*) y el anquilostoma (*Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale*) (Organización Mundial de la Salud, 2020). Estos parásitos se asocian a las enfermedades transmitidas por el suelo y a la vez a las enfermedades transmitidas por los alimentos. En este sentido la diferencia radica básicamente en la forma de transmisión del parásito, pero desemboca en la misma

patología que son las enfermedades diarreicas, por lo que es importante manejar ambos escenarios, para entender de forma más completa las enfermedades asociadas a los parásitos. Los patógenos que se transmiten por el consumo de alimentos contaminados son de importancia para la salud pública en todo el mundo, sobre todo cuando existen instalaciones sanitarias deficientes y en poblaciones que consumen alimentos crudos o poco cocidos. En la actualidad hay más de dos mil millones de personas infectadas por parásitos transmitidos por el consumo de alimentos. Las infecciones pueden tener consecuencias variadas como el deterioro del desarrollo físico, intelectual y cognitivo, y estas consecuencias pueden ser prolongadas, graves y a veces fatales, además de causar dificultades importantes en términos de inocuidad alimentaria, seguridad y calidad de vida (Comisión del Codex Alimentarius, 2015).

1.4 Consecuencias de las STEC y las parasitosis intestinales

La repercusión de estos patógenos no solo se relaciona con la salud en humanos causando graves enfermedades incluso llegando a ser mortales, sino también se relaciona de manera paralela con el sector productivo y económico de un país; ya que dichos patógenos afectan al comercio de ciertos productos. Podríamos destacar específicamente los productos cárnicos ya que constituyen uno de los rubros más importantes y de mayor alcance. Según los últimos reportes en el Paraguay los principales productos de exportación que contribuyen significativamente a la economía del país son la soja con un 25,33%, la electricidad con un 23,34% y los productos cárnicos con 13,03%, como se muestra en la **Tabla 1.1**, por lo que es importante tener en cuenta que este sector es de gran importancia en la economía del país. (Oficina Económica y Comercial de España en Asunción, 2019).

Tabla 1.1. Principales Sectores exportadores en Paraguay

PRINCIPALES SECTORES EXPORTADOS					
(Datos en M \$)	2015	2016	2017	2018	%
Semillas soja	1.697	1.890	2.203	2.291	4,0
Electricidad centrales hidroeléctricas	2.086	2.159	2.150	2.111	-1,81
Carne y despojos comestibles	1.180	1.156	1.215	1.178	-3,02
Harina soja	939	889	776	992	29,58
Cereales	727	684	499	526	5,43
Aceite soja	484	506	524	511	-2,38
Máquinas, aparatos y material eléctrico, y sus partes	131	159	242	280	15,93
Plásticos y sus manufacturas	90	86	98	106	8,53
Pieles (excepto la peletería) y cueros	151	120	115	77	-33,16
Los demás productos de origen animal	62	71	68	73	7,4
Resto	779	770	800	898	12,2
TOTAL	8.327	8.502	8.680	9.045	4,21
Fuente: Banco Central de Paraguay Última actualización: enero 2019					

Los principales importadores de carne paraguaya son Rusia, Chile y Brasil en los primeros lugares seguidos de otros países en menor proporción (Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal, 2019). El comercio internacional es de vital importancia, por lo que los productos a comercializar deben de cumplir con los más altos estándares de calidad a nivel local e internacional para que dichos productos tengan una aceptación y un buen impacto económico en el país.

Por ende el rechazo de productos de exportación es catastrófico en la economía del país y constituye un problema importante en términos de seguridad alimentaria a nivel no sólo local sino a nivel global, ya que los alimentos producidos en América del Sur se consumen a nivel mundial debido a la exportación, por ende los alimentos son productos que afectan la salud pública mundial y paralelamente repercute en el comercio internacional con implicancias económicas importantes en muchos países (Adell et al., 2018).

Dicha situación también se observa de manera concomitante en las infecciones parasitarias en animales, específicamente en el ganado que provoca la disminución de peso, baja producción de leche, debilidad de los animales por lo que

los productos derivados también se ven afectados (Servicio Nacional de Sanidad Agraria, 2017). También existe una pérdida económica por los costos asociados a la prevención y tratamiento de animales (Aguilar-Caballero, J.F.J, Torres-Acosta, R., H, & C.A, 2008).

A nivel país existen reportes de la identificación de aislados de STEC con capacidad de formar biofilms, datos que provienen de muestras de materia fecal de ganado bovino del Departamento de Cordillera en el 2016 (Florentin M, Acuña P, Rojas, N, Rodriguez F, 2018). Estas cepas tienen la capacidad de unir, colonizar y formar biopelículas en alimentos y otras superficies que pueden servir como una fuente importante de contaminación (Biscola, Abe, & Guth, 2011). También se han reportado alimentos contaminados con *E. coli* O 157, como el caso de carnes de hamburguesa contaminada (Copes et al., 2009).

Como resultado, hay una necesidad de hallar nuevos agentes para combatir las infecciones por dichos patógenos en humanos y animales. Por lo que los investigadores incluyen a los productos naturales, ya que desde la antigüedad se utilizan para tratar diversas afecciones y no solo podrían ser fuentes de moléculas activas contra enfermedades, sino también podrían utilizarse para los productos alimenticios como aditivos o sanitizantes durante el procesamiento o como conservantes, para lo cual se requiere de estudios más profundos.

1.5 Medicina Tradicional

Los productos naturales se han utilizado desde la antigüedad para tratar diversas enfermedades, entre ellos se destacan, los aceites esenciales con importantes actividades biológicas descritas a lo largo de los años, entre las que se mencionan su potencial terapéutico contra células tumorales, enfermedades cardiovasculares, actividad antimicrobiana y antiparasitaria, entre otras (Edris, 2007; Yaluff, Vega, & Alvarenga, 2017).

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles extraídos de plantas aromáticas. Entre sus constituyentes principales se encuentran los terpenos específicamente los monoterpenos y sesquiterpenos, a los que se

atribuyen sus principales actividades (Pérez C, Torres C, 2018). En la literatura se observa que los aceites esenciales son ampliamente estudiados en cuanto a su actividad antimicrobiana en los que se han obtenido resultados prometedores, hecho que los hace atractivos para el estudio de sus constituyentes individuales en busca de nuevos antimicrobianos (Al-Sayed, 2018).

Para el presente trabajo, utilizamos algunas moléculas componentes de los aceites esenciales disponibles en el laboratorio del Departamento de Fitoquímica como el *R*- limoneno, *S*-limoneno, *cis*- verbenol, linalol, *trans*-anetol, *trans*-cariofileno y óxido de cariofileno. Los aceites esenciales en los cuales estos compuestos se encuentran presentes han mostrado buenas actividades antimicrobianas e inclusive algunas de ellas antiparasitarias (Aelenei et al., 2018; Alencar, 2013; Bano et al., 2019; Rahman, Al-reza, Sattar, & Kang, 2011; Taylor, Asili, Emami, Eynolghozat, & Noghab, 2015; Xing et al., 2019).

1.6 Características químicas y actividad de monoterpenos y sesquiterpenos

A continuación, se detalla la descripción química y actividades relacionadas a los compuestos puros de manera individual.

1.6.1 Limoneno

El limoneno es un líquido incoloro a temperatura ambiente, es una sustancia que se extrae de los cítricos. Le da olor característico a las naranjas y los limones, pertenece al grupo de los monoterpenos. Desde el punto de vista químico posee un centro quiral como se observa en la **Figura 1.2**, por lo que existen dos isómeros ópticos: el *R*-limoneno y *S*-limoneno, las dos formas enantiómeras tienen las mismas propiedades físicas excepto la interacción con la luz polarizada por la cual una es dextrógira y otra levógira (Falk Filipsson, Bard, & Karlsson, 1998).

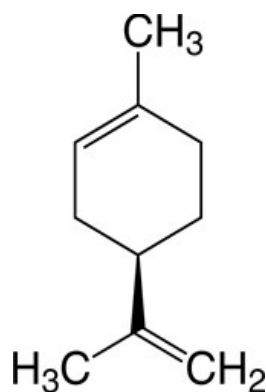


Figura 1.2. Estructura química del Limoneno

Entre las actividades descritas para el limoneno se encuentra la actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Cryptococcus neoformans* (Vuuren & Viljoen, 2007), actividad antioxidante (P. Singh et al., 2010) y actividad antifúngica (Cai et al., 2019)

1.6.2 Linalol

El linalol (3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol) es un monoterpeno acíclico, específicamente un alcohol terciario; el C3 en el que se encuentra el grupo hidroxilo presenta propiedades quirales como se observa en la **Figura 1.3**. Existen por ende dos enantiómeros de linalol: (3 *S*) - (+) – linalol (coriandrol) y (3 *R*) - (-) -linalol (licareol). Estos enantiómeros tienen diferentes perfiles de fragancia: se percibe coriandrol como dulce, floral, en cambio licareol tiene un aroma a madera, lavanda. Se encuentra presente en la naturaleza en ciertas familias de plantas como aceites esenciales, especialmente dentro de las familias Lamiaceae (menta, lavanda, hierbas aromáticas, albahaca), Lauraceae (laurel, canela) , Rutaceae (cítricos) y Apiaceae (cilantro) (Aprotosoai, Hăncianu, Costache, & Miron, 2014).

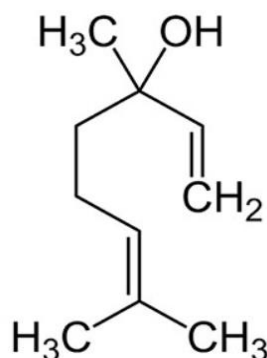


Figura 1.3. Estructura química del linalol

En cuanto a las investigaciones realizadas para este compuesto se destaca su efecto citotóxico contra las células tumorales específicamente de mama, colorectal e hígado (Chang & Shen, 2014), también se ha descrito su propiedad antiinflamatoria (Peano & Serra, 2003), efecto antidepresivo (Guzmán-Gutiérrez, Bonilla-Jaime, Gómez-Cansino, & Reyes-Chilpa, 2015), actividad antimicrobiana contra bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* (Liu et al., 2020), actividad antioxidante (Seol, Kang, Lee, & Seol, 2016), actividad antifúngica contra *Candida* sp. (Dias et al., 2018), y actividad antiparasitaria contra la forma tripomastigote de cepas de *Trypanosoma cruzi* (Villamizar, Cardoso, Andrade, Teixeira, & Soares, 2017).

1.6.3 *Cis-verbenol*

El verbenol es un alcohol monoterpénico bicíclico como se observa en la **Figura 1.4** (2-pinen-4-ol). Presenta cuatro estereoisómeros, la disposición para el isómero *cis*, es que los dos grupos metilo están del mismo lado del anillo que el grupo hidroxilo, y para el isómero *trans*, están en los lados opuestos. A su vez, hay enantiómeros de cada forma que exhiben actividad óptica distinta (Harper, Arif, Grant, & Ođho, 2000).

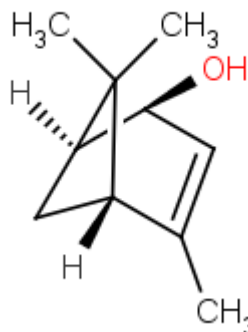


Figura 1.4. Estructura química del *cis* verbenol

Se ha encontrado que estos compuestos son componentes activos de feromonas de insectos (Holsten, Burnside, & Seybold, 2000), a la vez forma parte de aceites esenciales de ciertas especies vegetales (Díaz-Cedillo, Serrato-Cruz, Cruz-Marcial, & López-Morales, 2013), también es utilizado en la preparación de fragancias (Simakova & Semikolenov, 2003). En cuanto a la actividades descritas se menciona buena actividad contra parásitos específicamente la forma promastigote de tres especies de *Leishmania* y la forma tripomastigote de dos cepas de *Trypanosoma cruzi* (Yaluff et al., 2017). También se han reportado ciertos estudios que podría ser útil como agente terapéutico debido a sus actividades antioxidantes y antiinflamatorias (Choi et al., 2010).

1.6.4 *Trans*-anetol

El anetol puro es un líquido incoloro a ligeramente amarillo, constituye la fragancia principal y el compuesto bioactivo de varias plantas como anís, hinojo y especias de anís estrellado y más de otras 20 especies de plantas; presenta dos isómeros que tienen diferentes perfiles de aroma y toxicidad. El *trans*-anetol también denominado trans-1-metoxi-4-(prop-1-enil) benceno es un fenilpropano y posee un éter como grupo funcional que se observa en la **Figura 1.5** Tiene un perfil de olor suave herbáceo dulce (Aprotosoai, Costache, Miron, & Á, 2016) (Fujita & Kubo, 2004) y el otro isómero *cis*-anetol tiene un olor alcanforado y desagradable y ha sido reportado como tóxico (Castro H, Martinez J, 2007). El *trans*-anetol forma parte de ciertas especies vegetales como *Ocimum elloii* Benth (Moraes, Facanali, & Marques, 2002).

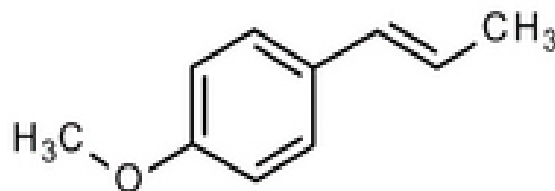


Figura 1.5. Estructura del *trans*- anetol

El *trans*-anetol mostró un efecto repelente, tóxico e inhibitorio en la oviposición en adultos y de crecimiento en ninfas de mosca blanca del género *Trialeurodes vaporariorum* (Camarillo G, Ortega L, Serrato M, 2009). También presentó una actividad importante como agente neuroprotector para aminorar el daño neuronal isquémico (Ryu, Hee, & Hyeon, 2014).

1.6.5 Óxido de cariofileno

El óxido de cariofileno es un sesquiterpeno bicíclico oxigenado como se observa en la **Figura 1.6**, que se encuentra en ciertas plantas como *Ocimum citriodorum* (Ngamprasertsith, Menwa, & Sawangkeaw, 2018).

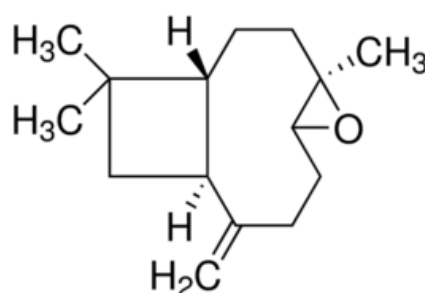


Figura 1.6. Estructura química del óxido de cariofileno

Posee actividad anticancerígena significativa, que afecta el crecimiento y proliferación de numerosas células cancerosas (Fidyt, Fiedorowicz, Strzdała, &

Szumny, 2016). También mostró una actividad analgésica central y periférica significativa junto con actividad antiinflamatoria en ratas y ratones (Chavan, Wakte, & Shinde, 2010). En un estudio *in vitro* el óxido de cariofileno inhibió completamente el desarrollo de los dermatofitos en la onicomycosis (Yang, Michel, Chaumont, & Millet-Clerc, 2000).

1.6.6 β -cariofileno

(-)- β -Cariofileno, es un sesquiterpeno bicíclico tal como se observa en la **Figura 1.7**, también es conocido como (-) - *trans* cariofileno, forma parte de varios aceites esenciales como en los rizomas de *Zingiber nimmonii* (Sabulal et al., 2006), el aceite esencial de *Cannabis sativa* (Aizpurua-Olaizola et al., 2016), y también en el aceite de clavo de olor *Syzygium aromaticum* (Ghelardini, Galeotti, Di Cesare Mannelli, Mazzanti, & Bartolini, 2001).

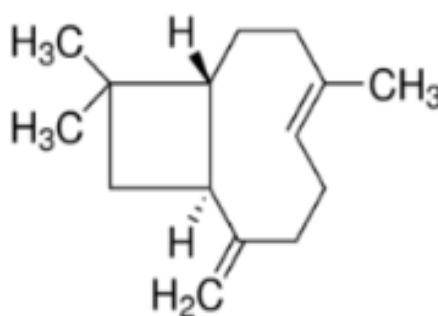


Figura 1.7. Estructura química del β -cariofileno

El β -cariofileno es una molécula que tiene actividad antiinflamatoria (Bakir, Him, Özbek, Düz, & Tütüncü, 2008). Se ha demostrado que se une específicamente al receptor cannabinoide de tipo 2 (CB₂) lo que lleva a la activación celular y efectos antiinflamatorios (Gertsch et al., 2008). También se ha observado que al actuar como agonista sobre receptores (CB₂) presenta un efecto beneficioso al reducir la respuesta neuroinflamatoria en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer por la vía de receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) (Cheng, Dong, &

Liu, 2014). Existen también reportes respecto a su propiedades antinociceptivas en modelos agudos y crónicos de nocicepción de ratones (Paula-Freire, Andersen, Gama, Molska, & Carlini, 2014) y actividad anestésica local (Ghelardini et al., 2001).

1.7 Relación estructura actividad

Es importante tener en cuenta la relación existente entre la actividad de los compuestos con los grupos funcionales que presentan. La mayoría de los compuestos oxigenados de los aceites esenciales tienen una acción más intensa generalmente que la de los aceites y por lo general mayor que la de los hidrocarburos. Concretamente los monoterpenos y sesquiterpenos presentan un carácter lipófilo debido a su porción hidrocarbonada y un carácter hidrófilo en el caso de poseer grupos funcionales oxigenados. Es decir, son moléculas anfipáticas. En líneas generales se establece un rango de actividad de los componentes de los aceites esenciales en el siguiente orden: fenoles> aldehídos> cetonas> alcoholes> éteres> hidrocarburos; comportamiento observado en diversas bacterias y hongos (Kalemba & Kunicka, 2003).

Es por eso que existe un interés creciente en la investigación de estos compuestos para combatir diversas infecciones que causan enfermedades severas en los humanos que constituyen un problema para la salud pública en diferentes países, debido a la carga de la enfermedad, severidad, complicaciones y mortalidad causando así un enorme impacto no solo en la salud de la población sino también en el comercio y economía de los países involucrados (Organización Mundial de la Salud, 2013). Todo esto impulsa la búsqueda de compuestos activos de origen natural, específicamente los aceites esenciales que se convierten en candidatos ideales debido a las actividades favorables que se han descrito sobre ellos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Evaluar la actividad de monoterpenos, sesquiterpenos y derivados semisintéticos como antimicrobianos sobre aislados de *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) y antihelmínticos sobre *Eisenia foetida*.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar la concentración mínima inhibitoria de monoterpenos y sesquiterpenos sobre STEC.
- Evaluar la actividad antihelmíntica de monoterpenos y sesquiterpenos sobre *Eisenia foetida*.
- Evaluar la actividad antimicrobiana y antihelmíntica de derivados semisintéticos de los compuestos con mejor perfil en los ensayos biológicos a fin de establecer relaciones estructura-actividad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Productos químicos

Los productos puros utilizados fueron: (*R*)-(+)- limoneno, (*S*)-(-)-limoneno, linalol, (*S*)-*cis*-verbenol, *trans*-anetol, β -cariofileno, (-)-oxido de cariofileno que fueron adquiridos de Sigma Aldrich.

3.2 Características de las bacterias

Las cepas de STEC fueron proveídas por el Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS). Dichas cepas provienen del biobanco del IICS, que han sido aisladas a partir de ganado bovino de Paraguay correspondiente al serogrupo O130 y O91, el serogrupo O157 correspondiente a un aislado gentilmente cedido por la Dra. Noralía Padola de la Facultad de Veterinaria de la Universidad del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Los aislados cuentan con caracterización genética de factores de virulencia que incluye a los genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *saa*, *hlyA*, *csgA*, *flu433*, *iha*, así como también han sido caracterizados con antiseros específicos para determinación de serogrupos.

3.3 Curva de crecimiento de *E.coli*

A partir de un cultivo puro, se inocularon colonias bacterianas en caldo de infusión cerebro-corazón (ICC), se incubaron a 37 °C con agitación constante de 60 rpm. Posteriormente se realizaron las mediciones en un espectrofotómetro desde el tiempo 0 y cada 30 minutos se registraron las lecturas correspondientes hasta obtener entre 12 a 15 mediciones consecutivas aproximadamente y luego a las 24 horas, 36 horas y 48 horas para generar una curva de absorbancia en función al tiempo.

3.4 Estandarización del inóculo bacteriano

Previa a la realización de la prueba de susceptibilidad a antimicrobianos se preparó una solución estándar de 0,5 en la escala de McFarland de BaSO₄ que se utilizó para ajustar el inóculo bacteriano a dicha escala y lograr así que los ensayos sean altamente reproducibles. Se procedió a preparar la suspensión bacteriana de *E. coli* por el método de suspensión directa de colonias para posteriormente leerlo espectrofotométricamente a 500 nm y ajustarlo al 0,5 en la escala de McFarland, al rango de absorbancia del estándar de BaSO₄ (CLSI, 2012b; Elles E, Salcedo M, Muñoz M, 2010).

Seguidamente se realizó la verificación del inóculo bacteriano ajustado al 0,5 de McFarland, realizando a partir del mismo diluciones de tal manera que al sembrar 100 µL de la misma en agar Mueller Hinton, se obtenga un recuento de 50 colonias aproximadamente luego de la incubación por 24 horas a 37°C; con lo que verificaría que las concentraciones se encuentran correctamente ajustadas (CLSI, 2012a). Este procedimiento de ajuste de inóculo se realizó para cada serogrupo de STEC utilizado en el trabajo, y cada uno por triplicado.

3.5 Actividad antimicrobiana

3.5.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de antibióticos

En las placas de 96 pocillos se colocaron 50 µL de ICC a excepción del primer pocillo en el cual se agrega 100 µL del antibiótico en ensayo (rifamicina) a una concentración de 256 µg/mL. A partir del primer pocillo se tomaron 50 µL y se realizaron diluciones seriadas, posteriormente se adicionó 40 µL de la suspensión bacteriana ajustada y finalmente 10 µL de resazurina (0,05%), tras 18 horas de incubación, esto para establecer la CMI de la rifamicina, empleada como control positivo siguiendo el método de Sarker (CLSI, 2012a; Sarker, Nahar, & Kumarasamy, 2007).

3.5.2 Determinación de la CMI de los productos puros

Las muestras se prepararon con 5% de DMSO y 10% de Tween 80 en solución fisiológica a una concentración de 100 mg/mL, se colocaron en los pocillos pertenecientes a la primera columna de la placa y en los demás pocillos se agregaron 50 μ L de medio de cultivo ICC. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de tal manera que cada pocillo tenga la mitad de la concentración respecto al anterior, seguidamente se añadió la solución bacteriana (5×10^6 ufc / mL) para lograr una concentración de 5×10^5 ufc / mL en cada pocillo. La penúltima columna corresponde al control de crecimiento bacteriano, mientras que la última columna corresponde al control de esterilidad que es la única sin inóculo bacteriano, solo contiene medio de cultivo y el vehículo de la muestra (DMSO y Tween 80 en solución fisiológica). Finalmente se añadieron 10 μ L del colorante resazurina a 0,05%, se envolvió con film y se colocó en una estufa a 37 °C durante 18 horas. El cambio de color se evaluó visualmente. El ensayo se realizó por triplicado (CLSI, 2012a; Sarker et al., 2007).

3.6 Actividad antihelmíntica

El ensayo se realizó con lombrices de tierra *Eisenia foetida* comúnmente llamada lombriz roja californiana. La elección de este helminto es debido a la semejanza anatómica y fisiológica del mismo con los parásitos intestinales humanos y su mayor disponibilidad, así como facilidad de cría y mantenimiento. Las lombrices empleadas en el estudio *in vitro* provinieron del criadero del Departamento de Fitoquímica. Los gusanos de tierra seleccionados para el ensayo medían en promedio de 4 a 6 cm de longitud con un ancho de 0,2 a 0,4 cm.

Para realizar el ensayo, se disolvió en 5% del vehículo dimetilsulfóxido (DMSO) y en solución fisiológica al 0,9% a una concentración de 1 mg/mL ya que se trata de productos puros. El control positivo utilizado fue el albendazol que es el fármaco más empleado clínicamente para tratar las helmintiasis en humanos.

La actividad antihelmíntica se realizó según el método de Pawar, que consistió en colocar tres gusanos por placa, los cuales se pusieron en contacto con los productos puros a ensayar; posteriormente se fue registrando el tiempo de parálisis y tiempo de muerte. Este último se constató colocando a la lombriz en un recipiente con agua a 50°C y en ella el gusano no debe presentar ningún movimiento ni reincorporarse. Los ensayos se realizaron por triplicado (Pawar et al., 2014).

3.7 Modificaciones químicas

Se realizaron modificaciones químicas convencionales de la Química Orgánica a los compuestos puros para la obtención de derivados semi-sintéticos. Las modificaciones dependieron de los grupos funcionales presentes en las moléculas y de la disponibilidad de reactivos y condiciones específicas para cada reacción en particular.

3.7.1 Obtención del acetato de linalilo

La obtención del acetato de linalilo se realizó primeramente a menor escala y posteriormente a una escala mayor. El proceso se inició colocando 504,8 mg de linalol con 14 mL de anhídrido acético y 10 mL de piridina con agitación constante a 1.200 rpm a temperatura ambiente, el tiempo de duración de la reacción bajo las condiciones mencionadas anteriormente fue de 10 días para que se forme la mayor cantidad de producto y se consuma prácticamente todo el reactivo de partida. El monitoreo de la reacción se realizó por cromatografía de capa fina empleando como fase móvil una mezcla de hexano: acetato de etilo en una proporción 9:1, el monitoreo se realizó cada 24 horas. La finalización de la reacción se realizó con el agregado de 30 mL de agua destilada fría, seguidamente se realizó la extracción con un solvente orgánico específicamente con 25 mL de cloroformo dicho procedimiento se realizó por cuadruplicado, la fase orgánica se mezcló con 3 porciones de 25 mL de HCl al 10% y se agitó en un embudo de decantación. Finalmente se separó la fase orgánica y se colocó sulfato de sodio anhidro para eliminar algún remanente de agua del solvente orgánico, luego se filtró con papel de filtro cuantitativo para posteriormente concentrar el filtrado en un evaporador rotatorio de vacío. Una vez culminado el

proceso a menor escala se procedió a llevar la reacción a una escala mayor tres veces más respecto a la escala menor (Novato et al., 2018).

La purificación se realizó por cromatografía en columna en donde la fase estacionaria utilizada fue silicagel (Kieselgel 60 G) empleando como fase móvil hexano: acetato de etilo en una proporción 9:1.

3.7.2 Obtención del acetato de *cis*-verbenol

La obtención del acetato de *cis*-verbenol se realizó inicialmente a menor escala. El proceso se inició colocando 536,2 mg de *cis*-verbenol con 14 mL de anhídrido acético y 10 mL de piridina con agitación constante a 1.200 rpm a temperatura ambiente, el tiempo de duración de la reacción bajo las condiciones mencionadas anteriormente fue de aproximadamente 5 horas y 45 minutos. El monitoreo de la reacción se realizó por cromatografía de capa fina con una fase móvil de hexano: acetato de etilo en una proporción 9:1, el monitoreo se realizó cada 1 hora. La finalización de la reacción se realizó con el agregado de 30 mL de agua destilada fría, seguidamente se realizó la extracción con 25 mL de cloroformo, dicho procedimiento se realizó por cuadruplicado. La fase orgánica se mezcló con 3 porciones de 25 mL de HCl al 10% y se agitó en un embudo de decantación, finalmente se separó la fase orgánica y se colocó sulfato de sodio anhidro para eliminar remanente de agua del solvente orgánico, luego se filtró con papel de filtro cuantitativo para posteriormente concentrar el filtrado en un evaporador rotatorio de vacío (Novato et al., 2018).

La purificación se realizó por cromatografía en columna en donde la fase estacionaria utilizada fue silicagel (Kieselgel 60 G) empleando como fase móvil hexano: acetato de etilo en una proporción 9:1.

3.7.3 Obtención del diepóxido de cariofileno

La obtención del diepóxido de cariofileno se inició colocando 1.050 mg de óxido de cariofileno y 1.000 mg del ácido metacloroperbenzoico, la cantidad utilizada para la reacción de epoxidación de ambos compuestos fue de mol a mol, se empleó

cloroformo como solvente (120 mL), la mezcla de la reacción se mantuvo inicialmente a bajas temperaturas empleando un baño de hielo y posteriormente se dejó la reacción a temperatura ambiente, bajo una agitación de 1.200 rpm y la reacción fue irradiada con luz de 150W. El monitoreo de la reacción se realizó por TLC cada 24 h con fase móvil hexano:acetato de etilo en una proporción 9:1. El proceso de finalización de la reacción se realizó colocando la mezcla de la reacción en contacto con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (lavado con tres porciones de 30 mL) luego se procedió a realizar el lavado pero con agua destilada (lavado con tres porciones de 30 mL). Finalmente la capa orgánica se separó, se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó en evaporador rotatorio de vacío (Elgendy & Mansourah, 2014).

La purificación se realizó por cromatografía en columna en donde la fase estacionaria utilizada fue silicagel (Kieselgel 60 G) empleando como fase móvil en gradiente utilizando los siguientes solventes hexano, hexano: acetato de etilo (9:1), hexano: acetato de etilo (8:2).

3.8 Análisis instrumental

3.8.1 Análisis por Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) acoplado a detector de arreglo de diodos (PDA)

Se empleó un cromatógrafo Shimadzu (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) constituido por una bomba LC-20AT, un detector UV de arreglo de diodos SPD-M20A, un horno CTO-10AC y un software LabSolution. Se empleó una columna Luna C18 de 5 μ m de diámetro de partícula y de 150 x 4,6 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA), mantenida a una temperatura de 40 °C. El sistema de disolventes empleado estuvo compuesto por agua (A) y acetonitrilo (B). La elución se realizó mediante un gradiente lineal de la siguiente manera: inicial 5% de B hasta los 3 min, aumentando luego hasta 20% a los 5 minutos, luego 40% a los 10 minutos, 70% a los 15 minutos, 90% a los 25 minutos y 100% a los 30 minutos, posteriormente 70% a los 35 minutos, 20% a los 40 minutos, quedando en 5% a los 45 minutos hasta finalizar la corrida a los 50 minutos. La velocidad de flujo fue de 1 mL/min, y el volumen de inyección de 20 μ L. Las muestras fueron inyectadas a una concentración

de 5 mg/mL en acetonitrilo. Los compuestos fueron monitoreados a 210 nm y los espectros UV/visible fueron registrados desde 200 hasta 400 nm para la caracterización de los compuestos.

3.8.2 Cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a espectrómetro de masas (UPLC / MS)

Para ello las muestras fueron disueltas en acetonitrilo grado HPLC (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) a una concentración de 10 mg/mL y filtradas con un filtro para muestras de Nylon de 0,22 μ de diámetro de poro (Microclar, Bs.As., Argentina). Posteriormente se inyectaron en un cromatógrafo líquido acoplado a espectrómetro de masas en tándem (Xevo-TQD, Waters Corporation, Milford, MA, USA) con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y con las siguientes condiciones: columna Kinetex EVO C18 (100 x 2,1 mm x 1,7 μ m, Phenomenex, Torrance, CA, USA), flujo 0,3 mL/min, elución en gradiente empleando una mezcla de agua (con 0,1 % ácido fórmico) con acetonitrilo (con 0,1 % ácido fórmico) (todos los reactivos de grado LCMS, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Las condiciones del gradiente fueron: inicial 100% A, manteniendo esas condiciones por 1 minuto, luego disminuyendo A hasta 0% a los 7,75 minutos y manteniendo esas condiciones hasta los 10 minutos, luego aumentando A hasta 50 % a los 15 minutos, aumentando nuevamente hasta 95% a los 18 minutos y manteniendo esas condiciones hasta el final (20 minutos). Las condiciones del espectrómetro de masas fueron: ionización en modo positivo, se empleó un voltaje de cono en rampa de 18,80 a 30 V, voltaje del capilar 3,20 (+), temperatura de la fuente 150 °C, temperatura de desolvatación 500 °C, flujo del gas de desolvatación 1000 L/h.

3.8.3 Cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masa

Para el mismo se prepararon soluciones de los compuestos a una concentración de 5 mg/mL en acetonitrilo de grado HPLC (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). A continuación, 1 μ L fue inyectado en un cromatógrafo gaseoso marca Shimadzu, modelo QP-2010 plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) bajo las siguientes condiciones: Columna Rtx-5MS (Bellefonte, PA, USA) de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro y 0,25 μ m de espesor de fase estacionaria; gas carrier

Helio (flujo 1,3 mL/min), temperatura de inyección 150 °C, temperatura de la interface 230 °C, elución en gradiente de temperatura iniciando a 45 °C y manteniendo esa temperatura por 3 minutos para posteriormente incrementar la temperatura hasta 230 °C a una tasa de 5 °C por minuto y manteniendo luego la temperatura final durante 3 minutos. Se empleó impacto electrónico como técnica de ionización a 70 eV en modo de barrido (SCAN) con un tiempo de barrido de 0,5 segundos y un rango de masas de 60 a 600 Da. La identificación de los compuestos se realizó por comparación de los espectros de masas obtenidos con los que se encuentran en las bibliotecas NIST 107 y NIST21.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Curva de crecimiento y estandarización del inóculo bacteriano

Para la realización de los ensayos de actividad antimicrobiana se determinó la curva de crecimiento de las bacterias de los distintos serogrupos de STEC como se puede observar en el **Anexo 1**. Un gráfico de absorbancia en función al tiempo necesario para tener en cuenta el ritmo de crecimiento de las bacterias para trabajar de manera adecuada con los mismos. Seguidamente se determinó la absorbancia correspondiente al 0,5 de la escala de McFarland de la suspensión bacteriana que fue de 0,15 de absorbancia a 500 nm para todas las cepas de STEC, esto coincide con los valores encontrados por Elles y colaboradores con *E. coli* convencional (Elles E, Salcedo M, Muñoz M, 2010). Los valores del inóculo de 0,5 McFarland fueron verificados por recuento de colonias en placa realizando diluciones determinadas a partir de la suspensión bacteriana ajustada a 0,5 de McFarland, para que proporcione un recuento de 50 colonias, hecho que se obtuvo durante la verificación de los tres serogrupos de STEC como se observa en el **Anexo 2** en donde se constató que el inóculo bacteriano se encontraba correctamente ajustado a 1×10^8 UFC/mL, correspondiente al 0,5 McFarland a una absorbancia de 0,15 a 500 nm de longitud de onda.

4.2 Concentración mínima inhibitoria de los compuestos puros frente a las STEC

En la **Tabla 4.1** se observa la CMI de los compuestos puros frente a las cepas de STEC analizadas, en las que se observó variaciones de la concentración mínima inhibitoria para un mismo compuesto. Estas diferencias entre cepas podrían deberse a que *E. coli* presenta un genoma bastante dinámico y cambiante, con una compleja dinámica evolutiva, gran diversidad genética, así como una alta recombinación e intercambio genético, todo esto provee una importante plasticidad genómica, que permite generar gran cantidad de genotipos dentro de una misma especie bacteriana.

Dicha diversidad genética entre cepas se evidencia por la gran variabilidad en los factores de virulencia, propiedades metabólicas y fenotípicas distintas (Souza et al., 2001) lo que podría explicar las diferentes respuestas o actividades observadas en este estudio de las distintas cepas de STEC para un mismo compuesto en particular. Realizando un análisis entre las cepas se observó que la cepa más susceptible a los compuestos ensayados es STEC O157 seguida de la cepa STEC O91 y finalmente se encuentra STEC O130 en líneas generales.

Tabla 4.1. Concentración mínima inhibitoria CMI (µg/mL)

Compuestos	STEC O130	STEC O91	STEC 0157
(R)-(+)- limoneno	12500	6250	12500
(S)-(-)-limoneno	6250	3125	3125
linalol	8036	5208	6250
(S)- <i>cis</i> -verbenol	6250	6250	3125
<i>trans</i> -anetol	12500	8333	6250
β-cariofileno	>50000	>50000	>50000
(-)-óxido de cariofileno	>50000	>50000	>50000
Rifamicina	4	2	4

Teniendo en cuenta lo anteriormente expresado se analizaron los resultados de las CMI obtenidas con las distintas cepas de STEC de los siete compuestos ensayados. En la **Tabla 4.1** se observa que en líneas generales el (S)-(-)-limoneno, *cis*-verbenol y linalol son los compuestos que presentaron resultados más favorables para los tres serogrupos de STEC. Se destaca la diferencia en la actividad del (S)-(-)-limoneno en comparación con su enantiómero el (R)-(+)-limoneno. Esto indica una actividad estereoespecífica, lo que coincide con la investigación realizada por Lee y colaboradores en la que se observó también una actividad estereoespecífica del (S)-(-)-limoneno respecto a su enantiómero frente a las bacterias *Xanthomonas oryzae* que son las causantes de desarrollar una enfermedad grave en las plantas de arroz. Otra similitud que comparten es que ambas bacterias son del tipo Gram negativo, por lo que existe una similitud estructural entre los patógenos ensayados (Lee, Chung, Kang, Chung, & Lee, 2016).

En cuanto a los compuestos *cis*-verbenol y linalol, éstos se caracterizan por presentar un alcohol como grupo funcional, característica que comparten ambos

compuestos, sin embargo la diferencia radica en que el *cis*-verbenol es un alcohol secundario y el linalol un alcohol terciario, se ha observado una ligera diferencia en la actividad entre ambos, siendo más favorable para el *cis*-verbenol con un rango de CMI de 6250 a 3125 $\mu\text{g/mL}$, seguido del linalol con un rango de CMI 8036 a 5208 $\mu\text{g/mL}$ a nivel general teniendo en cuenta las tres cepas. Sin embargo, se observan algunas peculiaridades como el caso específico del linalol con STEC O91 que mostró mejor actividad que el *cis*-verbenol, este hecho podría estar asociado a las diferencias genéticas anteriormente mencionadas.

Seguidamente se encuentra el *trans*-anetol químicamente definido como un éter que presenta una CMI de 12500 a 6250 $\mu\text{g/mL}$ en las cepas ensayadas. La actividad de este compuesto fue ligeramente menor que el *cis*-verbenol y linalol a excepción de la cepa STEC 0157 que presenta una CMI igual a la del linalol, que como hemos expresado anteriormente puede deberse a los factores genéticos asociados a cada cepa en particular.

Otro compuesto ensayado fue el cariofileno, un hidrocarburo que no presentó actividad a las concentraciones ensayadas por lo que la CMI informada para el mismo es $>50000 \mu\text{g/mL}$, que fue la máxima concentración ensayada, lo mismo se observó con el óxido de cariofileno una CMI $>50000 \mu\text{g/mL}$, a pesar de que este último compuesto cuenta con la presencia de un oxígeno, éste no fue suficiente para mejorar la actividad del compuesto respecto a la estructura base hidrocarbonada, el cariofileno.

Los compuestos ensayados presentan un carácter lipófilo debido a la estructura hidrocarbonada que poseen y el carácter ligeramente más hidrófilo de algunos de los compuestos se debe a los grupos funcionales que los caracterizan. En cuanto a la actividad antimicrobiana comparando entre los grupos funcionales se ha observado que aquellos que presentan el grupo hidroxilo, han presentado mejor actividad seguido del compuesto cuyo grupo funcional es el éter y finalmente los óxidos e hidrocarburos con menor actividad. Lo que resulta congruente según la relación estructura actividad propuesta por Kalemba et al. que establece un rango de la actividad de los componentes individuales de aceites esenciales que consiste en un

rango que se detalla a continuación fenoles> aldehídos> cetonas> alcoholes> éteres> hidrocarburos (Kalemba & Kunicka, 2003). Sin embargo respecto al (S)-(-)-limoneno, a pesar de ser un hidrocarburo, éste presentó actividad comparable respecto al *cis*-verbenol y linalol cuyo grupo funcional es un alcohol, esta situación puede deberse a múltiples factores que difieren entre estos compuestos e influyen en las actividades de los mismos. Por ende se deben contemplar los diversos factores fisicoquímicos que influyen en la actividad biológica de los compuestos en general como el tamaño de la molécula, la conformación espacial de la misma, los tipos de interacciones que pueden producirse entre la molécula y el sitio blanco en la bacteria, la lipofilia de los compuestos entre otros factores (U. P. Singh, Bhat, & Gahtori, 2012), por lo que realizar una generalización a grandes rasgos entre compuestos con características estructurales muy diversas es complicado. Lo más correcto es establecer la relación estructura actividad entre compuestos que tengan una estructura base en común, es decir, entre compuestos estructuralmente relacionados y se comparan las diferentes modificaciones que tengan o que se vayan realizando, para una aproximación más adecuada ya que en ese punto se podrá observar qué diferencias en la estructura puntualmente influyen y por ende que factores fisicoquímicos son los más influyentes.

Los efectos de los compuestos sobre las STEC dependen en gran medida de múltiples factores, entre ellos aquellos asociados al compuesto como el tipo de estructura química, grupos funcionales que presentan y las propiedades inherentes a la misma como la solubilidad, propiedad hidrofóbica e hidrofílica de dichos compuestos y también de manera simultánea depende de factores asociados al organismo vivo como los factores de virulencia presentes que se asocian a su amplia variabilidad genética. A la vez debemos de tener en cuenta el escenario de que el tratamiento de las STEC es controversial, por lo que ciertos estudios han centrado su interés en los posibles mecanismos de acción y han reportado que, entre los mecanismos de acción de antibióticos sobre las STEC, el más atractivo y efectivo se asocia a la inhibición de la síntesis de proteínas, que causa la disminución de la producción de la toxina Shiga (Agger, Scheutz, Villumsen, Mølbak, & Munk Petersen, 2015). Por lo tanto, se evidencia la necesidad de profundizar aún más la respuesta de las STEC frente a estos compuestos para el análisis de los posibles

mecanismos de acción y la expresión de la toxina Shiga como candidato para su utilización contra dicho patógeno.

4.3 Actividad antihelmíntica frente a *Eisenia foetida*

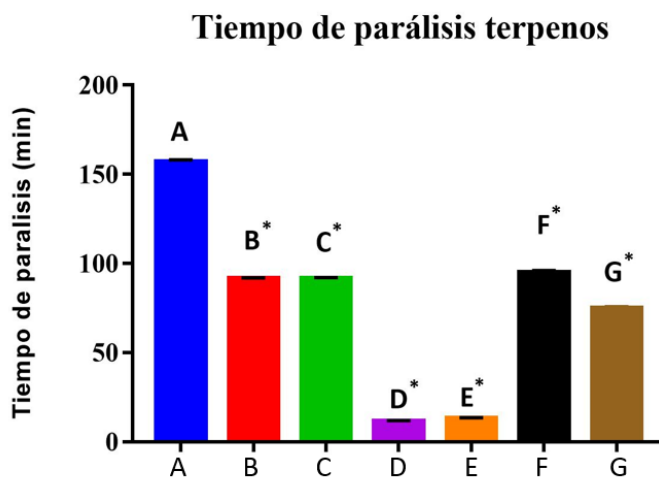
La actividad antihelmíntica respecto al tiempo de parálisis de *Eisenia foetida* se detalla en la **Figura 4.1**, en donde se observa la actividad de los compuestos, en donde un menor tiempo de parálisis se asocia a una actividad antihelmíntica destacada.

Se destaca que, de los 7 compuestos ensayados, sólo 6 presentaron actividad antihelmíntica en cuanto al tiempo de parálisis, todos estos compuestos presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al albendazol. Se observa que el orden en cuanto a la actividad es el siguiente linalol > *cis*-verbenol > óxido de cariofileno > (*S*)-(-)-limoneno y (*R*)-(+)-limoneno > *trans*-anetol, resaltando que el único compuesto que no causó la parálisis fue el β -cariofileno razón por la que no aparece en la **Figura 4.1**, Teniendo en cuenta el orden en las actividades de los compuestos se aprecia que en líneas generales los compuestos linalol y *cis*-verbenol mostraron mejor actividad, esto resulta coherente ya que ambos comparten como característica común el grupo funcional hidroxilo, dichos compuestos presentaron mejores tiempos de parálisis no solo respecto al albendazol sino también respecto a los demás compuestos ensayados. La similitud entre ambos compuestos radica en que ambos poseen como grupo funcional el hidroxilo, por lo que se sugiere que dicho grupo funcional tiene gran implicancia en la actividad de la molécula frente a los helmintos. Las diferencias entre ambos compuestos son varias: el linalol es un monoterpeno acíclico cuyo grupo funcional es un alcohol terciario y el *cis*-verbenol es un monoterpeno biciclo que presenta como grupo funcional un alcohol secundario, por tanto, presentan una diferencia estructural y espacial importante por lo que se observó entre estos compuestos también una diferencia estadísticamente significativa siendo más favorable para el compuesto linalol como se observa en la **Tabla 4.2**.

El óxido de cariofileno presentó una importante actividad, pero por debajo de la actividad de los compuestos anteriormente mencionados, se resalta que el óxido de cariofileno presentó una actividad superior respecto a la molécula análoga

hidrocarbonada, el β -cariofileno, siendo la principal diferencia entre dichos compuestos la presencia de oxígeno en la estructura del óxido de cariofileno lo que le confiere actividad a dicha molécula.

En cuanto al (*S*)-(-)-limoneno y (*R*)-(+)-limoneno, ambos presentaron una actividad similar entre ellos ya que no presentaron diferencias estadísticamente significativas, en cuanto a la química de dichos compuestos estos presentan una estructura hidrocarbonada, por ende presentan un carácter lipofílico y la actividad podría estar asociada con dicho carácter pero la acción no es estereoespecífica al no haber diferencia entre ambos y el último compuesto es el *trans*-anetol, que a pesar de poseer un oxígeno en su estructura no superó la actividad de los compuestos hidrocarbonados mencionados anteriormente. Dado esto último, se infiere que la sola presencia de oxígeno no confiere actividad significativa, sino además la forma en que se encuentra (alcohol, éter) y su ubicación en la molécula. El *trans*-anetol y el óxido de cariofileno son éteres, pero en el caso de este último el éter es un oxaciclopropano y estos son muy susceptibles a sufrir apertura por ataque de nucleófilos presentes en el medio.



A= Albendazol 1 mg/mL, B= (*R*)-Limoneno C= (*S*)-Limoneno, D= linalol ,E=(*S*)-*cis*-Verbenol, F= *Trans*-Anetol, G= Óxido de Cariofileno.

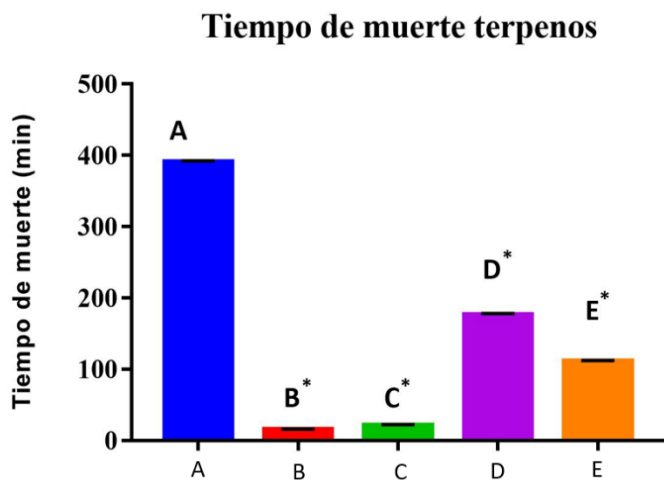
Las letras marcadas con asterisco indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control.

Figura 4.1. Actividad antihelmíntica. Tiempo de parálisis. Los valores fueron expresados en promedio $\pm$ desvío estándar y las diferencias significativas señaladas con una $p < 0,05$ (ANOVA, Tukey).

Tabla 4.2. Resultados de la prueba de Anova y Tukey entre los compuestos ensayados en cuanto al Tiempo de parálisis.

Compuestos testados	Diferencia significativa
(R)-(+)- limoneno vs. (S)-(-)-limoneno	No
(R)-(+)- limoneno vs. Linalol	Sí
(R)-(+)- limoneno vs. (S)- <i>cis</i> -verbenol	Sí
(R)-(+)- limoneno vs. <i>trans</i> -anetol	Sí
(R)-(+)- limoneno vs. (-)-óxido de cariofileno	Sí
(S)-(-)-limoneno vs. Linalol	Sí
(S)-(-)-limoneno vs. (S)- <i>cis</i> -verbenol	Sí
(S)-(-)-limoneno vs. <i>trans</i> -anetol	Sí
(S)-(-)-limoneno vs. (-)-óxido de cariofileno	Sí
linalol vs. (S)- <i>cis</i> -verbenol	Sí
linalol vs. <i>trans</i> -anetol	Sí
linalol vs. (-)-óxido de cariofileno	Sí

Respecto al tiempo de muerte los resultados se observan en la **Figura 4.2**, y el orden de actividad de compuestos que provocaron la muerte del helminto es linalol > *cis*-verbenol > óxido de cariofileno > *trans*-anetol, teniendo en cuenta que el (R)-(+)- limoneno, (S)-(-)-limoneno, y el β -cariofileno no causaron la muerte. Se destaca en función a lo observado hasta el momento que los grupos funcionales hidroxilos o la presencia de oxígeno en la estructura, presentan una importante contribución para su acción letal, sin embargo, establecer una relación estructura actividad se hace difícil cuando los compuestos químicos presentan una diversidad estructural ya que se deben establecer entre compuestos estructuralmente relacionados (U. P. Singh et al., 2012).



A= Albendazol 1 mg/mL, B= Linalol, C=(S)-*cis*-Verbenol, D= *Trans*-Anetol, E= Óxido de Caric
Las letras marcadas con asterisco indican diferencias estadísticamente significativas respec

Figura 4.2. Actividad antihelmíntica. Tiempo de muerte. Los valores fueron expresados en promedio $\pm$ desvío estándar y las diferencias significativas señaladas con una $p < 0,05$ (ANOVA, Tukey).

4.4 Obtención de los derivados semisintéticos

4.4.1 Obtención del acetato de linalilo

Se obtuvieron 814 mg de producto luego de transcurridos 10 días de reacción.

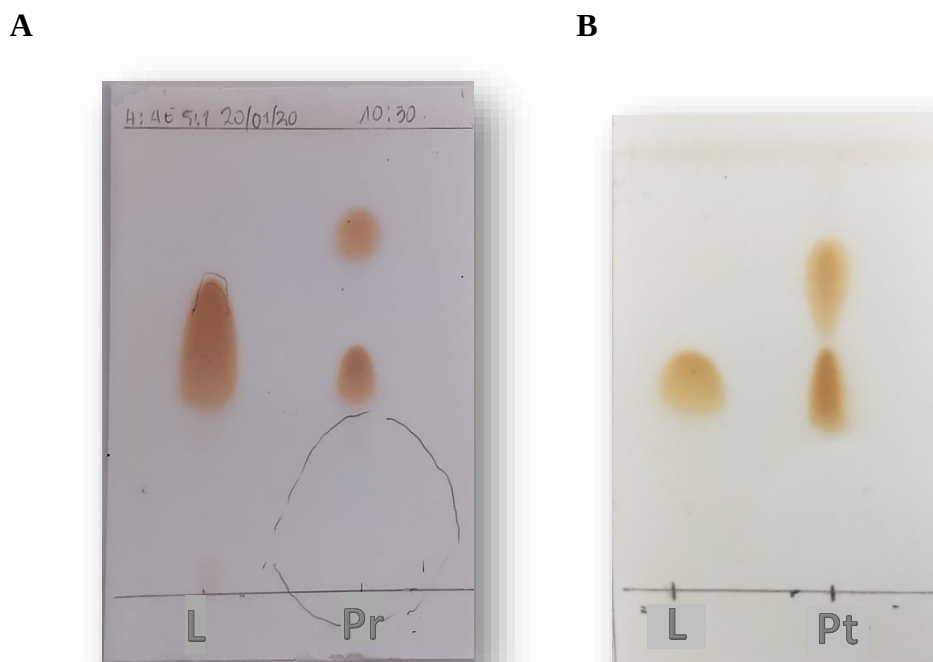


Figura 4.3. Cromatografía en capa fina revelada con Oleum. A. Seguimiento de la reacción de acetilación del linalol con fase móvil hexano: acetato de etilo (9:1), **B.** Reacción culminada. L= estándar linalol Pr= producto de reacción Pt= producto terminado

Se observó que conforme transcurrió el tiempo, el reactivo de partida se fue consumiendo y a la vez se dio la formación de un producto que se visualizó a través de la cromatografía en capa fina tal como se muestra en la **Figura 4.3.A**. En la misma se puede apreciar una mancha que corresponde al producto formado de un color naranja en la parte superior de la placa al ser revelado con Oleum, dicho producto presenta una relación de frente (R_f) de 0,90, la polaridad de este es menor que el linalol como se observa en la **Figura 4.3.B**, es decir es más apolar que el reactivo de partida lo cual resulta coherente ya que en la reacción se busca la formación del éster del linalol denominado acetato de linalilo. Es importante tener en cuenta que no solo se observa el producto de la reacción sino también el reactivo de partida el linalol con una R_f de 0,52, cuya polaridad es mayor debido al grupo hidroxilo en su estructura. Se destaca que la presencia del linalol junto con el producto en la reacción se dio debido a que no se consumió completamente el reactivo de partida, pero si se redujo en gran medida; la reacción fue analizada por varios días y se observó que la reducción del reactivo de partida y el aumento del producto ocurrió hasta el día 10,

posterior a esos días no se percibieron cambios por lo que se consideró 10 días como tiempo de reacción óptimo.

Los 814 mg de masa obtenida de la reacción, se sometieron a purificación por cromatografía en columna de la que se obtuvieron 361,4 mg de producto puro y 230,4 mg de linalol. Teniendo en cuenta estos valores se realizó el cálculo de rendimiento respecto al reactivo de partida y el producto formado y purificado, que se detalla a continuación **Ec (1)**;

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{producto formado y purificado}}{\text{reactivo de partida}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Rendimiento} = \frac{361.4}{504.8} \times 100 = 71,6 \% \quad (2)$$

El rendimiento obtenido fue de 71,6% como se observa en la **Ec (2)** en líneas generales presenta un buen rendimiento contemplando que dicho valor relaciona no solo la cantidad de producto formado, sino también de producto recuperado del proceso de purificación.

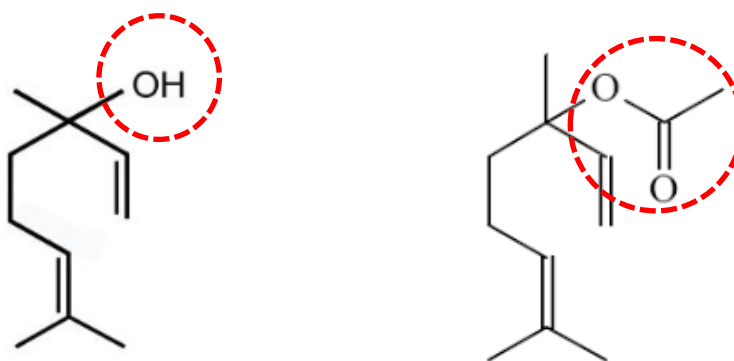
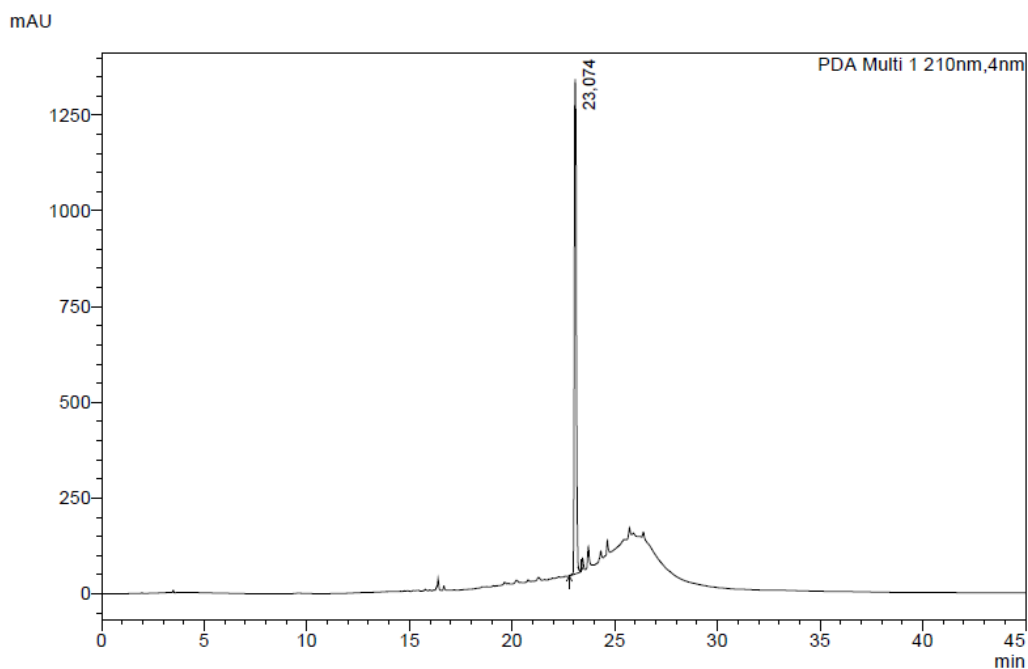


Figura 4.4. Estructura del A: linalol, **B:** acetato de linalilo

Tal como se observa en la **Figura 4.4** en la reacción se procedió a sustituir el grupo hidroxilo del linalol por un grupo éster y para verificar dicho cambio se procedieron a realizar análisis cromatográficos. Primeramente, se procedió a realizar una cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), donde se obtuvieron los cromatogramas tal como se observa en la **Figura 4.5.A y 4.5.B** en donde el tiempo de retención del reactivo de partida el linalol fue de 23,074 min y el tiempo de

retención del producto obtenido y purificado fue de 25,533 min, lo que resulta coherente ya que el producto obtenido al reemplazar el grupo hidroxilo por el éster, es más apolar respecto al compuesto de partida razón por la que en una cromatografía de fase reversa se espera que el compuesto más apolar tenga un tiempo de retención superior respecto al compuesto más polar. Entonces en el cromatograma observamos primeramente que se obtuvo un compuesto puro y distinto al reactivo de partida que se refleja por la diferencia en el tiempo de retención entre ambos compuestos.

A**B**

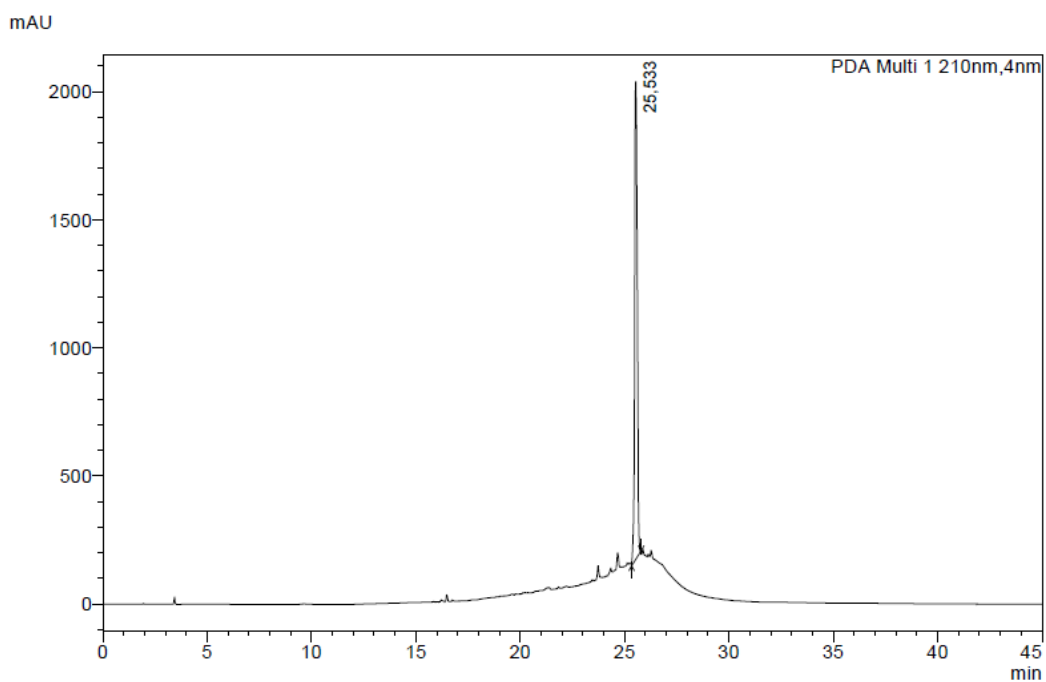


Figura 4.5. Cromatograma. A: linalol, B:acetato de linalol

Posteriormente se realizó la cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a espectrómetro de masas (UPLC / MS) que se destalla en la **Figura 4.6** , en el modo Scan ES+ realizamos la búsqueda del ion molecular (197, M+H), señal observada mediante un pico prominente a los 6,46 minutos..

A

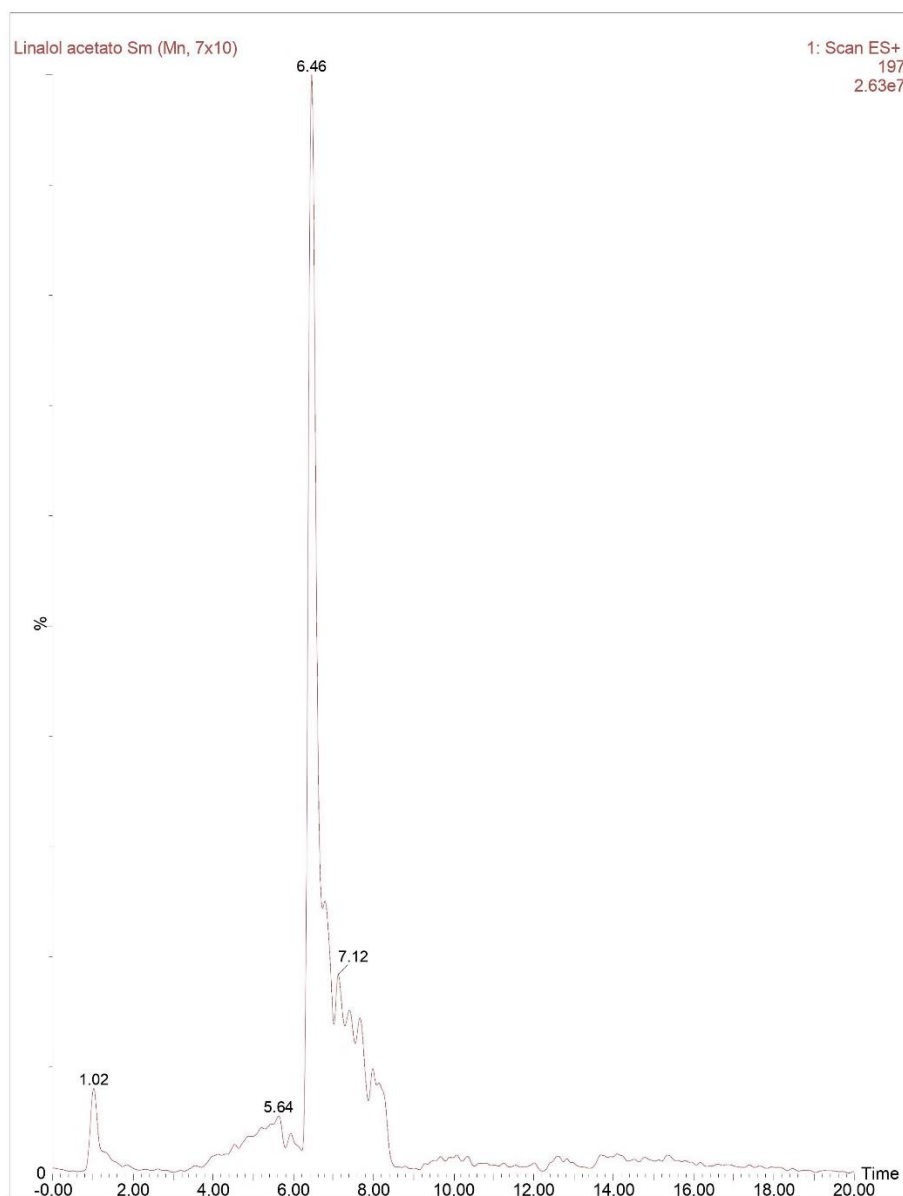


Figura 4.6. Cromatograma del acetato de linalol

Posteriormente obtuvimos el espectro de masa asociado a dicho pico y se puede distinguir tal como se observa en la **Figura 4.7** en la que se distingue el ion molecular característico del acetato de linalilo que es de 197, los demás fragmentos corresponden a fragmentos propios de la molécula.

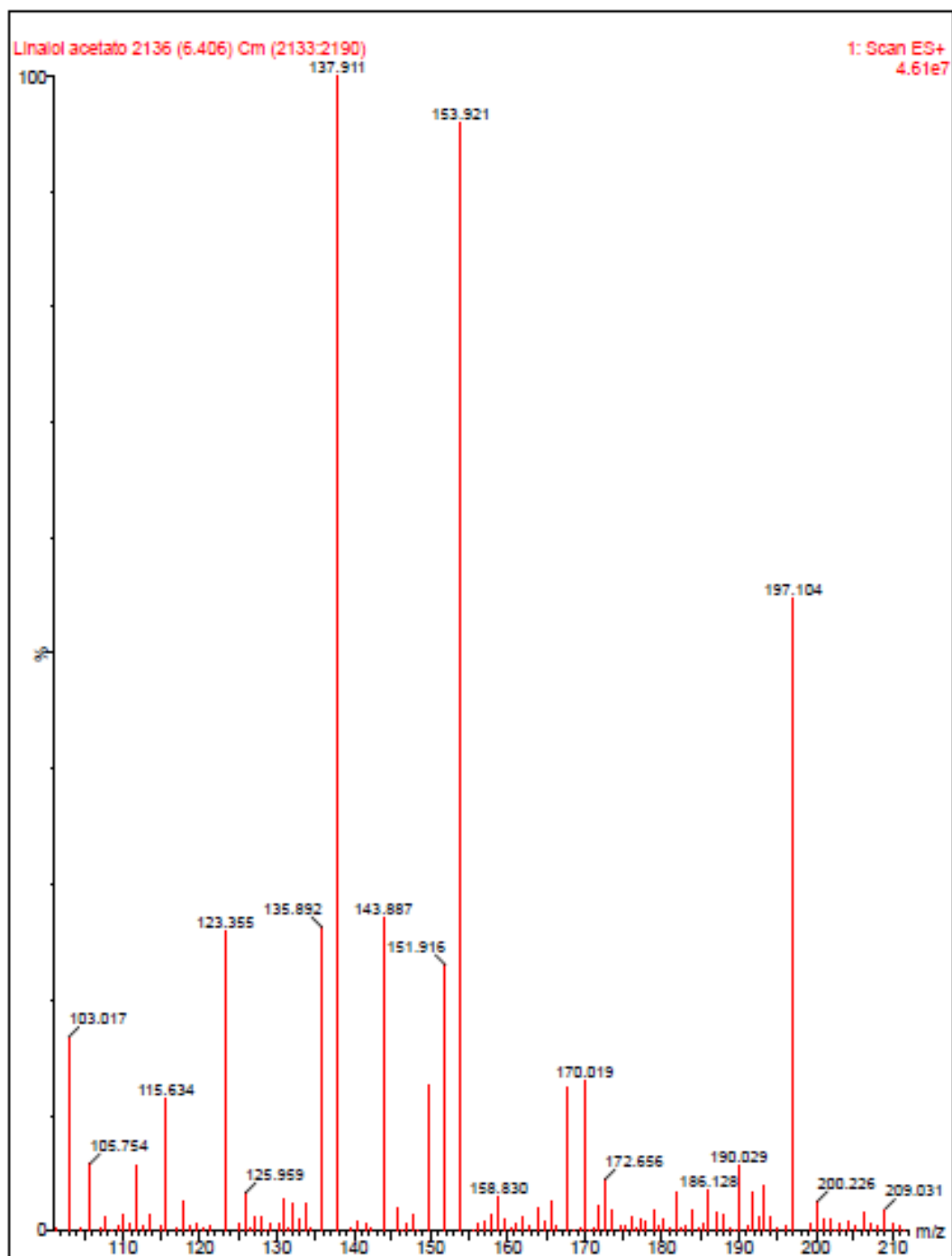
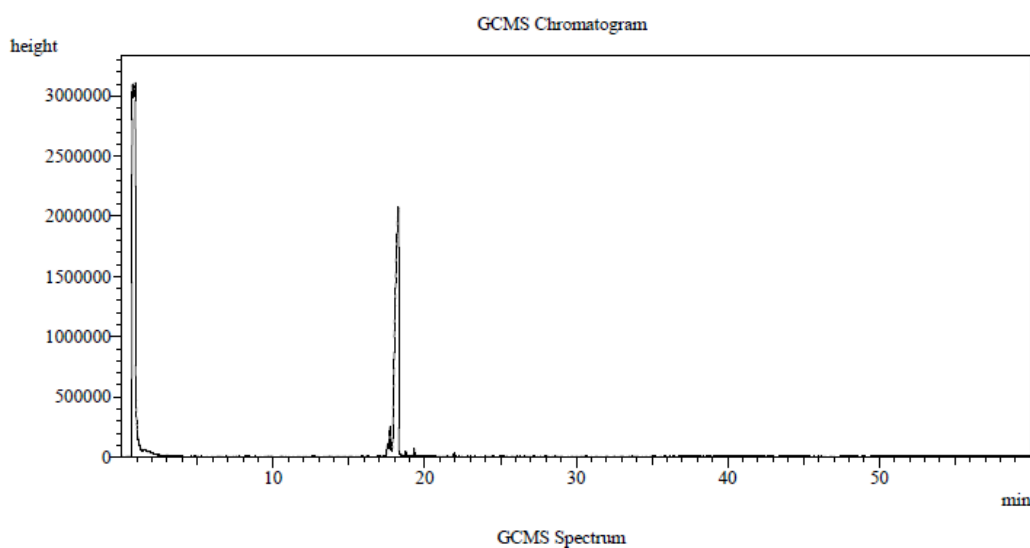


Figura 4.7. Espectro de masa del derivado semisintético del linalol

Finalmente, luego de realizar la cromatografía gaseosa acoplada a un espectro de masa obtuvimos el cromatograma que se observa en la **Figura 4.8.A**, en la que se observa un pico prominente cuyo espectro de masas se observa en la **Figura 4.8.B**, en donde se observa la fragmentación característica del compuesto y que tras

comparar con la base de datos arroja una alta similitud con la estructura del acetato de linalilo. Teniendo en cuenta los diferentes análisis instrumentales realizados al derivado del linalol todos los datos apuntan que la síntesis del éster del linalol fue exitosa, obteniéndose así el acetato de linalilo que es un líquido viscoso incoloro.

A



B

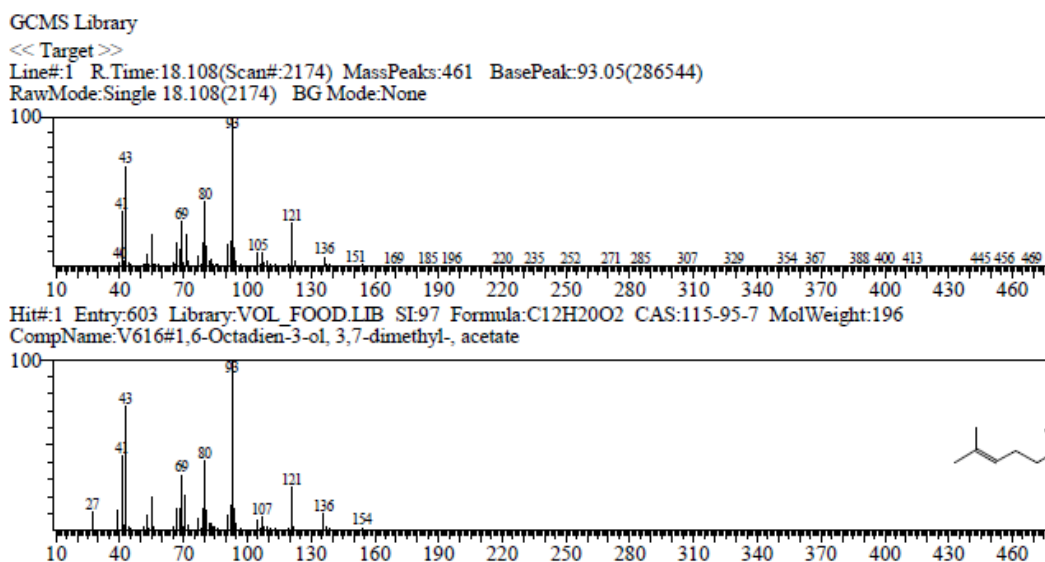
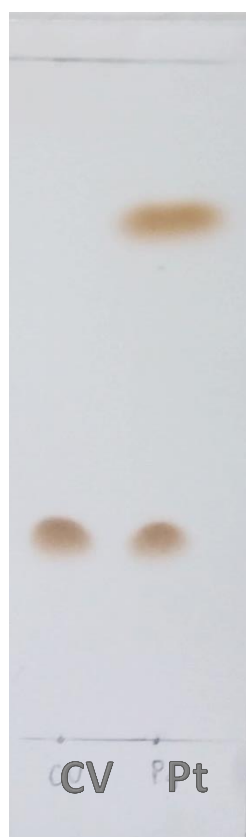


Figura 4.8. A: Cromatograma del derivado semisintético del linalol **B:** Espectro de masa del derivado semisintético del linalol

4.4.2 Obtención de acetato de *cis*-verbenol

Se obtuvieron 672,5 mg como producto de reacción luego de transcurrir cinco horas y cuarenta y cinco minutos. La reacción ocurrió rápidamente el reactivo de partida se consumió casi transcurrido el tiempo mencionado arriba, el seguimiento de la reacción se realizó por cromatografía en capa delgada como se observa en la **Figura 4.9.A y 4.9.B** en la que se observó al producto con una relación de frente de 0,77 que es lo que esperábamos respecto a la polaridad del compuesto ya que el derivado obtenido es más apolar respecto al reactivo de partida el *cis*-verbenol con una relación de frente de 0,29.

A



B

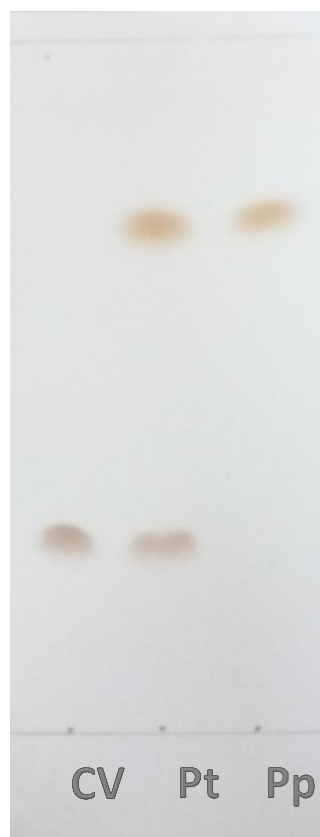


Figura 4.9. Cromatografía en capa fina revelada con Oleum. A. Seguimiento de la reacción de acetilación del *cis*-verbenol con fase móvil hexano: acetato de etilo (9:1), **B.** Producto luego de la purificación. CV= estándar *cis*-verbenol Pt= producto de reacción ya terminado Pp= producto ya purificado.

Luego del proceso de purificación se obtuvieron 500,9 mg del derivado, lo que arrojó un rendimiento de 93,4% que refleja la gran cantidad de producto formado en la reacción y el consumo casi total del reactivo de partida, a la vez es un indicativo que el proceso de purificación fue exitoso con una gran capacidad de recuperación del producto purificado. Por lo antedicho, el rendimiento de la reacción se considera muy bueno.

$$\text{Rendimiento} = \frac{500,9}{536,2} \times 100 = 93,4 \%$$

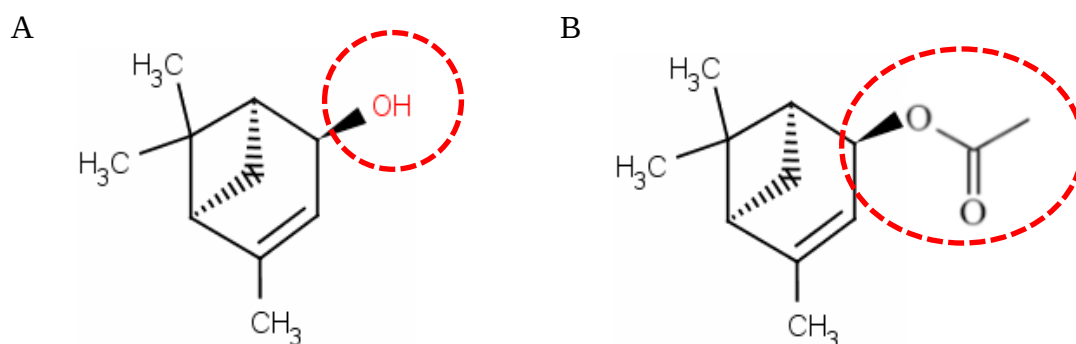
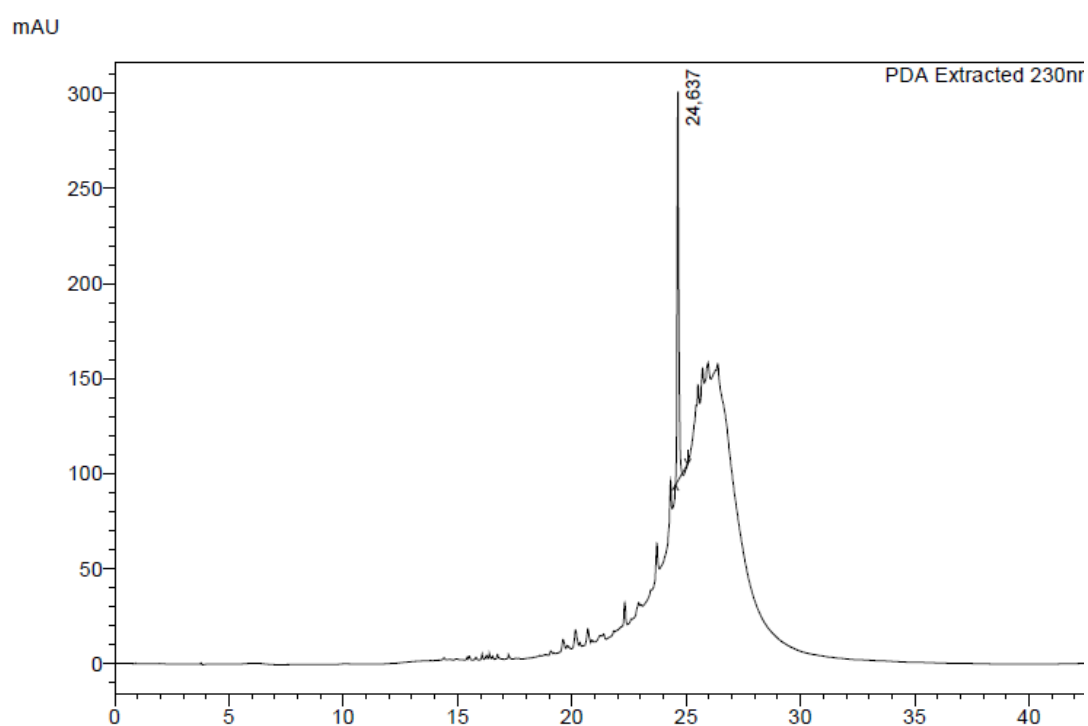


Figura 4.10. Estructura del A: *cis*-verbenol, **B:** acetato de *cis*-verbenol

Como se observa en la **Figura 4.10** el producto es más apolar respecto a su precursor debido al bloqueo del grupo hidroxilo como éster. Para determinar si se obtuvo el producto deseado realizamos la cromatografía líquida de alta eficacia, cuyos cromatogramas se observan en la **Figura 4.11.A y 4.11B** en la que observamos que el tiempo de retención para el *cis*-verbenol es de 24,637 min y la señal perteneciente al producto con característica más apolar es de 25,712 min. Este análisis instrumental nos permite verificar el éxito del proceso de purificación observándose el producto obtenido de manera pura y con un tiempo de retención coherente y esperado teniendo en cuenta la polaridad de la nueva molécula obtenida.

Seguidamente se realizó la cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a espectrómetro de masas (UPLC / MS) que se observa en la **Figura 4.12**, en el modo Scan ES+ en el que se realizó la búsqueda del ión molecular ($M+H = 195$). Se observó un pico prominente a los 6,25 min con la masa buscada.

A



B

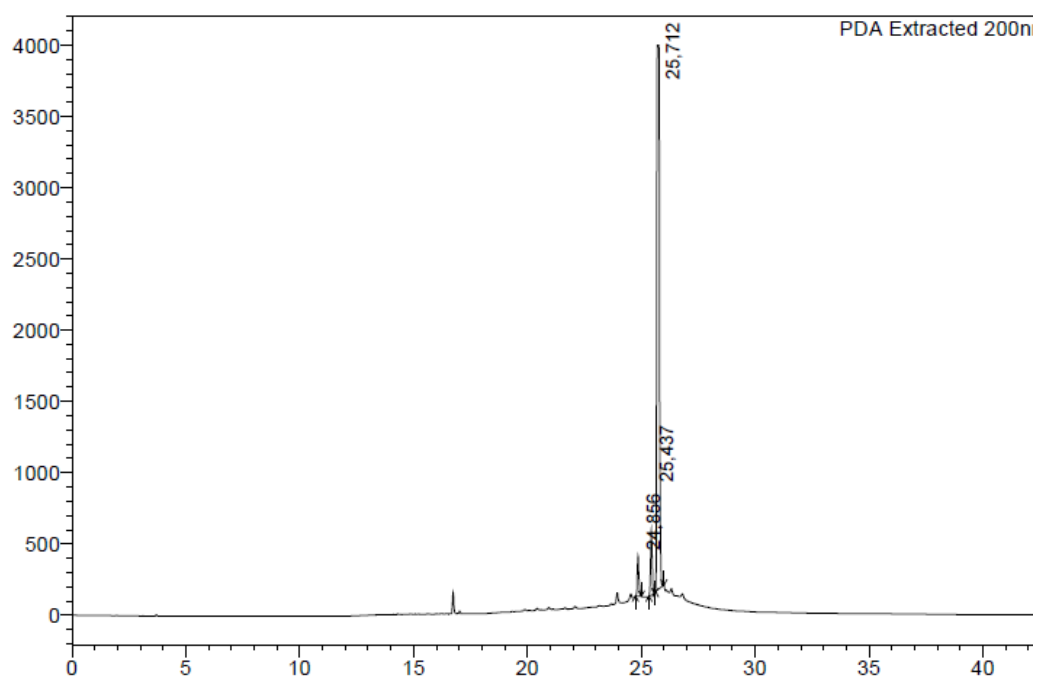


Figura 4.11. Cromatograma. A: *cis*-verbenol, **B:** del derivado semisintético del *cis*-verbenol

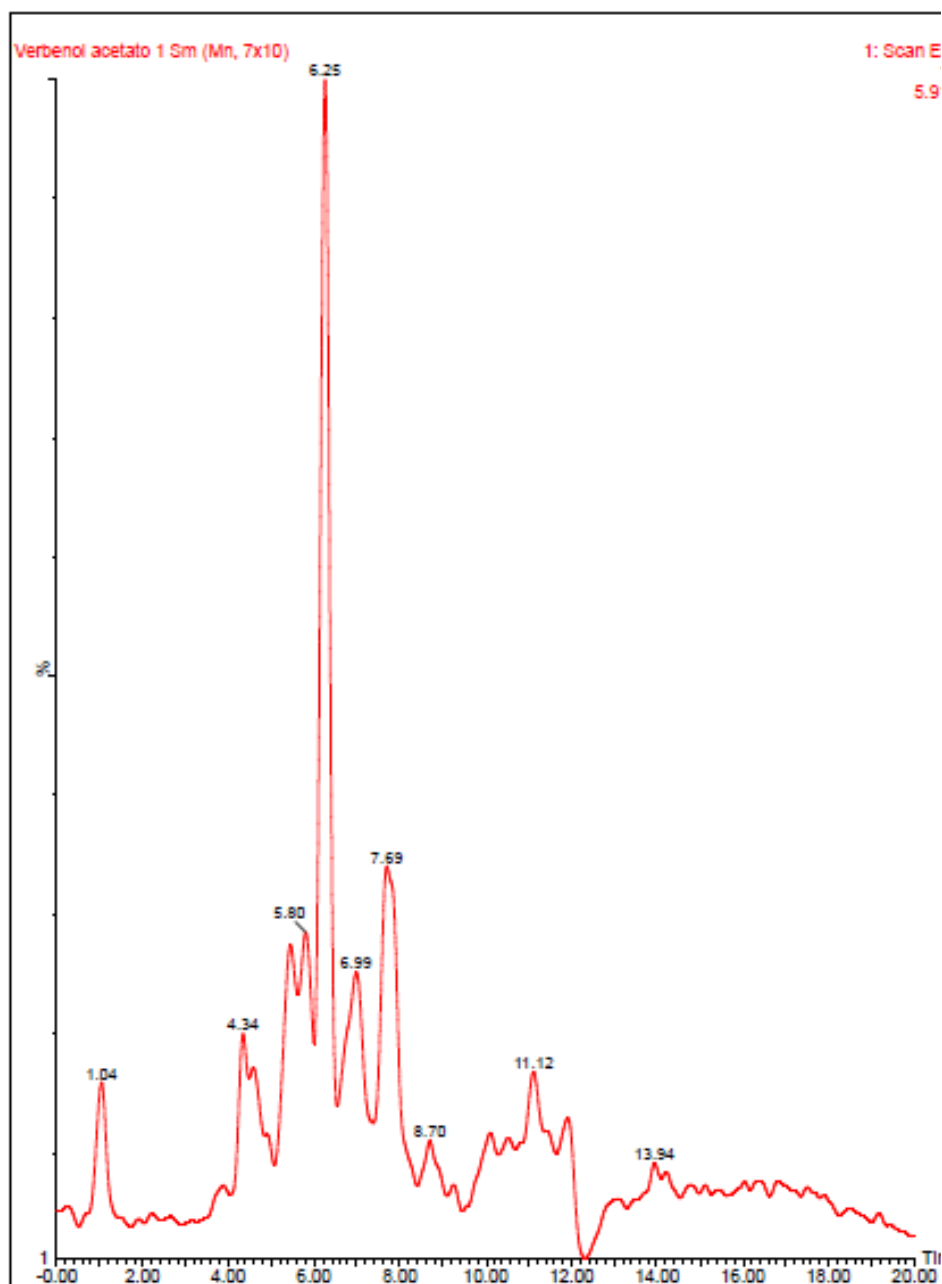


Figura 4.12. Cromatograma del derivado semisintético del *cis*-verbenol

En cuanto al espectro de masa obtenido que se muestra en la **Figura 4.13** para el derivado del *cis*-verbenol, se pudo observar el ion molecular asociado a dicho compuesto que es el 194,315, la diferencia respecto valor teórico de 195 se debe a que el equipo detecta masas nominales y a las condiciones de ionización, pero el ion encontrado sugiere la correcta incorporación del grupo éster.

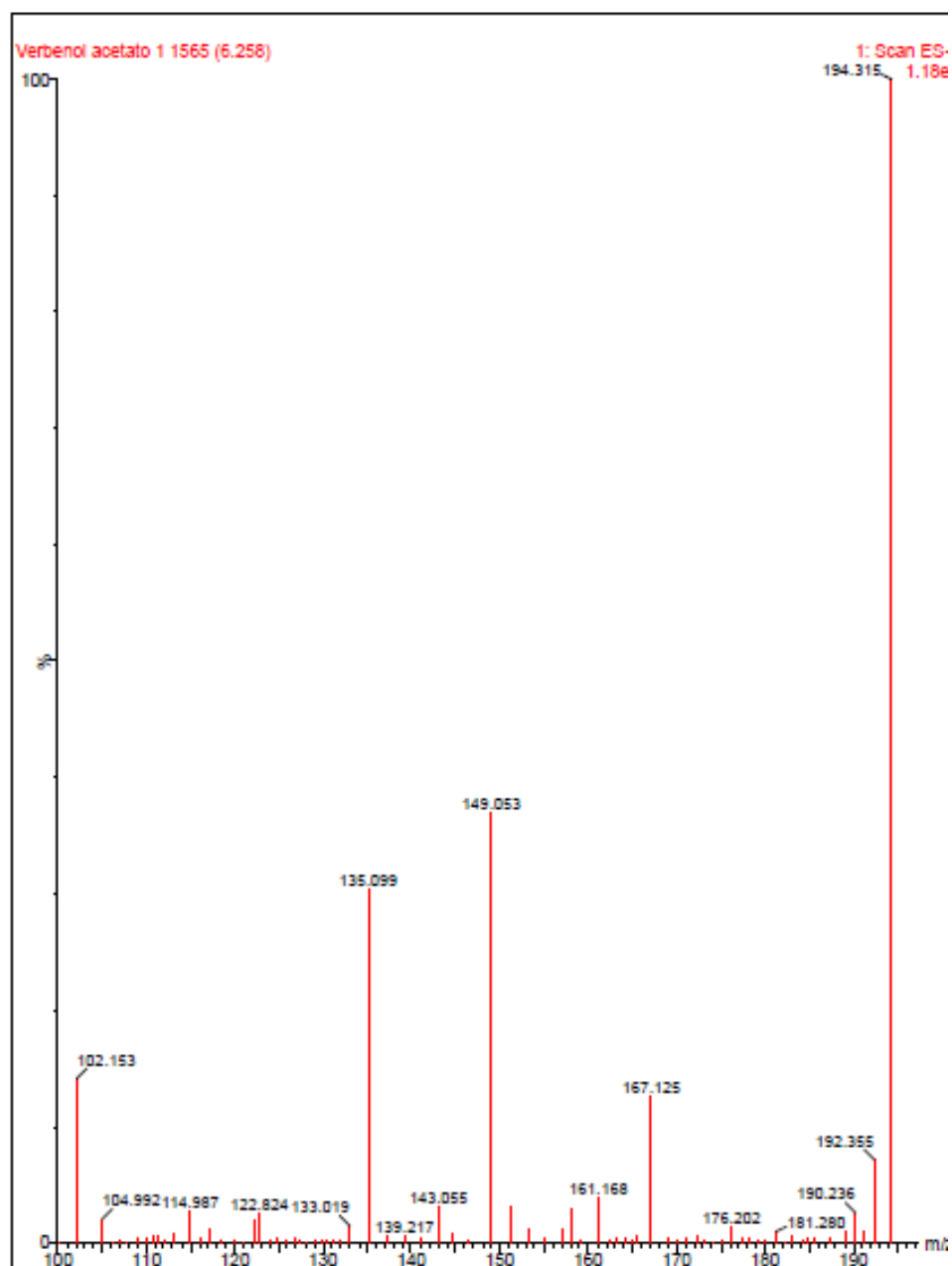
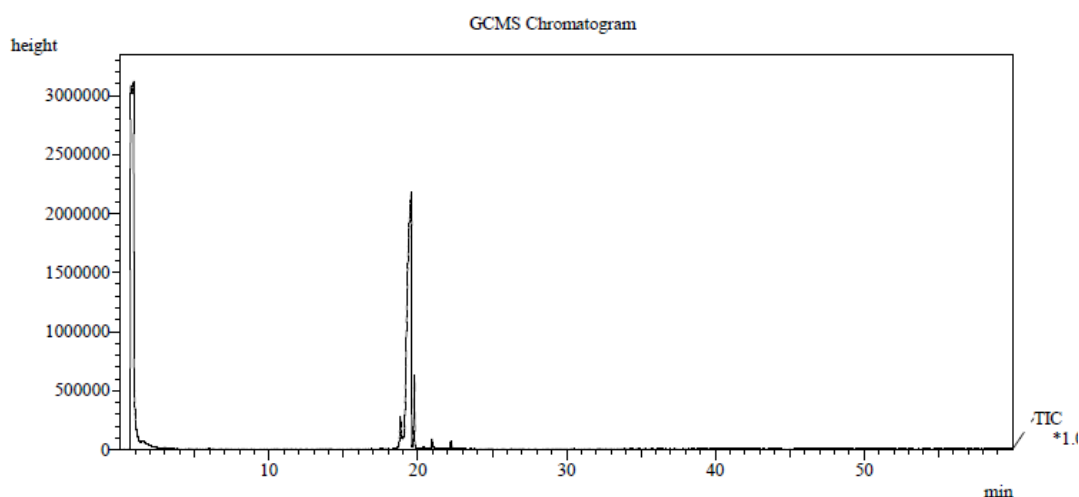


Figura 4.13. Espectro de masa del derivado semisintético del cis-verbenol

A fin de confirmar la identidad del producto obtenido realizamos una cromatografía gaseosa acoplada a un espectro de masa, obteniéndose el cromatograma que se observa en la **Figura 4.14 A**, en la que se destaca un pico prominente cuyo

espectro de masas de impacto electrónico se comparó con los disponibles en la base de datos del equipo como se observa en la **Figura 4.14B**, identificándose el compuesto como el acetato de *cis*-verbenol, respaldando de esta manera el haber obtenido el compuesto buscado.

A



B

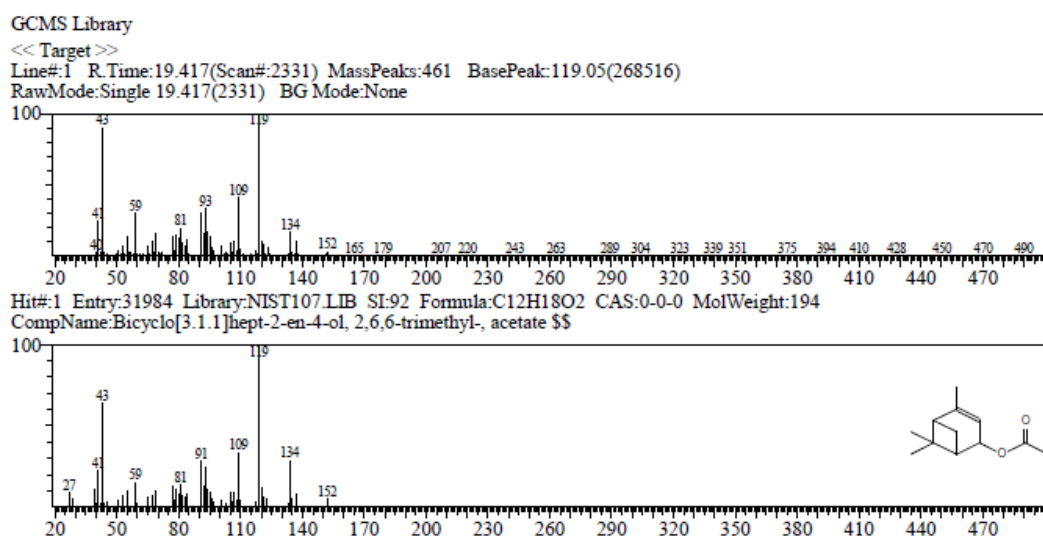
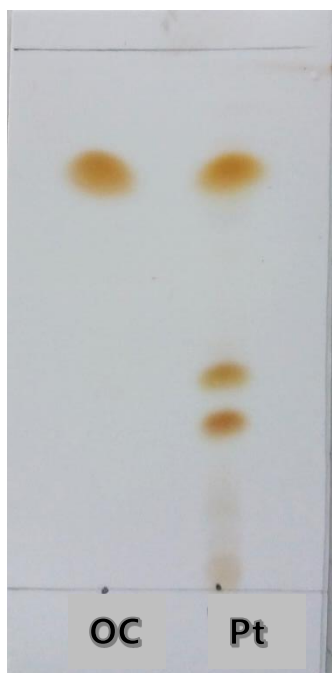


Figura 4.14. A: Cromatograma del derivado semisintético del *cis*-verbenol **B:** Espectro de masa del acetato de *cis*-verbenol

4.4.3 Obtención del diepóxido de cariofileno

Luego de culminar la reacción del derivado del óxido de cariofileno obtuvimos una masa de 1149,4 mg, luego de un periodo de reacción de 5 días. Se realizó el seguimiento de la reacción cada 24 horas y se observó la formación de dos productos de mayor polaridad respecto al precursor el óxido de cariofileno tal como se observa en la cromatografía de capa fina en la **Figura 4.15** en donde el primer compuesto presenta una relación de frente de 0,38 y el segundo de 0,25, los cuales son los productos de la reacción. Respecto a la polaridad de los productos resulta coherente, ya que al introducir en la estructura otro epóxido se espera que la molécula presente un aumento en su polaridad lo que es congruente con los resultados que se observan en la cromatografía.

A



B



Figura 4.15. Cromatografía en capa fina revelada con Oleum. A. Seguimiento de la reacción de epoxidación del óxido de cariofileno con fase móvil hexano: acetato de etilo (9:1), B. Producto luego de la purificación. OC= óxido de cariofileno Pt= reacción terminada Pp= producto purificado

En cuanto al rendimiento del compuesto de relación de frente de 0,38 fue de 22,2% como se observa en la **Ec (3)**, lo cual es un rendimiento bajo, por lo que requirió la repetición sucesiva del proceso para la obtención de una cantidad apropiada. El rendimiento asociado al segundo compuesto de relación de frente de 0,25 no se pudo

determinar exactamente ya que durante la purificación ocurrieron ciertas pérdidas del mismo.

$$\text{Rendimiento} = \frac{233,275}{1050} \times 100 = 22,2 \% \quad (3)$$

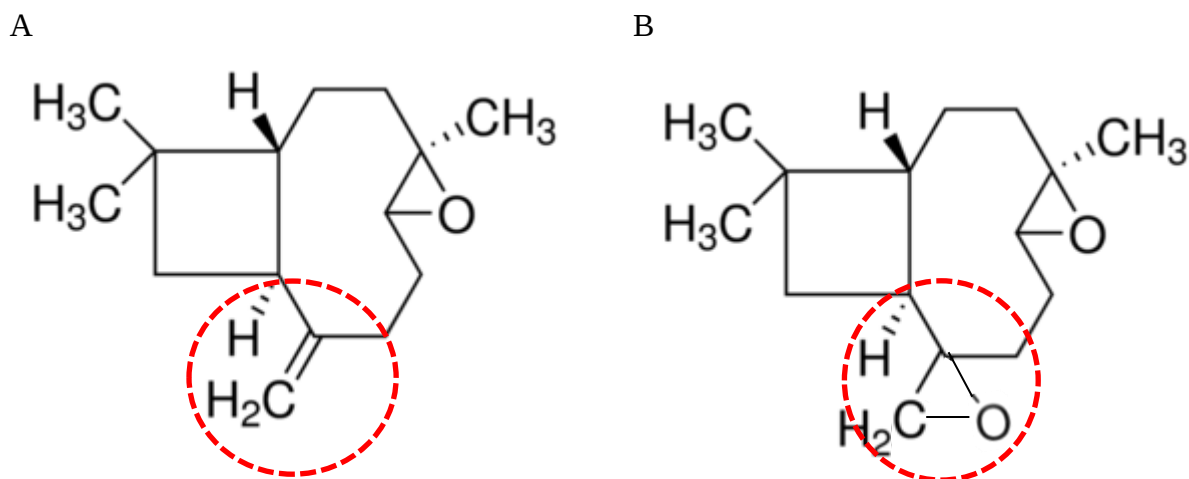


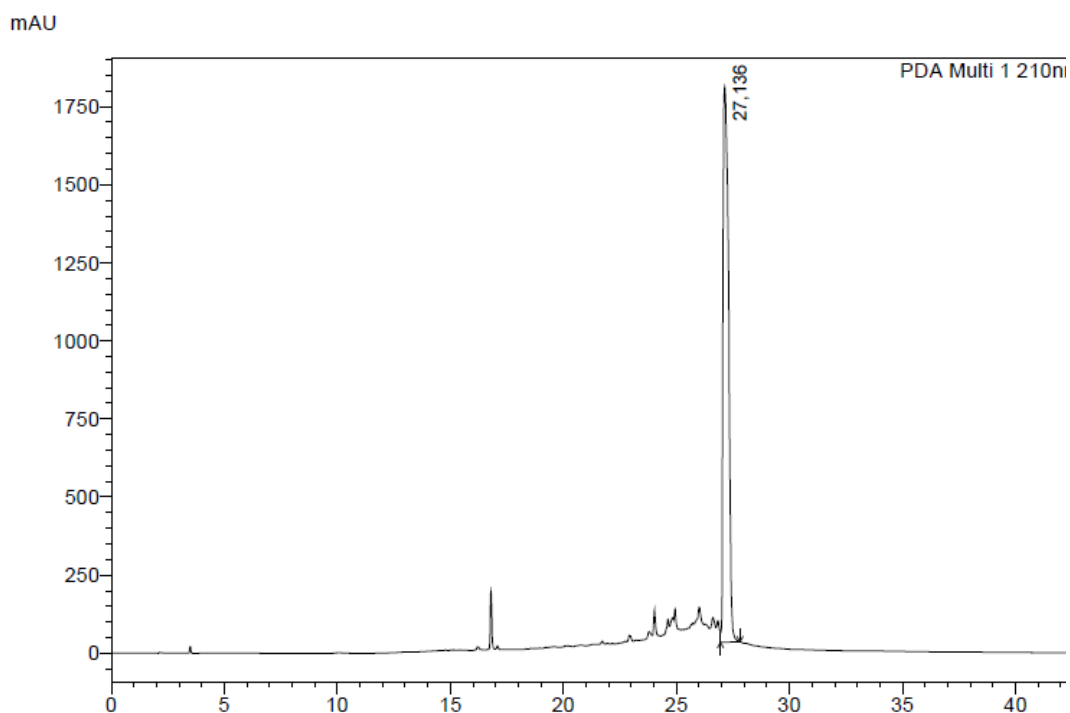
Figura 4.16. Estructura del **A:** óxido de cariofileno, **B:** diepóxido de cariofileno

Luego del proceso de purificación del compuesto con relación de frente 0,38 se realizó el análisis por cromatografía líquida de alta eficacia y se obtuvieron los cromatogramas que se aprecian en la **Figura 4.17.A y 4.17.B** en la que se observó un tiempo de retención de 25,952 minutos para el producto de síntesis que es menor respecto al óxido de cariofileno que presentó un tiempo de retención de 27,136 minutos, lo cual es coherente ya que se espera que los compuestos más polares aparezcan primero en la cromatografía de fase reversa y también se corrobora que el compuesto se encuentra puro.

Al analizar el compuesto por UPLC-MS en la **Figura 4.18** se observa un pico prominente al realizar la búsqueda del ion molecular 237 (M+H) a un tiempo de 6,54 minutos. Como no se pudo realizar el análisis por cromatografía gaseosa se realizó la fragmentación y búsqueda de iones hijos, como se observa en la **Figura 4.19**. En la misma se observa el ion molecular característico del compuesto (m/z 237). Al analizar los demás fragmentos se puede apreciar que la masa 219 corresponde a la masa del diepóxido de cariofileno con la pérdida de una molécula de agua, que es la forma en

que se pierde el primer grupo epóxido, seguidamente observamos la masa 200,8 que corresponde a la masa del diepóxido de cariofileno pero ya con la pérdida de una segunda molécula de agua indicando que el compuesto poseía dos átomos de oxígeno. El análisis de estos fragmentos sugiere la correcta incorporación del epóxido en la estructura. El segundo compuesto que no ha podido aislarse en cantidades adecuadas debe corresponder al otro isómero, ya que la epoxidación puede suceder por ambas caras del doble enlace. No obstante, se intentará volver a sintetizarlo y confirmar esto posteriormente.

A



B

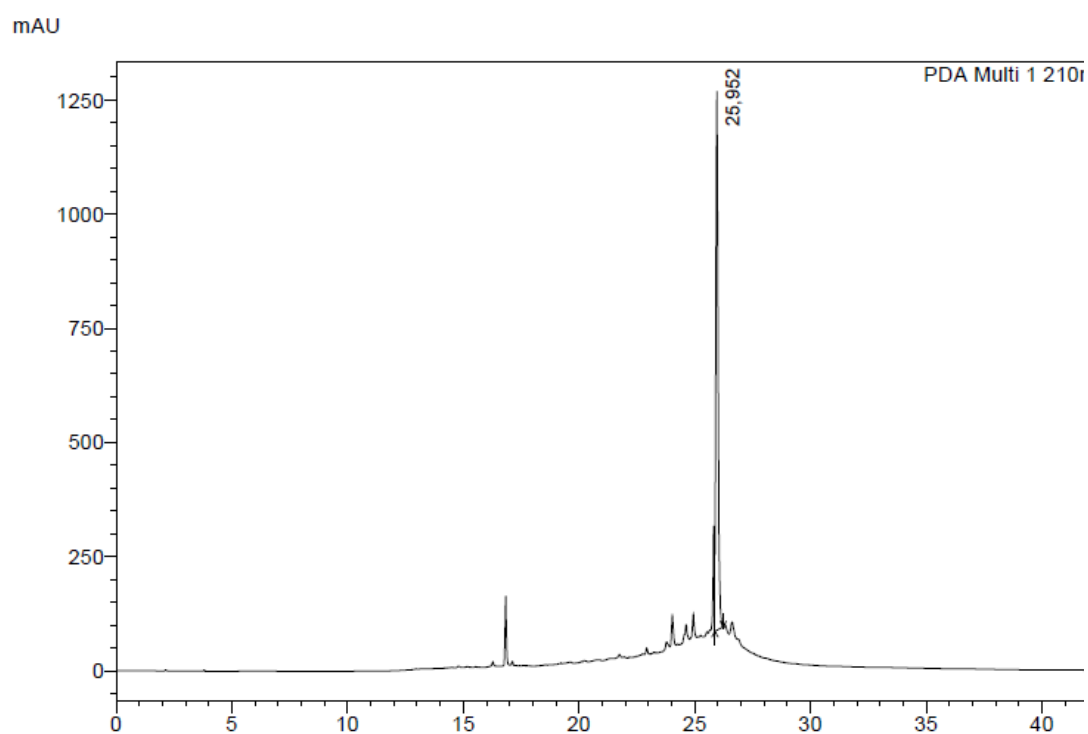


Figura 4.17. Cromatograma. A: óxido de cariofileno, **B:** del derivado semisintético del óxido de cariofileno

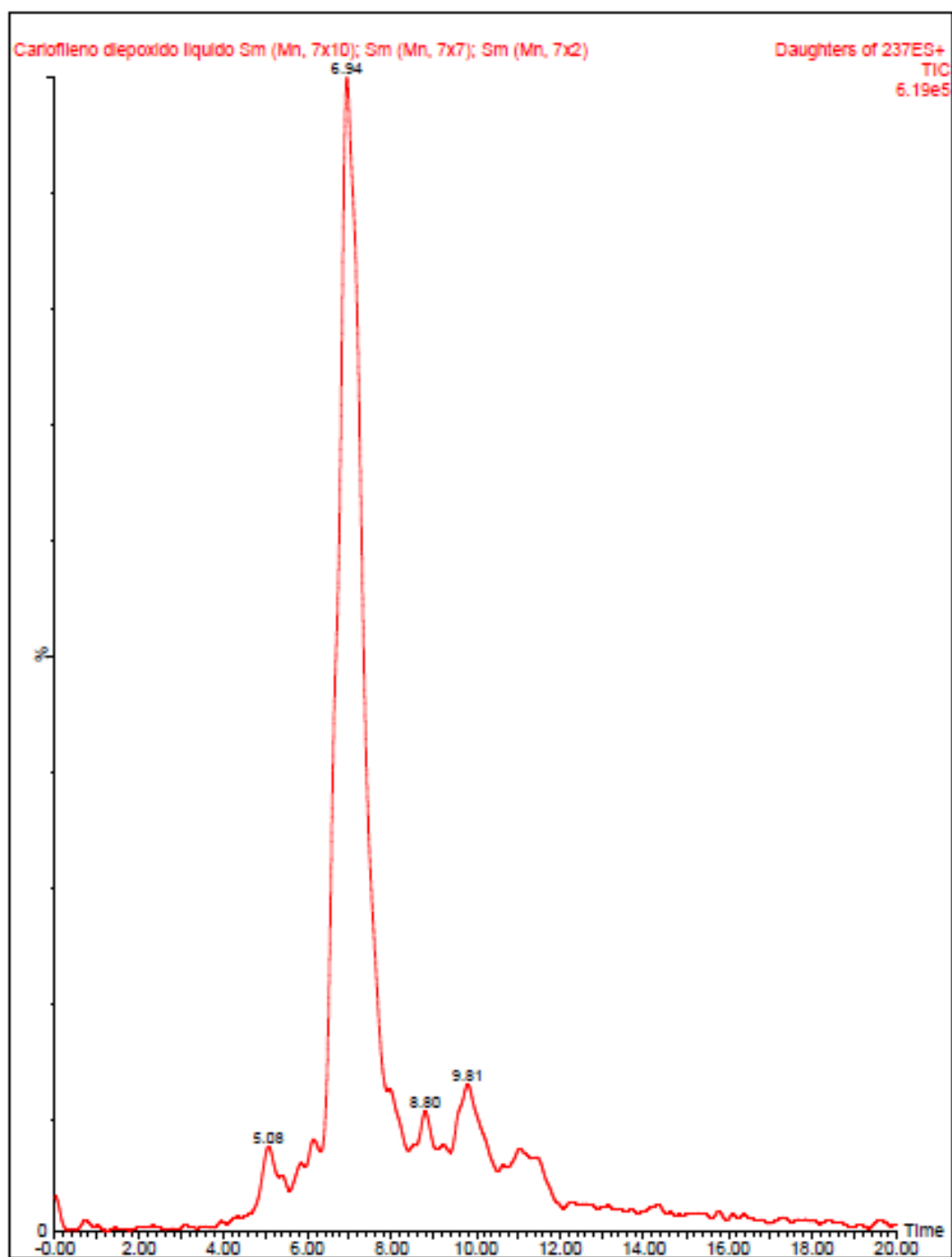


Figura 4.18. Cromatograma del derivado semisintético del óxido de cariofileno con relación de frente de 0,38

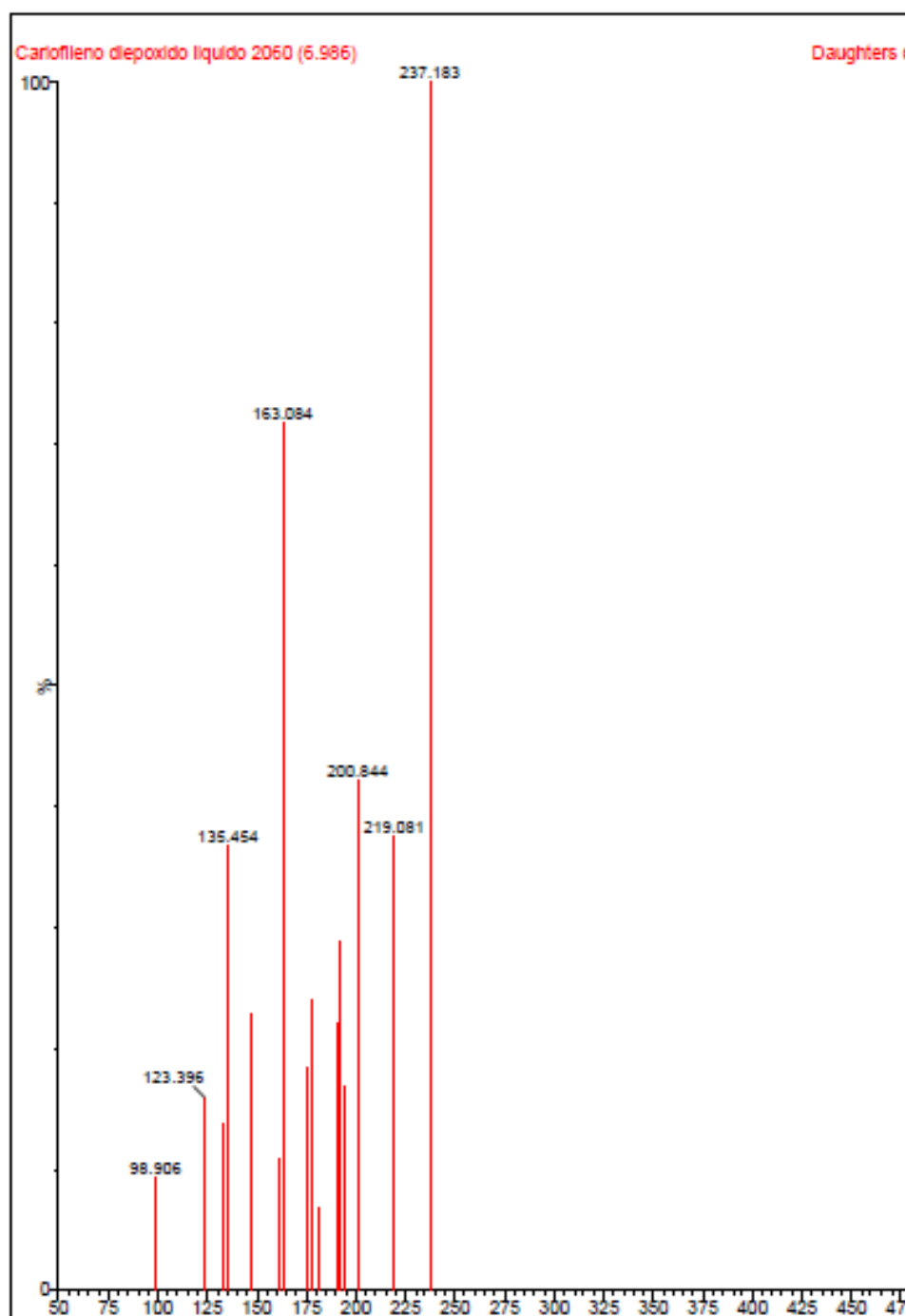


Figura 4.19. Espectro de masa del compuesto de relación de frente 0,38

La caracterización definitiva requerirá de espectros de resonancia magnética nuclear.

4.5 Actividad biológica de los derivados obtenidos

4.5.1 Actividad antimicrobiana de los derivados semisintéticos

La actividad antimicrobiana de los compuestos y sus derivados se detallan en la **Tabla 4.3**.

Analizando el primer derivado obtenido el acetato de linalol se observa que al reemplazar el grupo hidroxilo del linalol e introducir el grupo éster en la estructura base dicho cambio provocó la pérdida de la actividad antimicrobiana para las tres cepas de STEC ensayadas, lo que refleja que el grupo hidroxilo en la estructura del linalol es fundamental para su actividad contra estas bacterias y que el grupo éster introducido no es apropiado para obtener una buena actividad. En cuanto al derivado semisintético obtenido del (S)- *cis*-verbenol, el acetato de (S)- *cis*-verbenol, el cambio provocó la disminución de la actividad antimicrobiana presentando una CMI mayor que el compuesto base, la pérdida de actividad sin embargo fue parcial ya que la CMI reportada fue de 12500 µg/mL, a diferencia del producto acetilado de linalol que presentó la pérdida total de actividad a las concentraciones ensayadas. Analizando el cambio realizado, se evidencia que el grupo hidroxilo es fundamental para la actividad antimicrobiana de estos compuestos frente a las STEC y que el éster acetato de dichos compuestos provocó la disminución de la actividad ya sea parcial o total. Estos cambios en la estructura de los compuestos nos permitieron realizar un análisis más fino determinando la porción molecular que formaría parte del grupo farmacóforo de la molécula.

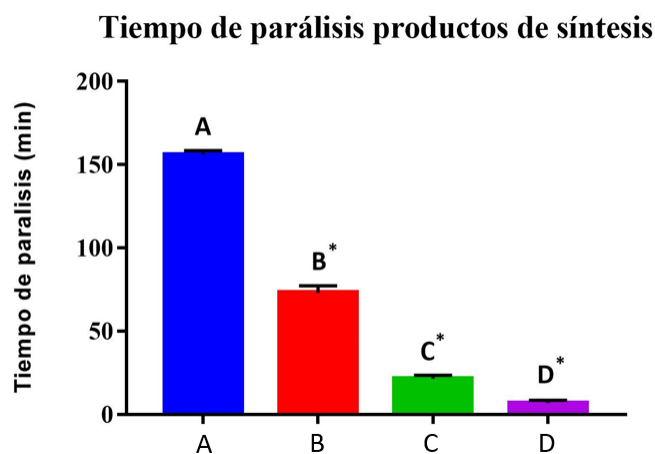
Tabla 4.3. Concentración mínima inhibitoria CMI (µg/mL)

Compuestos	STEC O130	STEC O91	STEC O157
linalol	8037	5208	6250
acetato de linalol	>50000	>50000	>50000
(S)- <i>cis</i> -verbenol	6250	6250	3125
acetato de <i>cis</i> -verbenol	12500	12500	12500
(-)-óxido de cariofileno	>50000	>50000	>50000
diepóxido de cariofileno (Rf de 0.38)	16667	18750	10417
rifamicina	4	2	4

Respecto al derivado semisintético del óxido de cariofileno de relación de frente de 0,38, se observa que la introducción del epóxido en la estructura repercutió favorablemente en la actividad contra las bacterias ya que la CMI del compuesto óxido de cariofileno reportada para las tres cepas fue $>50000 \mu\text{g/mL}$ y con la introducción del segundo epóxido la CMI fue de 10417 a $18750 \mu\text{g/mL}$ para las distintas cepas de STEC, lo que indica que la incorporación del epóxido fue fundamental para la actividad respecto a la estructura base del óxido de cariofileno.

4.5.2 Actividad antihelmíntica de los derivados semisintéticos

Al analizar los resultados de tiempo de parálisis de la **Figura 4.20** se observa que todos los derivados mostraron mejor actividad que el albendazol, y la actividad antihelmíntica en cuanto al tiempo de parálisis presentó el siguiente rango de actividad: diepóxido de cariofileno $>$ acetato de (S)- *cis*-verbenol $>$ acetato de linalol, presentando diferencias significativas entre los compuestos.

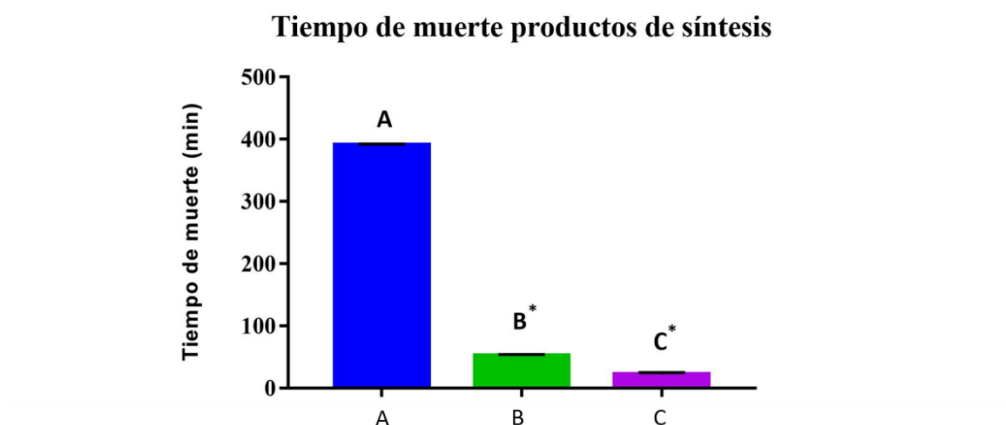


A= Albendazol 1 mg/mL, B= Linalol acetilado 1 mg/mL, C= *Cis*-verbenol acetilado 1mg/mL, D= Diepóxido de cariofileno 1 mg/mL, las letras marcadas con asterisco indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control.

Figura 4.20. Actividad antihelmíntica. Tiempo de parálisis. Los valores fueron expresados en promedio $\pm$ desvío estándar y las diferencias significativas señaladas con una $p < 0,05$ (ANOVA, Tukey).

Respecto al tiempo de muerte se destaca que el acetato de linalol no causó la muerte del helminto, por lo que el grupo hidroxilo de la estructura base resulta

fundamental para producir la muerte en el caso de este compuesto. El diepóxido de cariofileno fue el derivado con mayor actividad como se puede observar en la **Figura 4.21**.



A= Albendazol 1 mg/mL, B= *Cis-verbenol* acetilado 1m/mL, C = Diepóxido de cariofileno 1 r
las letras marcadas con asterisco indican diferencias estadísticamente significativas respec

Figura 4.21. Actividad antihelmíntica. Tiempo de muerte. Los valores fueron expresados en promedio $\pm$ desvío estándar y las diferencias significativas señaladas con una $p < 0,05$ (ANOVA, Tukey).

Tabla 4.4. Promedio de los tiempos de parálisis y muerte de los derivados semisintéticos y los compuestos estructuralmente relacionados

Compuestos	Tiempo de parálisis (minutos)	Tiempo de muerte (minutos)
linalol	12	16
acetato de linalol	73	No causó la muerte
(S)- <i>cis-verbenol</i>	13	21
acetato de <i>cis-verbenol</i>	22	52
(-)-óxido de cariofileno	75	111
diepóxido de cariofileno (Rf de 0,38)	7	22

Analizando derivados semisintéticos y los compuestos estructuralmente relacionados como se muestra en la **Tabla 4.4** se puede observar la diferencia entre los tiempos en cuanto a los compuestos estructuralmente relacionados. Se observa que al

acetilar el grupo hidroxilo tanto en el linalol como en el *cis*-verbenol disminuyen su actividad considerablemente e incluso respecto al tiempo de muerte del acetato de linalol involucró la pérdida total de la actividad de dicho compuesto, lo que resalta la importancia del grupo hidroxilo en la actividad de los compuestos. Y en el caso del diepóxido de cariofileno (Rf de 0,38) la incorporación del epóxido confirió una mejor actividad respecto al (-)-óxido de cariofileno que es su compuesto estructuralmente relacionado.

Aunque se desconoce el mecanismo de acción de estos compuestos sobre el modelo utilizado se considera importante la relación estructural encontrada respecto a la actividad antihelmíntica para posteriores investigaciones que profundicen los mecanismos de acción de estos compuestos frente a los helmintos.

5. CONCLUSIÓN

Entre los diversos compuestos ensayados se destaca la actividad antimicrobiana de los siguientes compuestos frente a las STEC; el (S)-(-)-limoneno en el que se observa una actividad estereoespecífica comparada con su enantiómero y también se destacan los compuestos *cis*-verbenol y linalol, que se caracterizan por el grupo hidroxilo en su estructura.

Los compuestos *cis*-verbenol y linalol, demostraron una actividad destacada como antihelmíntico. La actividad antihelmíntica sobre *Eisenia foetida*, arrojó resultados muy buenos para los compuestos *cis*-verbenol y linalol. Teniendo en cuenta la estructura de dichos compuestos se destaca que la presencia del grupo hidroxilo en la estructura es fundamental para la actividad antihelmíntica de dichas moléculas. Además, mostraron tener mejor actividad que el fármaco de referencia, lo que indica que estos compuestos son ideales para continuar su desarrollo como potenciales fármacos antihelmínticos.

Respecto a los derivados sintéticos obtenidos como el acetato de linalol y el acetato de *cis*-verbenol se observó que al bloquear el grupo hidroxilo se produce la pérdida total o parcial de la actividad antibacteriana, por lo que al realizar el análisis estructura- actividad se establece también la importancia del grupo hidroxilo para esta actividad. Respecto al diepóxido de cariofileno se observó que la incorporación del segundo oxígeno promovió la actividad del compuesto, ya que el óxido de cariofileno no presentó actividad relevante como antibacteriano. Igualmente, en relación con la actividad antihelmíntica, aunque el óxido de cariofileno presenta actividad superior al control positivo, la del diepóxido es aún mejor,

indicando que la presencia de otro átomo de oxígeno mejora la actividad de este tipo de compuestos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (CLSI), C. and L. S. I. (2012a). Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. In M07-A9 (Vol. 32).
- (CLSI), C. and L. S. I. (2012b). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests ; Approved Standard — Eleventh Edition. In M02- A11 (Vol. 32, p. 11).
- Adell, A. D., Rivera, D., Díaz, C., Serrano, M. J., Toledo, V., & Switt, A. I. M. (2018). Research on Major Water and Foodborne Pathogens in South America: Advancements and Gaps. *Current Opinion in Food Science*, 20, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.03.001>
- Aelenei, P., Rimbu, C. M., Guguianu, E., Dimitriu, G., Aprotosoia, A. C., Brebu, M., Miron, A. (2018). Coriander essential oil and linalool - interactions with antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 68(2), 156–164. <https://doi.org/10.1111/lam.13100>
- Agger, M., Scheutz, F., Villumsen, S., Mølbak, K., & Munk Petersen, A. (2015). Antibiotic treatment of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) infection : a systematic review and a proposal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(9), 2440–2446. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv162>
- Aguilar-Caballero, A. J., J.F.J, Torres-Acosta, R., C. S., H, H., & C.A, S.-C. (2008). Inmunidad contra los nematodos gastrointestinales: la historia caprina. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 9, 73–82.
- Aizpurua-Olaizola, O., Soydaner, U., Öztürk, E., Schibano, D., Simsir, Y., Navarro, P., Usobiaga, A. (2016). Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of *Cannabis sativa* Plants from Different Chemotypes. *Journal of Natural Products*, 79(2), 324–331. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00949>
- Al-Sayed, E. (2018). Unearthing the chemical composition of *Taxodium distichum* (L .) Rich . leaf essential oil and its antimicrobial activity. *Industrial Crops &*

- Products, 126(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.009>
- Alencar, B. (2013). In vitro cytotoxic and antiparasitic activity of caryophyllene and eugenol against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania brasiliensis*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(4), 522–528.
- Amézquita-López, B. A., Soto-Beltrán, M., Lee, B., Yambao, J., & Quiñonez, B. (2018). Isolation , genotyping and antimicrobial resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 51(4), 425–434. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.07.004>
- Aprotosoiaie, A. C., Costache, I., Miron, A. (2016). Anethole and Its Role in Chronic Diseases. *Drug Discovery from Mother Nature. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 929, 247–267. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-41342-6>
- Aprotosoiaie, A. C., Hăncianu, M., Costache, I. I., & Miron, A. (2014). Linalool: A review on a key odorant molecule with valuable biological properties. *Flavour and Fragrance Journal*, 29(4), 193–219. <https://doi.org/10.1002/ffj.3197>
- Bakir, B., Him, A., Özbek, H., Düz, E., & Tütüncü, M. (2008). Investigation of the anti-inflammatory and analgesic activities of β -caryophyllene. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, 2(1), 41–44.
- Bano, S., Intisar, A., Rauf, M., Ghaffar, A., Yasmeen, F., Zaman, W.-, ... Muhammad, N. (2019). Comparative analysis of oil composition and antibacterial activity of aerial parts of *Terminalia arjuna* (Roxb .). *Natural Product Research*, 0(0), 1–4. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1557656>
- Biscola, F. T., Abe, C. M., & Guth, B. E. C. (2011). Determination of Adhesin Gene Sequences in, and Biofilm Formation by, O157 and Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Different Sources . *Applied and Environmental Microbiology*, 77(7), 2201–2208. <https://doi.org/10.1128/aem.01920-10>
- Cabrera-Sosa, L., & Ochoa, T. J. (2020). *Escherichia coli* Diarrhea. In *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease* (Tenth Edit, pp. 481–485). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-55512-8.00046-6>

- Cai, R., Hu, M., Zhang, Y., Niu, C., Yue, T., & Yuan, Y. (2019). LWT - Food Science and Technology Antifungal activity and mechanism of citral , limonene and eugenol against *Zygosaccharomyces rouxii*. *LWT - Food Science and Technology*, 106(August 2018), 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.059>
- Camarillo G, Ortega L, Serrato M, R. C. (2009). Actividad biológica de *Tagetes filifolia* (Asteraceae) en *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 35(2), 177–184.
- Castro H, Martinez J, S. E. (2007). Determinación del rendimiento cuántico de la fotoisomerización del trans-anetol. *Scientia et Technica Año XIII*, (33), 45–46.
- Chamorro, L. (2009). Síndrome Urémico-Hemolítico por *E. Coli* Entero-Hemorrágica 0157:H7 Stx2: Primer Caso Descrito en Paraguay. *Pediatr.*, 36(1), 131–137.
- Chang, M., & Shen, Y. (2014). Linalool Exhibits Cytotoxic Effects by Activating Antitumor Immunity. *Molecules*, 19, 6694–6706. <https://doi.org/10.3390/molecules19056694>
- Chavan, M. J., Wakte, P. S., & Shinde, D. B. (2010). Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine*, 17(2), 149–151. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.05.016>
- Cheng, Y., Dong, Z., & Liu, S. (2014). β -caryophyllene ameliorates the Alzheimer-like phenotype in APP/PS1 mice through CB2 receptor activation and the PPAR γ pathway. *Pharmacology*, 94(1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1159/000362689>
- Chinen, I., & Leotta, G. A. (2006). The epidemiology of hemolytic uremic syndrome in Argentina . Diagnosis of the etiologic agent , reservoirs and routes of transmission. *Medicina*, 66(2006).
- Choi, I., Lim, J. I. H., Hwang, S., Lee, J., Cho, G., & Kim, W. (2010). Anti-ischemic and anti-inflammatory activity of (S)-cis-verbenol. *Free Radical Research*, 44, 541–551. <https://doi.org/10.3109/10715761003667562>
- Comisión del Codex Alimentarius. (2015). Anteproyecto de directrices para la aplicación de los principios generales de higiene de los alimentos al control de los parásitos transmitidos por el consumo de alimentos.

- Copes, J., Pellicer, K., Hoyo, G., M, L. C., Estigarribia, M., G, P. O., ... Cardozo, L. (2009). Primer aislamiento de *Escherichia coli* O157: H7 a partir de hamburguesas en Paraguay First Isolation of *Escherichia coli* O157: H7 from hamburgers in Paraguay. *Analecta Veterinaria*, 29(1), 11–14.
- Dias, I. J., Trajano, E. R. I. S., Castro, R. D., Ferreira, G. L. S., Medeiros, H. C. M., & Gomes, D. Q. C. (2018). Antifungal activity of linalool in cases of *Candida* spp . isolated from individuals with oral candidiasis. *Brazilian Journal of Biology*, 78(2), 368–374.
- Díaz-Cedillo, F., Serrato-Cruz, M. A., Cruz-Marcial, J. De, & López-Morales, M. G. S.-A. V. (2013). Compuestos mayoritarios del aceite esencial en órganos de una población de *Tagetes coronopifolia* Willd . *Tagetes coronopifolia* Willd . Population. *Rev. Fitotec. Mex.*, 36(4), 405–411.
- Edris, A. E. (2007). Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. *Research Phytotherapy*, 323(1), 308–323. <https://doi.org/10.1002/ptr>
- Elgendy, E. M., & Mansourah, A. (2014). Corresponding Author: The Potential Biologically Active Epoxide , Hydroperoxide and Endoperoxide Derivatives Drived from Natural Monoterpene â -Myrecene The Potential Biologically Active Epoxide , Hydroperoxide and Endoperoxide Derivatives Drived from Na, (January 2008).
- Elles E, Salcedo M, Muñoz M, M. R. (2010). Validación de la técnica de recuento de coliformes totales y *e. coli* por el método filtración de membrana en el laboratorio de control de calidad de aguas de Cartagena s.a e.s.p. *Ciencia y Salud Virtual*, 2(1), 21–30.
- Ersan, S., & Kocak, S. (2018). Isolated abducens nerve palsy treated by immunoadsorption in a patient with diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome (Vol. 38).
- Falk Filipsson, A., Bard, J., & Karlsson, S. (1998). Limonene. *Concise International Chemical Assessment Document*.
- Fidy, K., Fiedorowicz, A., Strzdała, L., & Szumny, A. (2016). B-Caryophyllene and

- B-Caryophyllene Oxide—Natural Compounds of Anticancer and Analgesic Properties. *Cancer Medicine*, 5(10), 3007–3017. <https://doi.org/10.1002/cam4.816>
- Florentin M, Acuña P, Rojas, N, Rodriguez F, G. R. (2018). Artículo Original / Original Article Portación de fimH en aislados de *Escherichia coli* productor de Toxina Shiga provenientes de ganado bovino , Portability of fimH in isolates of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from cattle , Department of Cordille. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.*, 16(1), 33–38.
- Food and Agriculture Organization of the United, & Organization, W. H. (2018). *Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring*.
- Fujita, K., & Kubo, I. (2004). Potentiation of Fungicidal Activities of trans -Anethole against *Saccharomyces cerevisiae* under Hypoxic Conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98(6), 490–492.
- Gertsch, J., Leonti, M., Raduner, S., Racz, I., Chen, J., Xie, X., ... Zimmer, A. (2008). Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *PNAS*, 105(26), 9099–9104.
- Ghelardini, C., Galeotti, N., Di Cesare Mannelli, L., Mazzanti, G., & Bartolini, A. (2001). Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. *Farmaco*, 56(5–7), 387–389. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(01\)01092-8](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(01)01092-8)
- Griffin, P. M., & Tauxe, R. V. (1991). The Epidemiology of Infections Caused by *Escherichia coli* O157: H7 , Other Enterohemorrhagic *E. coli* , and the Associated Hemolytic Uremic Syndrome. *Epidemiologic Reviews*, 13, 60–91.
- Guzmán-Gutiérrez, S. L., Bonilla-Jaime, H., Gómez-Cansino, R., & Reyes-Chilpa, R. (2015). Linalool and β -pinene exert their antidepressant-like activity through the monoaminergic pathway. *Life Sciences*, 128, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.02.021>
- Hannaoui Rodríguez, E. J., Villalobos, L., & Martínez Nazaret, R. E. (2009). *Escherichia coli* shigatoxigénica: Patogénesis, diagnóstico y tratamiento. *Rev. Soc. Ven. Microbiol*, 29(1).
- Harper, J. K., Arif, A. M., Grant, D. M. (2000). cis-Verbenol. *Acta Cryst.*, (I), 451–

452.

- Holsten, E. H., Burnside, R. E., & Seybold, S. J. (2000). Attractant Semiochemicals of the Engraver Beetle , *Ips perturbatus* , in South-Central and Interior Alaska. *United States Department of Agriculture*, (December).
- Huber, C., Orrego, M. V., Ortiz, F., Álvarez, M., & Weiler, N. (2019). Prevalence of pathogens causing acute diarrheal disease in the Asunción and Central Metropolitan area. *Rev. Salud Pública Parag*, 9(2), 41–45.
- Jourdan, P. M., Lamberton, P. H. L., Fenwick, A., & Addiss, D. G. (2018). Soil-transmitted helminth infections. *The Lancet*. Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31930-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31930-X)
- Kalemba, D., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(1), 813–829. <https://doi.org/10.2174/0929867033457719>
- Lee, G. W., Chung, M. S., Kang, M., Chung, B. Y., & Lee, S. (2016). Direct suppression of a rice bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) by monoterpene (S)-limonene. *Protoplasma*, 253(3), 683–690. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0904-4>
- Liu, X., Cai, J., Chen, H., Zhong, Q., Hou, Y., & Chen, W. (2020). Antibacterial activity and mechanism of linalool against *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis*, 103980. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.103980>
- Moraes, L. A. S., Facanali, R., & Marques, M. O. M. (2002). Phytochemical characterization of essential oil from *Ocimum selloi*. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 74(1), 183–186.
- Nassar, F. J., Rahal, E. A., Sabra, A., & Matar, G. M. (2013). Effects of Subinhibitory Concentrations of Antimicrobial Agents on *Escherichia coli* O157 : H7 Shiga Toxin Release and Role of the SOS Response. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(9), 805–812. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1510>
- Ngamprasertsith, S., Menwa, J., & Sawangkeaw, R. (2018). Caryophyllene oxide extraction from lemon basil (*Ocimum citriodorum* Vis.) straw by hydrodistillation and supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, 138, 1–

6. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.03.024>

Novato, T., Gomes, G. A., Zeringóta, V., Franco, C. T., de Oliveira, D. R., Melo, D., ... de Oliveira Monteiro, C. M. (2018). In vitro assessment of the acaricidal activity of carvacrol, thymol, eugenol and their acetylated derivatives on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 260, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.07.009>

Oficina Económica y Comercial de España en Asuncion. (2019). Informe económico y comercial.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2014). Identifican los diez principales parásitos transmitidos por los alimentos.

Organización Mundial de la Salud. (2013). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023*. Retrieved from <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>

Organización Mundial de la Salud. (2020). Helminthiasis transmitidas por el suelo.

Paula-Freire, L. I. G., Andersen, M. L., Gama, V. S., Molska, G. R., & Carlini, E. L. A. (2014). The oral administration of trans-caryophyllene attenuates acute and chronic pain in mice. *Phytomedicine*, 21(3), 356–362. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.08.006>

Pawar, S. D., Patil, Y. B., Premchandani, L. A., Borse, S. L., Borse, L. B., & Pawar, S. P. (2014). Study of Anthelmintic Activity of Chloroform Extract of *Tinospora cordifolia*. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(6), 2253–2268.

Peana, A. T., & Serra, G. (2003). Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine*, 9(2002), 721–726. <https://doi.org/10.1078/094471102321621322>

Pérez C, Torres C, N. M. (2018). Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Essential Oils from Verbenaceae Species Growing in. *Molecules*, 23(3), 544. <https://doi.org/10.3390/molecules23030544>

Rahman, A., Al-reza, S. M., Sattar, M. A., & Kang, S. C. (2011). Potential Roles of

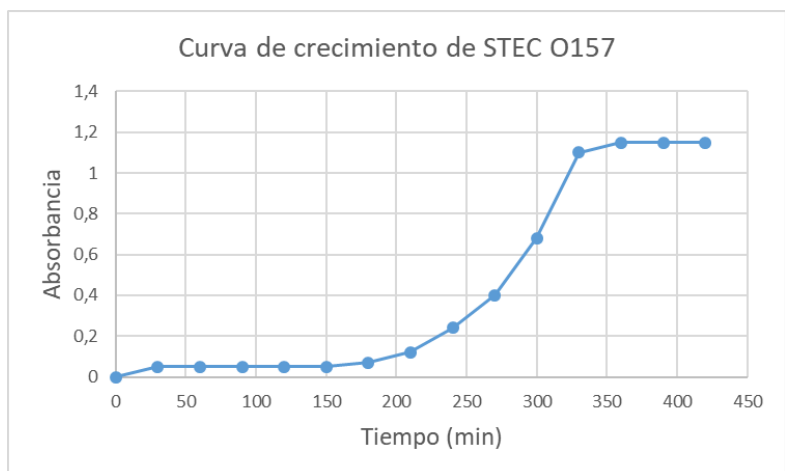
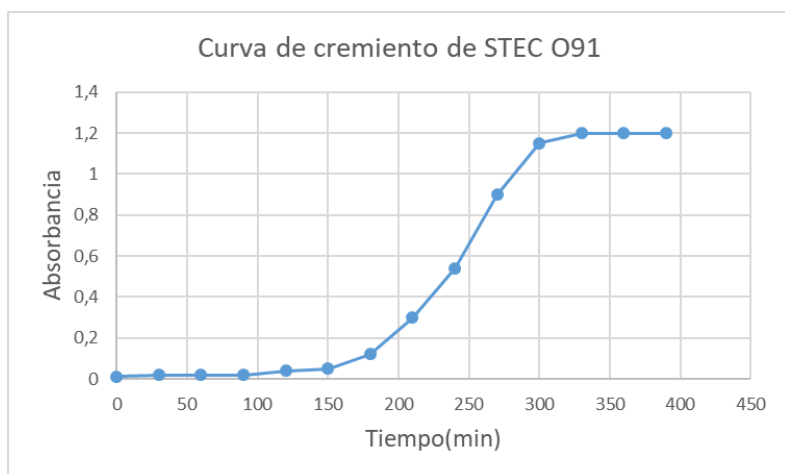
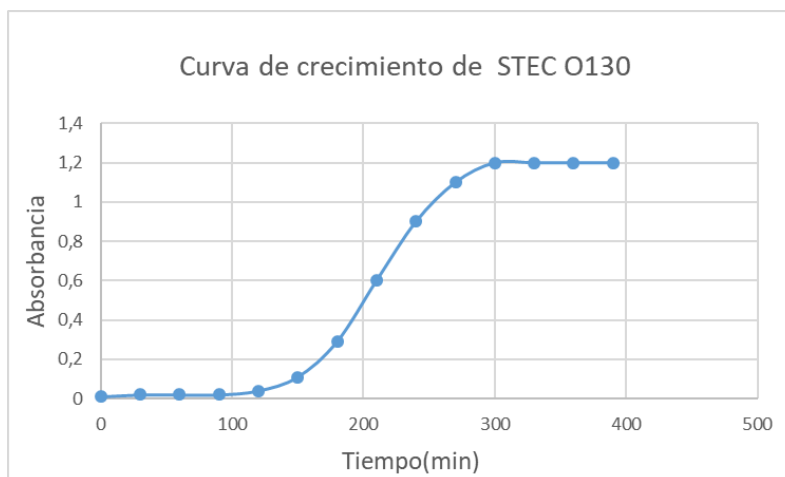
- Essential Oil and Extracts of Piper chaba Hunter to Inhibit *Listeria monocytogenes*. *Rec.Nat.Prod.*, 5(3), 228–237.
- Riveros, M., & Ochoa, T. J. (2015). Enteropatógenos de importancia en Salud Pública. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 32(1), 157–164.
- Ryu, S., Hee, G., & Hyeon, S. (2014). Trans -anethole protects cortical neuronal cells against oxygen – glucose deprivation / reoxygenation. *Neurol Sci*, 35, 1541–1547. <https://doi.org/10.1007/s10072-014-1791-8>
- Sabulal, B., Dan, M., J, A. J., Kurup, R., Pradeep, N. S., Valsamma, R. K., & George, V. (2006). Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. *Phytochemistry*, 67(22), 2469–2473. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.003>
- Sarker, S. D., Nahar, L., & Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth , and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42, 321–324. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.01.006>
- Seol, G., Kang, P., Lee, H. S., & Seol, G. H. (2016). Antioxidant activity of linalool in patients with carpal tunnel syndrome. *BMC Neurology*, 16(17), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s12883-016-0541-3>
- Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal. (2019). Estadística Pecuaria de Exportación.
- Servicio Nacional de Sanidad Agraria. (2017). Manual de prevención y Control de Enfermedades parasitarias.
- Simakova, I. L., & Semikolenov, V. A. (2003). The Catalytic Method of Verbanol Preparation with Controlled Isomer Distribution Starting from Renewable Material α -Pinene. *Chemistry for Sustainable Development*, 11, 271–275.
- Singh, P., Shukla, R., Prakash, B., Kumar, A., Singh, S., Kumar, P., & Kishore, N. (2010). Chemical profile , antifungal , antiaflatoxicogenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm . and *Citrus sinensis* (L .) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene , DL -limonene. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1734–1740. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.04.001>

- Singh, U. P., Bhat, H. R., & Gahtori, P. (2012). Antifungal activity , SAR and physicochemical correlation of some thiazole-1 , 3 , 5-triazine derivatives. *Journal de Mycologie Medicale*, 22(2), 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2011.12.073>
- Smith, J. L., & Fratamico, P. M. (2017). *Escherichia coli* as a Pathogen. In *Foodborne Diseases* (Third Edit, pp. 189–208). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00007-3>
- Souza, V., Castillo, A., Rocha, M., Sandner, L., Silva, C., & Eguiarte, L. (2001). Ecología Evolutiva de *Escherichia coli*. *Interciencia*, 26(10), 513–517.
- Taylor, P., Asili, J., Emami, S. A., Eynolghozat, R., & Noghab, Z. S. (2015). Chemical Composition and In Vitro Efficacy of Essential Oil of Seven *Artemisia* Species Against ESBL Producing Multidrug-Resistant *Escherichia coli*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(1), 124–145. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.895181>
- Vidal R, Chamorro N, and G. J. (2016). Enterotoxigenic *Escherichia coli*. In *Escherichia coli in the Americas* (p. 2). <https://doi.org/10.1007 / 978-3-319-45092-6>
- Villamizar, L. H., Cardoso, G., Andrade, J. De, Teixeira, M. L., & Soares, M. J. (2017). Linalool , a Piper aduncum essential oil component , has selective activity against *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms at 4 ° C. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 112(2), 131–139. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160361>
- Vuuren, S. F. Van, & Viljoen, A. M. (2007). Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1 , 8-cineole alone and in combination. *Flavour and Fragrance Journal*, 22, 540–544. <https://doi.org/10.1002/ffj>
- Weiler, N., Orrego, M., Alvarez, M., & Huber, C. (2017). Detección molecular de *Escherichia coli* diarreogénica en pacientes pediátricos con síndrome diarreico agudo en Paraguay. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.*, 15(1), 16–21. [https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2017.015\(01\)16-021](https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2017.015(01)16-021)
- World Health Organization. (2017). Diarrhoeal Disease. Retrieved from <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>

- World Health Organization. (2018). The Top 10 Causes of Death. Retrieved from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- World Health Organization. (2019). Food Safety. Retrieved from <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- Xing, C., Qin, C., Li, X., Zhang, F., Linhardt, R. J., Sun, P., & Zhang, A. (2019). Chemical composition and biological activities of essential oil isolated by HS-SPME and UAHD from fruits of bergamot. *LWT - Food Science and Technology*, 104(1), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.020>
- Yaluff, G., Vega, C., & Alvarenga, N. (2017). In Vitro Antiprotozoal Activity of (S)-cis-Verbenol against *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 168(1), 41–44. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.12.013>
- Yang, D., Michel, L., Chaumont, J. P., & Millet-Clerc, J. (2000). Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an in vitro experimental model of onychomycosis. *Mycopathologia*, 148(2), 79–82. <https://doi.org/10.1023/A:1007178924408>

ANEXOS

Anexo 1. Curva de crecimiento de los serogrupos de STEC O130, O91 y O157.



Anexo 2. Verificación del inóculo de las unidades formadoras de colonias (UFC).

	STEC O130	STEC O91	STEC O157
Ensayo 1	50	45	48
	46	49	49
	45	45	45
Ensayo 2	49	46	54
	49	52	50
	56	51	50
Ensayo 3	47	54	46
	46	52	45
	51	45	48

Anexo 3. Caracterización de las cepas de STEC.

Aislado	Serogrupo	Factores de virulencia
O157	O157	<i>stx2, eae</i>
208,10	O130	<i>stx1, stx2, csgA, flu33</i>
224,2	O91	<i>stx1, stx2, csgA, flu433, iha</i>