



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**  
*Facultad de Ciencias Experimentales*

Trabajo Fin de Grado

# **SÍNTESIS DE DERIVADOS DE CARVACROL Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

**Alumna: Raquel García Barranco**

**Jaén, Junio, 2023**

## **Trabajo Fin de Grado**

Síntesis de derivados de carvacrol y evaluación de su actividad antimicrobiana



**Fdo. Raquel García Barranco**

**Alumna: Raquel García Barranco**

**Jaén, Junio, 2023**

## Índice

<b>1.RESUMEN Y ABSTRACT</b>	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	2
2.1. Antecedentes	2
2.2. Descripción del carvacrol	5
2.3. Derivados de carvacrol previamente descritos	6
2.4. Empleo del carvacrol como antimicrobiano en la industria alimentaria	9
<b>3.OBJETIVOS</b>	11
<b>4.MATERIALES Y MÉTODOS</b>	12
4.1. Materiales y reactivos	12
4.2. Técnicas e instrumentación	12
4.2.1 <i>Cromatografía de gases (CG)</i>	12
4.2.2 <i>Cromatografía en capa fina analítica (CCF)</i>	12
4.2.3 <i>Cromatografía en columna flash (CC)</i>	13
4.2.4 <i>Técnicas de caracterización estructural</i>	13
4.3. Síntesis de los derivados de carvacrol	14
4.4 Optimización de la reacción de obtención del derivado <b>4</b>	15
4.5. Caracterización de carvacrol ( <b>1</b> ) y sus derivados ( <b>2-4</b> )	16
4.6. Evaluación de la actividad antimicrobiana	20
<b>5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	25
5.1. Acilación de carvacrol con cloruro de butanoilo en presencia de ácido tríflico	25
5.2. Actividad antimicrobiana de los derivados obtenidos	33
<b>6.CONCLUSIONES</b>	37
<b>7.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	38
<b>8.ANEXOS</b>	44

## 1. RESUMEN Y ABSTRACT

En el presente Trabajo Fin de Grado (TFG) se han obtenido tres derivados acilados del conocido antimicrobiano natural carvacrol (**1**), por medio de la reacción de acilación de Friedel-Crafts de fenoles, usando un superácido (ácido trifílico) y cloruro de butanoílo como agente acilante, a los cuales se les han evaluado sus actividades antimicrobiana y anti-biopelícula, con el objetivo de estimar su potencialidad en la industria alimentaria. La purificación de estos derivados se ha llevado a cabo por cromatografía en columna preparativa, y su caracterización estructural por resonancia magnética nuclear, tratándose de un O-butanoil-carvacrol (**2**), un C-butanoil-carvacrol (**3**) y un di-butanoil-carvacrol (**4**). Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos **1-4** muestran que el derivado **3** posee mayor actividad sobre bacterias de origen alimentario que el resto de compuestos, incluida la molécula de partida (**1**). Estos resultados permiten deducir algunas relaciones estructura-actividad que pueden fomentar el diseño de nuevas estrategias de conservación de alimentos utilizando derivados fenólicos de este tipo como biocidas o conservantes en la industria alimentaria, una vez descartados sus posibles efectos citotóxicos.

*In this Final Degree Project (TFG) three acylated derivatives of the well-known natural antimicrobial carvacrol (**1**) have been obtained by means of the Friedel-Crafts acylation reaction of phenols, using a superacid (triflic acid) and butanoyl chloride as an acylating agent, whose antimicrobial and anti-biofilm activities have been evaluated, with the aim of estimating its potential in the food industry. The purification of these derivatives has been carried out by preparative column chromatography, and their structural characterization by nuclear magnetic resonance, being an O-butanoyl-carvacrol (**2**), a C-butanoyl-carvacrol (**3**) and a di-butanoyl-carvacrol (**4**). The results obtained in the evaluation of the antimicrobial activity of compounds **1-4** show that derivative **3** has higher activity against foodborne bacteria than the rest of the compounds, including the starting molecule (**1**). These results allow us to deduce some structure-activity relationships that may promote new food preservation*

strategies using these phenolic derivatives as biocides or preservatives in the food industry, once their possible cytotoxic effects have been discarded.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Antecedentes

Este Trabajo de Fin de Grado (TFG), surge de la colaboración entre el grupo de investigación “Microbiología de los Alimentos y del Medio Ambiente” (AGR 230) y el grupo de investigación “Compuestos de Interés Biológico” (FQM-182). Estos grupos de investigación han llevado a cabo proyectos en común, centrados en la síntesis y evaluación de la actividad biológica de diversos compuestos (Alejo *et al.* 2017; 2018), (Ortega-Vidal *et al.* 2021; 2022). El objetivo es sintetizar derivados (Figura 2.2 y Figura 2.3) de carvacrol (Figura 2.1) en el laboratorio de Química de Productos Naturales (Área de Química Orgánica) y evaluar posteriormente su actividad antimicrobiana, para una posible aplicación en la industria alimentaria, en el Área de Microbiología. Se trata, por lo tanto, de un TFG interdisciplinar.

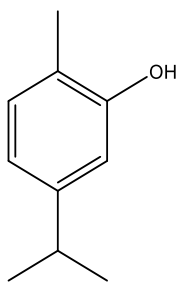


Figura 2.1 Estructura química del carvacrol

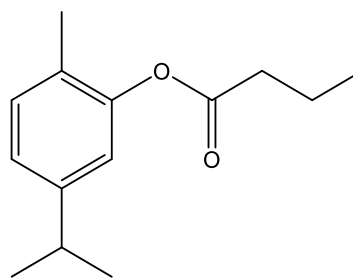


Figura 2.2 Estructura del derivado O-acilado

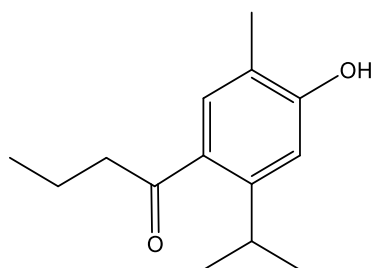


Figura 2.3 Estructura del derivado C-acilado

La Química de Productos Naturales (QPN) tiene como objetivo el aislamiento, determinación estructural y síntesis de aquellos compuestos orgánicos de interés procedentes de una fuente natural, evaluando posteriormente su actividad biológica

en búsqueda de potenciales aplicaciones en sectores diversos como el alimentario, farmacéutico o cosmético.

Los metabolitos secundarios no son comunes a todos los seres vivos y no se les considera esenciales para la vida del organismo en que se encuentra. Son químicamente muy diversos y se les clasifica por familias: terpenoides, esteroides, alcaloides, lignanos, flavonoides, taninos, etc. Los terpenoides tienen su origen biogénico en la ruta metabólica del mevalonato y los que contienen diez átomos de carbono (monoterpenoides) son parte principal del aceite esencial que producen las plantas aromáticas, aportando las características organolépticas de las mismas (Gil, 2002). Se han aislado alrededor de 12.000 compuestos en aceites esenciales procedentes de organismos vegetales y se estima que constituyen tan sólo el 10% de los metabolitos secundarios existentes en la naturaleza. Las propiedades de los terpenoides contenidos en los aceites esenciales y los aceites esenciales en sí mismos han sido intensamente estudiadas debido a su amplio uso en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética (Zielinska *et al.*, 2021).

Los aceites esenciales (AE) son mezclas complejas de componentes que normalmente se obtienen mediante destilación por arrastre de vapor de agua de las plantas aromáticas y se localizan en diferentes partes de las plantas, como corteza, flores, frutos, hojas, cáscaras, raíces, semillas, ramitas o toda la planta en su conjunto. Además, son ampliamente utilizados en odontología y la industria cosmética debido a sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes (Masyita *et al.*, 2022).

Un ejemplo relevante de aplicación en la sociedad de la Química de Productos Naturales podría ser el de la lactona sesquiterpénica artemisinina, cuya fuente natural de obtención es la planta *Artemisia annua* L. Su aplicación guarda relación con el tratamiento de la malaria y fue origen del Premio Nobel de Fisiología o Medicina de 2015, otorgado a William C. Campbell, Satoshi Ōmura y Youyou Tu, por sus contribuciones en el desarrollo de terapias contra infecciones parasitarias. De esta forma podemos observar cómo la Química de Productos Naturales, en combinación con el estudio de la actividad biológica, puede generar un beneficio a la comunidad.

En el ámbito microbiológico, la Organización Mundial de la Salud (OMS) vela por el uso de medicamentos naturales, que sean seguros y eficaces para los pacientes.

Además, el uso inadecuado de antibióticos constituye la principal causa de aparición y propagación de bacterias multirresistentes para el ser humano y los animales, provocando un aumento de la mortalidad (Gallegos Flores *et al.*, 2019). Además, la tasa de desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos para aplicaciones clínicas ha disminuido drásticamente durante las últimas décadas según un estudio realizado recientemente (Mehdi *et al.*, 2018). En consecuencia, se propone el uso de alternativas procedentes de productos de origen natural, ya que algunos vegetales, por ejemplo, poseen propiedades farmacológicas de interés en base a su actividad antimicrobiana.

La Microbiología de los alimentos es la ciencia que estudia los microorganismos en su relación con los alimentos. Esta relación puede ser negativa, produciendo alteraciones en los alimentos o toxiinfecciones alimentarias a los consumidores; o positiva, desarrollando reacciones bioquímicas deseables como las fermentaciones para obtener yogur, vino o cerveza (Mathur *et al.*, 2020). Desde hace varias décadas, la legislación alimentaria incluye los piensos como objetivo primordial para el mantenimiento de la seguridad microbiológica a lo largo de toda la cadena alimentaria y en los últimos años se ha producido un aumento sustancial en el uso de hierbas aromáticas y aceites esenciales como aditivos para piensos en la nutrición animal. Una de las principales razones de esta tendencia es la sustitución de los antibióticos promotores del crecimiento, que han sido completamente prohibidos como aditivos para piensos en la Unión Europea desde 2006, porque se sospecha que contribuyen sustancialmente al aumento de la resistencia a antimicrobianos entre los patógenos humanos. Investigaciones recientes han demostrado efectos antimicrobianos significativos de varios aceites esenciales y compuestos de aceites esenciales contra organismos enteropatógenos en animales de granja (Franz *et al.*, 2009).

Dado que el carvacrol se usa en bajas concentraciones como ingrediente saborizante y conservante de alimentos, así como también como ingrediente de fragancia en formulaciones cosméticas (De Vincenzi *et al.*, 2004), hemos realizado una búsqueda en la base de datos *SciFinder*<sup>n</sup>, buscando solo "Carvacrol" en "All", encontrando 12.748 artículos científicos donde en 1.683 ocasiones se ha realizado alguna mención a la actividad antimicrobiana del carvacrol, siendo 44 en artículos de revisión. De esos 44, tan solo en 7 se estudia la actividad antimicrobiana con posible

aplicación en la industria alimentaria, siendo por tanto el objetivo establecido en este TFG una contribución de interés al estado actual de la ciencia en este ámbito. Por esta razón, se ha considerado el estudio del carvacrol (Figura 2.1) una molécula orgánica de fácil obtención y baja toxicidad. Además, existe un amplio espectro de fuentes naturales donde podemos encontrar esta molécula como, por ejemplo, el tomillo. También se puede obtener del orégano y del té de montaña, y además está disponible comercialmente. Los aceites esenciales son una poderosa fuente de moléculas antioxidantes (De Vincenzi *et al.*, 2004).

## 2.2. Descripción del carvacrol

Como podemos observar (Figura 2.1) en la estructura química del carvacrol nos encontramos un grupo hidroxilo (OH) unido a un anillo aromático, comúnmente denominado fenol, pudiendo considerar esta molécula como un monoterpenoide de naturaleza fenólica. El carvacrol consta de un grupo metilo y un isopropilo, encontrándose ambos en posición *para*. El grupo hidroxilo podría ser el responsable de la actividad biológica, según estudios previos (Domingo y López-Brea, 2003), porque los fenoles simples presentan una importante actividad biológica. Por otro lado, la posición y el número de grupos hidroxilo en los compuestos fenólicos parecen estar relacionados directamente con su toxicidad sobre los microorganismos. Asimismo, el mecanismo parece estar relacionado con la inhibición enzimática de los compuestos oxidados. Existen distintas teorías, podrían ser compuestos con distintas funciones que realmente tengan el poder antimicrobiano o que suceda accidentalmente.

Paracelso fue alquimista, médico y astrólogo, cuya frase célebre “contra cada padecimiento crece una planta”, pronunciada en el siglo XVI, representa cierta analogía con el tema principal de este TFG (Domingo y López-Brea, 2003). La molécula de carvacrol puede obtenerse sintéticamente o a partir de diferentes fuentes naturales, como el tomillo oficial o el orégano. El tomillo es una planta aromática perteneciente a la familia de las Lamiáceas, utilizada como condimento en el norte de África y el Mediterráneo. Esta hierba posee propiedades medicinales para combatir gases, dolores de estómago o cólicos (Salehi *et al.* 2018). A lo largo de los siglos, ha sido utilizada por los egipcios para embalsamar hasta formar parte de los baños griegos, El aceite salado obtenido mediante una destilación de arrastre de



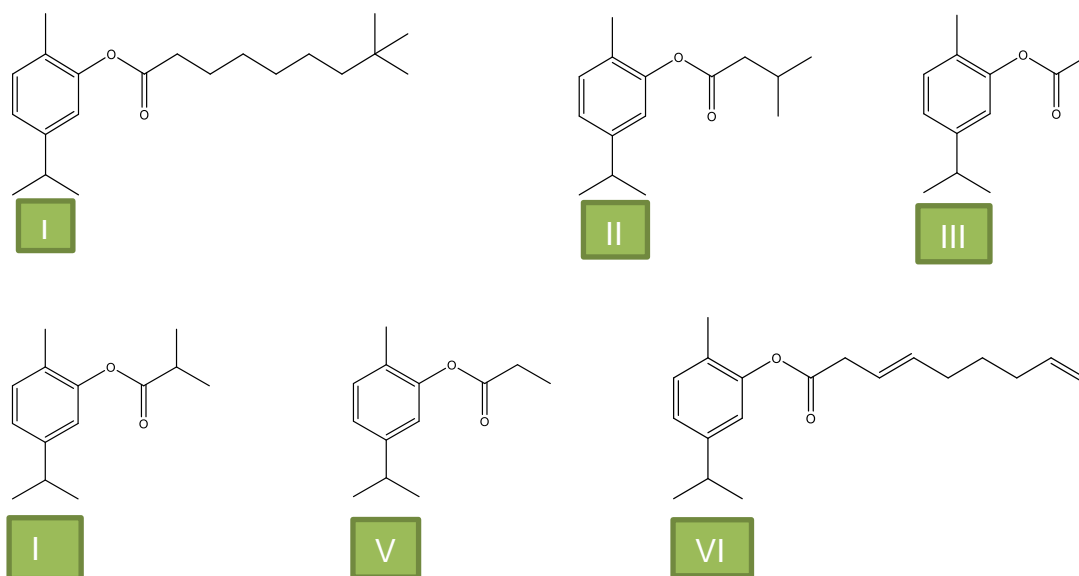
vapor de la hierba *Satureja hortensis* es también una fuente de obtención abundante de carvacrol. Este aceite tiene diversas aplicaciones en alimentación como, por ejemplo, en la elaboración de sopas (Surburg y Panten, 1985).

La molécula de carvacrol, también denominada 2-metil-5-(1-etilmetil)fenol, con fórmula molecular ( $C_{10}H_{14}O$ ; mol. wt. 150.21) según De Vincenzi *et al.* (2004), muestra una débil actividad en los estudios de mutagenicidad. Además, en el metabolismo, el carvacrol ha demostrado que se excreta con la orina después de 24 h en grandes cantidades. Destaca también su utilidad en enjuagues bucales (Harborne *et al.*, 1999).

### 2.3. Derivados de carvacrol previamente descritos

Basándonos en la búsqueda realizada en la base de datos *SciFinder*<sup>n</sup>, existen 572 reacciones donde interviene el carvacrol como producto de partida. Por tanto, a partir de la bibliografía se van a seleccionar aquellos derivados de interés con una estructura química similar a los que son objeto de este TFG.

Los derivados O-acilados más similares al que queremos obtener, que constan de un grupo funcional éster, se recogen en la Figura 2.4.



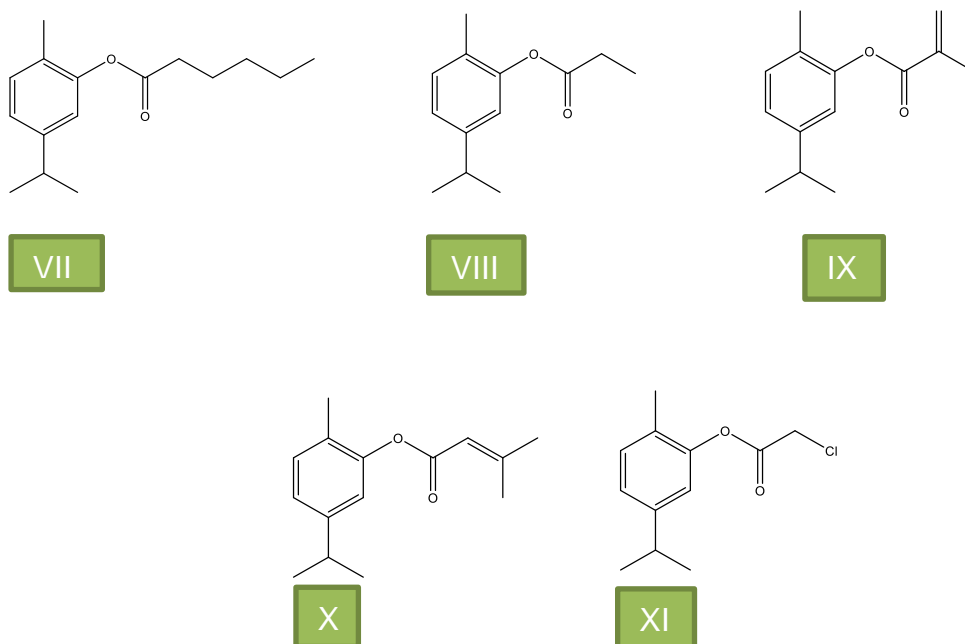


Figura 2.4 Estructura de los derivados O-acilados de carvacrol similares al que se quiere obtener en este TFG.

En la Figura 2.4 se recogen las estructuras de los derivados O-acilados que han sido previamente descritas y tienen relación con uno de nuestros productos de reacción, el O-acilado. De entre ellas, se puede indicar que la molécula **IX** es sintética, siendo un éster del ácido piválico y el carvacrol. No se han realizado muchos estudios específicos sobre sus propiedades antimicrobianas, pero se sabe que los ésteres del ácido piválico tienen cierta actividad antimicrobiana contra algunas especies de bacterias y hongos. En un estudio publicado por Goudarzi *et al.* (2013) en la revista *Journal of Medical Microbiology* se evaluó la actividad antimicrobiana de varios ésteres del ácido piválico, incluyendo la molécula **IX**, contra una variedad de cepas bacterianas. Se encontró que estos compuestos mostraban actividad contra algunas cepas de bacterias, incluyendo *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Hay algunos estudios que han evaluado la actividad antimicrobiana y antibiopelícula de la molécula **VII**. Por ejemplo, en un estudio publicado por Zhang *et al.* (2021) en la revista *BMC Microbiology* se evaluó la actividad antimicrobiana y anti-biofilm contra algunas cepas de bacterias, incluyendo *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Los resultados mostraron que este compuesto tenía una actividad antimicrobiana moderada contra ambas cepas bacterianas, y también fue efectivo en inhibir la

formación de biofilms, también denominados biopelículas. Estos estudios sugieren que la molécula **VII** podría tener potencial como agente antimicrobiano y anti-biofilm, pero se necesitan más investigaciones para confirmar su eficacia y seguridad.

Estableciendo una comparativa entre la molécula **VII** y **IX** se observa que la cepa *Staphylococcus aureus* muestra una actividad antimicrobiana en ambas moléculas donde se observan estructuras químicas semejantes. De acuerdo a la bibliografía se puede establecer una hipótesis previa, que se confirmará en este TFG donde la estructura guarda una relación directa con la actividad antimicrobiana y actividad anti-biofilm con una posible aplicación futura en la industria alimentaria.

El derivado C-acilado más similar al que se quiere obtener en este TFG se recoge en la Figura 2.5.

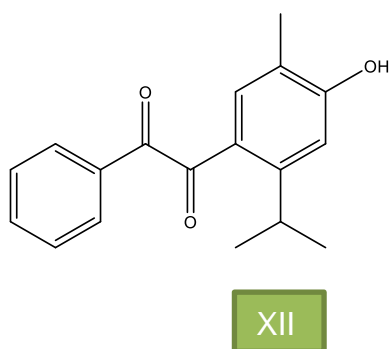


Figura 2.5 Estructura química del derivado C-acilado de carvacrol similar al que se quiere obtener en este TFG.

Se observa en la Figura 2.5 que existe un derivado C-acilado con estructura similar al derivado C-acilado objeto de este TFG. La molécula **XII** es un análogo sintético de la curcumina, un compuesto natural que se encuentra en la cúrcuma. Este compuesto se ha desarrollado con el objetivo de mejorar la biodisponibilidad y las propiedades farmacológicas de la curcumina. Hay varios estudios que han investigado las propiedades biológicas y farmacológicas de este compuesto, incluyendo su actividad antiinflamatoria, antioxidante y anticancerígena. Por ejemplo, un estudio publicado por Chengguang *et al.* (2015) informó que análogos de este compuesto tenían una potente actividad antiinflamatoria al inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias en células de ratón. Otro estudio publicado por Wu *et al.* (2019) dieron a conocer que este compuesto tenía efectos antiproliferativos en

células de cáncer de pulmón humano al inducir la apoptosis y suprimir la expresión de genes asociados con la proliferación celular.

En general, estos estudios sugieren que el compuesto **XII** tiene un potencial terapéutico prometedor y puede ser un candidato interesante para el desarrollo de nuevos fármacos. Sin embargo, también ha mostrado tener actividad antimicrobiana. Un estudio publicado por Lee *et al.* (2012) evaluó la actividad antimicrobiana de este compuesto contra una variedad de bacterias y hongos, y encontró que tenía una actividad moderada contra ciertas cepas de bacterias Gram-positivas, incluyendo *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.

#### 2.4. Empleo del carvacrol como antimicrobiano en la industria alimentaria

El carvacrol se ha descrito como el responsable de la actividad biológica del orégano y se han estudiado también otras actividades de esta molécula como antimicrobiano, antitumoral, antimutagénico, antigenotóxico, analgésico, antiespasmódico, antiinflamatorio, angiogénico, antiparasitario, antiplaquetario, inhibidor de acetilcolinesterasa (AChE), antielastasa o insecticida, así como por sus actividades antihepatotóxicas y hepatoprotectoras y su empleo como aditivo alimentario (Baser, 2008).

Numerosos estudios recientes también ponen de manifiesto la posible utilidad del carvacrol en diversos ámbitos:

La varroosis (Figura 2.5) es una parasitosis externa provocada por el ácaro *Varroa destructor* que debilita el estado inmunológico de las abejas y favorece la aparición de infecciones víricas, bacterianas y fúngicas que provocan una importante pérdida de población y de producción, incluso con bajos niveles de infestación. En Galicia está provocando elevados porcentajes de mortalidad de abejas.

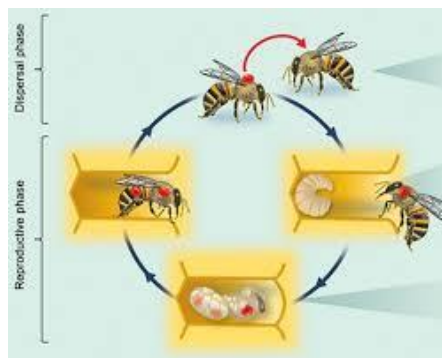


Figura 2.5 Ciclo de vida simplificado del ácaro *Varroa destructor*

Durante 2019 y 2020 se han realizado estudios a nivel nacional donde se muestra la necesidad de nuevos tratamientos.



Figura 2.6 Mortalidad invernal de las abejas en España

Como podemos observar en la Figura 2.6, en la mayor parte de la península ibérica existe un elevado porcentaje de mortalidad debido a la Varroosis. El **Proyecto Varroaform** ha implicado a Universidades, investigadores y apicultores, buscando una formulación eficaz para el control y prevención de la varroosis en abeja doméstica, con el objetivo principal de conseguir una reducción de las pérdidas económicas que sufren en la actualidad los apicultores debido a la parasitación de las colmenas por este ácaro, beneficiando al mismo tiempo a otros sectores como la producción agrícola o la silvicultura, tan dependientes de la polinización. Parte de las soluciones propuestas en este proyecto se basan en el empleo de carvacrol en forma de liberación lenta, controlada y sostenida a lo largo del tiempo.

Estudios previos también han puesto de manifiesto la posible utilidad del carvacrol en el ámbito alimentario frente a diversos patógenos (*Escherichia coli*, *Salmonellatyphimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*), en una masa de harina de maíz (Ortega *et al.*, 2010) o bien como potenciador de la actividad antimicrobiana de otros compuestos de origen microbiano como la enterocina AS-48, en salsas vegetales frente a estafilococos (Grande *et al.*, 2007b) y en sopas y purés vegetales listos para el consumo frente a diversos bacilos (Grande *et al.*, 2007a).

En el ámbito de la industria alimentaria surge otro problema añadido, como consecuencia de la proliferación de microorganismos en forma de biopelículas en las instalaciones alimentarias. En la naturaleza, podemos encontrar las bacterias bajo dos formas o estados: bacterias planctónicas, de libre flotación y bacterias en forma

de biofilm o biopelícula. Las biopelículas se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo. El crecimiento en biopelículas representa la forma habitual de desarrollo de las bacterias en la naturaleza. Las biopelículas bacterianas representan una antigua estrategia de supervivencia procariótica, dado que las bacterias logran ventajas significativas al proporcionarles las biopelículas protección frente a fluctuaciones medioambientales de humedad, temperatura y pH, al igual que concentrando nutrientes y facilitando la eliminación de desechos (Nazar, 2007).

Pues bien, el carvacrol también ha mostrado unas excelentes actividades antimicrobianas e inhibidoras de la formación de biopelículas frente a hongos y a un amplio rango de bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas. Su combinación con nanomateriales puede proporcionar además grandes oportunidades para prevenir la aparición de contaminaciones asociadas a las biopelículas microbianas (Marchese *et al.*, 2018).

Todos estos estudios corroboran el creciente interés en el estudio de la actividad antimicrobiana del carvacrol y sus derivados, debido a su bajo coste, fácil obtención y propiedades de interés en la resolución de algunos problemas que la sociedad actualmente presenta.

### **3. OBJETIVOS**

El objetivo químico de este Trabajo Fin de Grado (TFG) consiste en la obtención de los derivados O-acilado (Figura 2.2) y C-acilado (Figura 2.3) del carvacrol, por medio de la reacción de acilación de Friedel-Crafts de fenoles usando un superácido (ácido tríflico) en lugar del clásico catalizador de cloruro de aluminio anhidro. Este estudio se complementará con la evaluación de la actividad antimicrobiana tanto de carvacrol como de los derivados obtenidos, con el objetivo de estimar su posible aplicación en la industria alimentaria de forma aislada o bien en combinación, en caso de detectar efectos sinérgicos entre los compuestos objeto de estudio. La finalidad del TFG es obtener unos primeros derivados de carvacrol de lipofilia distinta a la del producto de partida, con grupo OH libre o protegido, para confirmar o rebatir la hipótesis recogida en la literatura de que es el grupo OH del carvacrol el que le confiere sus propiedades antimicrobianas.

El trabajo está entroncado con los objetivos de desarrollo sostenible (ODS), con la meta 3.3, para combatir las enfermedades transmisibles, la meta 12.3, para reducir el desperdicio de alimentos y la meta 9.5, que pretende aumentar la investigación científica y mejorar la capacidad tecnológica de los sectores industriales de todos los países, fomentando la innovación.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Materiales y reactivos**

Durante la síntesis y purificación de los derivados de carvacrol se utilizaron los siguientes disolventes y reactivos: hexano (Panreac), éter dietílico (Panreac), ácido tríflico (Sigma-Aldrich), cloruro de butanoilo (Merck), bicarbonato de sodio (Panreac), sulfato de sodio anhidro (Panreac), carvacrol (Merck).

### **4.2. Técnicas e instrumentación**

#### *4.2.1 Cromatografía de gases (CG)*

Los análisis de CG del carvacrol y de los productos sintetizados se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases AGILENT 7820A equipado con una columna capilar (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m) con fase estacionaria de Polisiloxano (fenilmetilsilicona). Los detalles del método seguido son: El gas portador fue helio, con un caudal de 1 mL/min. Las temperaturas del inyector y el detector fueron de 300 °C. El tipo de detector es de ionización de llama (FID). Las temperaturas del horno inicial fueron de 60 °C. La temperatura intermedia fue de 100 °C. La primera rampa fue de 5 °C/min y la segunda rampa de 8 °C/min. La temperatura final del horno fue de 220 °C, permaneciendo 2 minutos. Se inyectó 1  $\mu$ L (disolución en éter etílico de concentración aproximada 5 mg/mL). La inyección por división de flujo con relación 1:100.

#### *4.2.2. Cromatografía en capa fina analítica (CCF)*

Para seguir el curso de reacción en las síntesis de los derivados **2**, **3** y **4** se han utilizado cromatofolios Merck 60 F256 de 0.25 mm de espesor de gel de sílice y en soporte de aluminio. Como eluyentes se utilizaron normalmente mezclas de hexano y éter dietílico. Para la visualización de las manchas se ha empleado una lámpara de luz ultravioleta de 254 nm.

#### 4.2.3. Cromatografía en columna flash (CC)

Para la purificación en CC de los derivados se ha utilizado gel de sílice tipo flash Scharlau 60, con tamaño de partícula de 0.045-0.060 mm, en columnas cromatográficas de 20 mm de diámetro, siguiendo el método descrito en bibliografía (Still *et al.*, 1978). Se disolvió la mezcla a separar en éter dietílico y se preparó una “papilla” con el doble en peso de gel de sílice (de tamaño de partícula de 60-200  $\mu\text{m}$ ) que de mezcla de reacción y se procedió a la elución de componentes. Como eluyente se han usado mezclas de hexano y éter dietílico. Las fracciones eluidas se analizan por CCF y CG.

#### 4.2.4. Técnicas de caracterización estructural

Los espectros de RMN- $^1\text{H}$ , RMN- $^{13}\text{C}$  y RMN-2D (HMQC, HSQC y COSY) se realizaron en un espectrómetro *Bruker DPX 400*, usando cloroformo deuterado como disolvente y tetrametilsilano (TMS, 0.00 ppm) como referencia interna. El grado de sustitución de los carbonos se establece con ayuda de la secuencia multipulso DEPT-135. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en hertzios (Hz). La multiplicidad de las señales se expresa con las abreviaturas habituales (*s*: singlete, *d*: doblete, *t*: triplete, *dd*: doble doblete, *sext*: sextuplete, *hept*: heptuplete). La muestra se prepara en disolución en un tubo convencional de RMN.



### 4.3. Síntesis de los derivados de carvacrol

A una mezcla en agitación de carvacrol (compuesto **1**) (250 mg) y cloruro de butanoilo (0,3 mL) bajo atmósfera de argón (Figura 4.1) se adicionó ácido triflico (2 mL) a 0 °C.



Figura 4.1 Montaje de la reacción

La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 21 minutos (monitorización por CCF; fase móvil: hexano-éter dietílico 8:2), añadiendo hielo (10 g) y acetato de etilo (20 mL) una vez finalizada la reacción. La fase orgánica resultante se lavó con disoluciones acuosas saturadas de NaCl (10 mL), de NaHCO<sub>3</sub> (10 mL) y de NaCl (10 mL) y se dejó secar sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Evaporado el disolvente a presión reducida se obtuvo un crudo de reacción (311 mg) que se sometió a separación cromatográfica en columna de gel de sílice, usando como fase móvil mezclas de hexano-éter dietílico. Inicialmente 300 mL de polaridad 95:5, luego 300 mL de polaridad 90:10, luego 100 mL de polaridad 85:5 y, por último, 100 mL de polaridad 80:20.

Se recogieron 46 tubos de ensayo de 10 mL cada uno. La agrupación de fracciones cromatográficas se hizo mediante análisis por CCF y CG. Los tubos 7-17 contienen el derivado **2** con un tiempo de retención en CG de 14,8 minutos. El tubo 10 contiene este derivado con una pureza del 95,4% (24,05 mg). Los tubos 34-46 contienen el derivado **3** con un tiempo de retención de 16,4 minutos en CG. El tubo 35 contiene este derivado con una pureza del 98,4% (14,50 mg). Los tubos 18-33 contienen al derivado **4** con un tiempo de retención de 17,9. El tubo 23 contiene este derivado

con un 78,1% de pureza (10,42 mg). La estructura de los derivados se determina por resonancia magnética nuclear (RMN) (ver apartado 4.5).

#### 4.4. Optimización de la reacción de obtención del derivado 4

##### Ensayo 1:

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.3, pero partiendo de 500 mg de carvacrol (**1**) y, en consecuencia, duplicando las cantidades del resto de reactivos, disoluciones de lavado y disolventes de extracción, se repitió la reacción en idénticas condiciones, procediendo a tomar una alícuota cada 3 minutos. Cada alícuota se extrajo del matraz de reacción con ayuda de una jeringa y su contenido se adicionó a un vial con agua destilada (2 mL), NaHCO<sub>3</sub> (0.5 g) y acetato de etilo (2 mL). El contenido del vial se agitó y se dejó decantar, inyectando 1 µL de la fase orgánica sobrenadante en el equipo de CG. Los porcentajes de cada pico en los diferentes cromatogramas de gases se recogen en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Porcentajes de los picos cromatográficos de CG (en función del tiempo de reacción) de la acilación de carvacrol (**1**), por adición de TfOH a la mezcla de (**1**) y cloruro de butanoilo (en cantidades equimolares) a 0 °C.

Alícuota	Tiempo (min)	Carvacrol ( <b>1</b> ) t <sub>R</sub> 12,9	Derivado 2 t <sub>R</sub> 14,8	Derivado 3 t <sub>R</sub> 16,4	Derivado 4 t <sub>R</sub> 17,9
1	3	0	77,6	2,7	14,9
2	6	0	70,7	5,3	24,0
3	9	0	69,4	8,1	21,6
4	12	0	58,3	16,3	19,8
5	15	0	54,8	23,4	20,4
6	18	0	46,6	25,4	27,4
7	21	0	40,7	38,6	19,0
8	24	0	39,7	43,7	14,6

t<sub>R</sub>: Tiempo de retención (expresado en minutos).

##### Ensayo 2:

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.3, pero partiendo de 500 mg de carvacrol (**1**) y, en consecuencia, duplicando las cantidades del resto de reactivos, disoluciones de lavado y disolventes de extracción, se repitió la reacción a temperatura ambiente, procediendo a tomar una alícuota cada 3 minutos. En el minuto 12 se empezó a calentar el matraz. Cada alícuota se extrajo del matraz de reacción con ayuda de una jeringa y su contenido se adicionó a un vial con agua

destilada (2 mL), NaHCO<sub>3</sub> (0.5 g) y acetato de etilo (2 mL). El contenido del vial se agitó y se dejó decantar, inyectando 1 µL de la fase orgánica sobrenadante en el equipo de CG. Los porcentajes de cada pico en los diferentes cromatogramas de gases se recogen en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2 Porcentajes de los picos cromatográficos de CG (en función del tiempo de reacción) de la acilación de carvacrol (1), por adición de TfOH a la mezcla de (1) y cloruro de butanoilo (cantidad doble de agente acilante) a 0 °C, y posterior agitación a temperatura ambiente, calentando a partir del minuto 12.

Vial	Tiempo (min)	Carvacrol (1) t <sub>R</sub> 12,9	Derivado 2 t <sub>R</sub> 14,8	Derivado 3 t <sub>R</sub> 16,4	Derivado 4 t <sub>R</sub> 17,9
1	3	0	75,6	0	24,5
2	6	0	46,1	0	53,9
3	9	0	47,4	0	52,6
4	12 Δ	0	37,5	0	62,5
5	15	0	21,1	7,5	64,7
6	18	0	0	22,0	49,6
7	21	0	0	37,8	39,2

Δ: minuto en el que se empieza a calentar el crudo

t<sub>R</sub>: Tiempo de retención (expresado en minutos).

#### 4.5. Caracterización de carvacrol (1) y sus derivados (2-4)

##### A) Producto de partida: Carvacrol (1)

Es un líquido de color amarillo urea con una densidad de 0,977 g / mL y punto de ebullición de 236,8 °C, con un tiempo de retención de 12,9 minutos en CG.

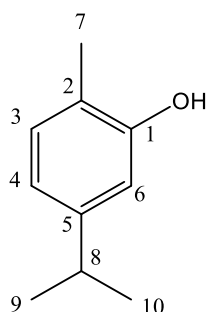


Figura 4.3 Numeración de la estructura del carvacrol (1)

A continuación, se muestra la tabla 4.3 con los datos obtenidos de los espectros de RMN.

Tabla 4.3 Datos de RMN de carvacrol (1)

Posición	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	DEPT
1	-	153,8	Cq
2	-	121,2	Cq
3	7,07 ( <i>dd</i> , 1H, <i>J</i> = 7,7 Hz, <i>J</i> =0,8 Hz)	131,1	CH aromático
4	6,76 ( <i>dd</i> , 1H, <i>J</i> = 7,7 Hz, <i>J</i> =1,8 Hz)	119,0	CH aromático
5	-	148,4	Cq
6	6,68 ( <i>d</i> , 1H, <i>J</i> =1,9 Hz)	113,2	CH
7	2,24 ( <i>s</i> , 3H)	15,5	CH <sub>3</sub>
8	2,85 ( <i>hept</i> , 1H, <i>J</i> =6,9 Hz)	33,2	CH
9	1,24 ( <i>d</i> , 6H, <i>J</i> =7,0 Hz)	24,4	CH <sub>3</sub>
10	1,24 ( <i>d</i> , 6H, <i>J</i> =7,0 Hz)	24,4	CH <sub>3</sub>
OH	4,89 ( <i>s</i> , 1H)	-	CH

## B) Derivado 2: O-Butanoil-carvacrol

Es un líquido amarillo de color amarillo pálido con un tiempo de retención de 14,8 minutos en CG.

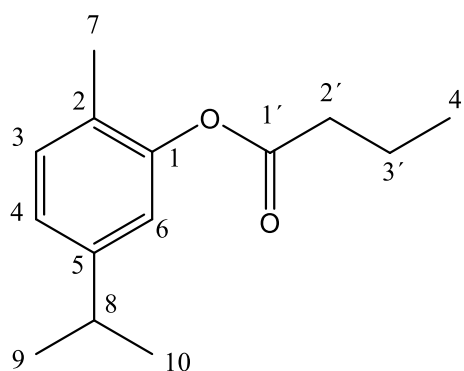


Figura 4.4 Numeración de la estructura del O-butanoilcarvacrol (2)

Tabla 4.4 Datos de RMN del O-butanoilcarvacrol (2)

Posición	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C/ HSQC*	COSY	HMBC
1	-	(149,4)	-	127,3/148,2
2	-	(127,3)	-	-
3	7,15( <i>d</i> , 1H, <i>J</i> = 7,8 Hz)	131,0	7,03	148,2/120,0/15,9
4	7,03( <i>dd</i> , 1H, <i>J</i> =7,8 Hz <i>J</i> =1,7 Hz)	124,2	7,15/6,86	33,7/127,3/148,2/24,0
5	-	(148,2)	-	131,0/149,4
6	6,86( <i>d</i> ,1H, <i>J</i> =1,8Hz)	120,0	7,03	127,3/15,9/33,7/24,0
7	2,14( <i>s</i> , 3H)	15,9	-	120,0/131,0
8	2,88( <i>hept</i> , 1H, <i>J</i> =6,9Hz)	33,7	1,24	120,0/124,2
9	1,24( <i>d</i> , 6H, <i>J</i> =6,9 Hz)	24,0	2,88	148,2/124,2
10	1,24( <i>d</i> , 6H, <i>J</i> =6,9 Hz)	24,0	2,88	148,2/124,2
1'	-	(172,1)	-	36,7/18,7
2'	2,57( <i>t</i> , 1H, <i>J</i> = 7,4 Hz)	36,3	1,82	13,9
3'	1,82( <i>sext</i> , 1H, <i>J</i> =7,4 Hz)	18,7	2,57/1,07	172,1
4'	1,07( <i>t</i> , 3H, <i>J</i> = 7,4 Hz)	13,9	1,82	36,3

\* Los valores entre paréntesis corresponden a los carbonos cuaternarios.

### C) Derivado 3: C-Butanoil-carvacrol

Es un líquido con una tonalidad de amarillo muy pálido con un tiempo de retención de 16,4 minutos en CG.

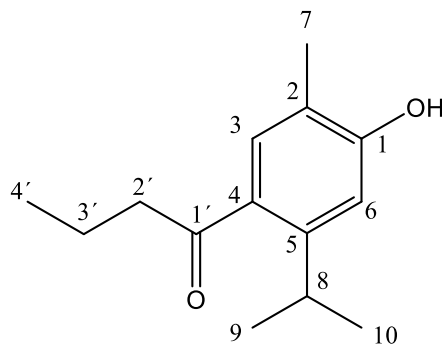


Figura 4.5 Numeración de la estructura química del C-butanoilcarvacrol (3)

Tabla 4.5 Datos de RMN del C-butanoilcarvacrol (3)

Posición	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C/HSQC*	COSY	HMBC
1	-	(156,1)	-	-
2	-	(120,2)	-	-
3	7,34( <i>s</i> , 1H)	131,3	2,25	112,9/28,5
4	-	(131,1)	-	-
5	-	(149,0)	-	23,7
6	6,81( <i>s</i> , 1H)	112,9	2,25	23,7/28,5/131,3
7	2,25( <i>s</i> , 3H)	14,9	-	112,9/131,1
8	3,53( <i>hept</i> , 1H, <i>J</i> = 6,8 Hz)	28,5	1,20	131,3/156,1/112,9
9	1,20( <i>d</i> , 6H, <i>J</i> = 6,9 Hz)	23,7	3,53	112,9/149,0/131,1

<b>10</b>	1,20( <i>d</i> , 6H, <i>J</i> = 6,9 Hz)	23,7	3,53	112,9/149,0/131,1
<b>OH</b>	3,48( <i>s</i> , 1H)	-	-	-
<b>1'</b>	-	(204,6)	-	-
<b>2'</b>	2,83( <i>t</i> , 2H, <i>J</i> = 7,4 Hz)	44,2	1,73	13,8
<b>3'</b>	1,73( <i>sext</i> , 2H, <i>J</i> = 7,4 Hz)	18,3	2,83/0,99	204,6
<b>4'</b>	0,99( <i>t</i> , 3H, <i>J</i> = 7,4 Hz)	13,8	1,73	44,2

\* Los valores entre paréntesis corresponden a los carbonos cuaternarios.

#### D) Derivado 4: di-butanoil-carvacrol

Es un líquido con una tonalidad de amarillo muy pálido con un tiempo de retención de 17,9 minutos en CG.

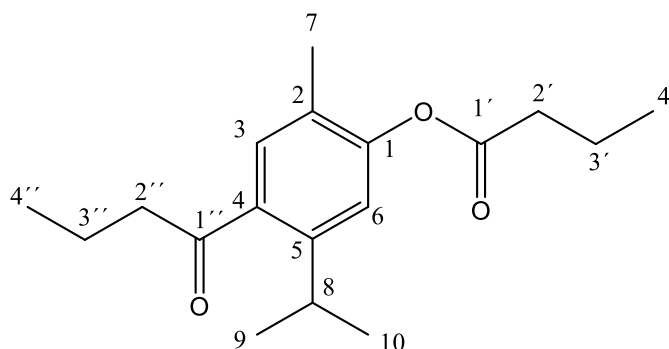


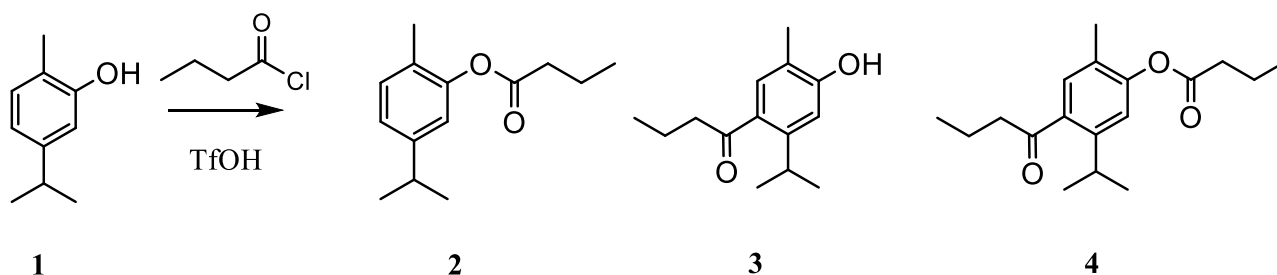
Figura 4.6 Numeración de la estructura química del di-butanoil-carvacrol (4)

Tabla 4.6 Datos de RMN del di-butanoil-carvacrol (4)

Posición	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C/ HSQC*	COSY	HMBC
<b>1</b>	-	(151,3)	-	130,2/147,2
<b>2</b>	-	(127,3)	-	-
<b>3</b>	7,29( <i>s</i> , 1H)	130,2	-	16,1/119,8/147,2/151,3/ 205,7
<b>4</b>	-	(133,7)	-	147,2/119,8/16,1
<b>5</b>	-	(147,2)	-	151,3/133,7/29,4
<b>6</b>	7,00( <i>s</i> , 1H)	119,8	-	24,3/29,4/127,3/133,7/147,2
<b>7</b>	2,16( <i>s</i> , 3H)	16,1	2,16	127,3/151,3/130,2
<b>8</b>	3,33( <i>hept</i> , <i>J</i> = 6,8 Hz, 1H)	29,4	1,21	119,8/130,2
<b>9</b>	1,21 ( <i>d</i> , 6H, <i>J</i> = 6,9 Hz)	24,3	1,22/1,21	119,8/147,2
<b>10</b>	1,21 ( <i>d</i> , 6H, <i>J</i> = 6,9 Hz)	24,3	1,22/1,21	119,8/147,2
<b>1'</b>	-	(172,1)	-	17,9/130,2/36,3/13,9
<b>2'</b>	2,58( <i>t</i> , 2H, <i>J</i> = 7,2 Hz)	36,3	1,82	13,9/172,1
<b>3'</b>	1,82( <i>sext</i> , 2H, <i>J</i> = 7,4 Hz)	17,9	1,07/2,58	36,3/172,1
<b>4'</b>	1,07 ( <i>t</i> , 6H, <i>J</i> = 7,2 Hz)	13,9	1,82	36,3/172,1
<b>1''</b>	-	(205,7)	-	18,8/14,0/44,9
<b>2''</b>	2,82 ( <i>t</i> , 2H, <i>J</i> = 7,4 Hz)	44,9	1,73	14,0/18,8/205,7
<b>3''</b>	1,73( <i>sext</i> , 2H, <i>J</i> = 7,4 Hz)	18,8	2,82/0,99	205,7/44,9/14,0
<b>4''</b>	0,99 ( <i>t</i> , 6H, <i>J</i> = 7,5 Hz)	14,0	1,73	44,9/205,7/18,8

\* Los valores entre paréntesis corresponden a los carbonos cuaternarios.

En el siguiente esquema se resumen los derivados de carvacrol (1) aislados e identificados.



Esquema 4.1. Acilación de carvacrol con cloruro de butanoilo en presencia de ácido trifluoroacético (TfOH).

#### 4.6. Evaluación de la actividad antimicrobiana

A continuación, se analizó la actividad antimicrobiana de los compuestos aislados sobre cepas bacterianas (Figura 4.7) de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), la Colección de Cultivos de la Universidad de Gothenburg (CCUG) y sobre cepas de origen alimentario y especialmente resistentes a antibióticos y tolerantes a biocidas de la colección del grupo AGR-230 de la Universidad de Jaén (tabla 4.7).

Tabla 4.7 Cepas bacterianas objeto de estudio

CEPAS TIPO (CECT Y CCUG)	CEPAS DEL GRUPO AGR-230
<i>Salmonella</i> CECT 915: ( <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>entérica</i> )	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> UJA 27g
<i>Salmonella</i> CECT 409 ( <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>entérica</i> )	<i>Staphylococcus aureus</i> UJA 34f
<i>Salmonella</i> CECT4300 ( <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>entérica</i> )	<i>Bacillus cereus</i> UJA 27q
<i>Salmonella</i> CECT 4395 ( <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Arizonae</i> )	<i>Klebsiella terrigena</i> UJA 32j
<i>Escherichia coli</i> CCUG 47553	<i>Enterococcus faecalis</i> UJA 27t
<i>Escherichia coli</i> CCUG 47557	<i>Enterococcus casseliflavus</i> UJA 11e
<i>Staphylococcus aureus</i> CECT 828 ( <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> )	<i>Enterococcus faecium</i> UJA 11c

<b><i>Staphylococcus aureus</i> CECT 976</b> <b>(<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>)</b>	<i>Salmonella</i> sp. UJA 40k
<b><i>Listeria innocua</i> CECT 910</b> <i>Listeria innocua</i>	<i>Pantoea agglomerans</i> UJA 7m
	<b><i>Pantoea agglomerans</i> UJA 29o</b>

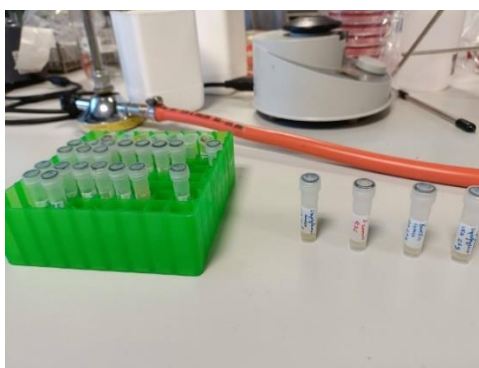


Figura 4.7 Cepas bacterianas

Se hizo una estimación inicial de posible actividad antimicrobiana de los compuestos aislados mediante ensayo en gota por difusión en agar.

Para realizar este ensayo, previamente añadimos medio Tryptic Soy Broth (TSB) en un tubo de ensayo y con un hisopo de algodón estéril sembramos la cepa en el tubo. Las bacterias deben de crecer en una estufa (Figura 4.8) a 37 °C durante 24h. Para comprobar que las bacterias han crecido debemos observar que hay turbidez en el tubo de ensayo una vez finalizado el tiempo de incubación.

Por su parte, los compuestos objeto de estudio se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) a una concentración de 10 mg/ml. Esta solución se almacenó a -80°C para emplearla como solución madre en el desarrollo de los ensayos. En Microbiología es muy importante conservar la esterilidad del material en todo momento, porque una pequeña contaminación puede involucrar una alteración del resultado. A continuación, realizamos diluciones seriadas en base 10 de cada uno de los compuestos en medio TSB. Se ensayaron concentraciones entre 1000 µg/ml y 0,01 µg/ml en gotas de 5 µl sobre placas de medio de cultivo Müller-Hilton previamente sembradas con las distintas cepas diana.



Tras incubación a 37°C durante 20-24 horas, la actividad antimicrobiana se evaluó por medida de los halos de inhibición de crecimiento originados por los compuestos en las distintas concentraciones ensayadas. Este ensayo lo realizamos por duplicado para verificar lo que previamente habíamos observado.



Figura 4.8 Estufa de crecimiento bacteriano a 37 °C

La estimación cuantitativa de las actividades antimicrobianas se realizó mediante ensayo de microtitulación, de acuerdo con las recomendaciones del CLSI (2015), con el objetivo de determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMIs) de los compuestos activos sobre las cepas sensibles. Una placa de microtitulación contiene 96 pocillos de 200  $\mu$ l de volumen máximo cada uno. En cada pocillo debemos añadir 180  $\mu$ l de nuestro compuesto y 20  $\mu$ l de la cepa bacteriana objeto de estudio.

Para ello, en estas placas de microtitulación (Figura 4.9) se incuban diluciones de los distintos compuestos de interés con suspensiones microbianas de las cepas diana ajustadas a  $5 \times 10^5$  UFC/ml en medio TSB. En el ensayo se incluyeron controles positivos de crecimiento y de esterilidad, así como el diluyente como control negativo (Figura 4.10) Tras incubación a 37°C durante 20-24 horas, se midió la densidad óptica de los pocillos a 595nm en un lector de microplacas iMark (BioRad, Madrid, Spain). Las CMIs se definieron como las concentraciones más bajas de cada uno de los compuestos capaces de inhibir el crecimiento microbiano tras la incubación. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

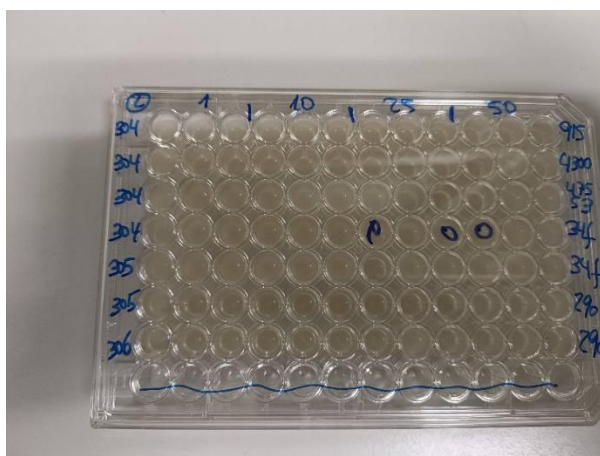


Figura 4.9 Placa de microtitulación con ensayos por triplicado

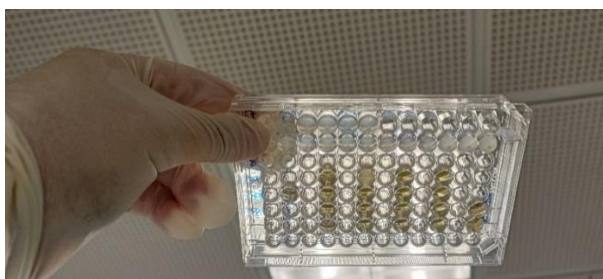


Figura 4.10 Placa de microtitulación de controles

A continuación, evaluamos posibles efectos sinérgicos entre los compuestos activos mediante el método descrito por Rukayadi *et al.* (2009) y Guo *et al.* (2010). Para ello se realizaron diluciones seriadas en base 2 de los compuestos activos, que se combinaron para hacerlas contactar con las cepas sensibles. Para comprobar si los compuestos tienen efecto sinérgico, calculamos el valor FIC (Fractional Inhibitory Concentration) de ambos compuestos para cada concentración ensayada y los sumamos. El valor FIC se obtiene dividiendo la CMI del compuesto en combinación entre la CMI del compuesto aislado. La suma de ambos FICs constituye el FICI (Fractional Inhibitory Concentration Index). Si el FICI es igual o inferior a 0.5, se considera que hay un efecto sinérgico. Por el contrario, valores de FICI por encima de 4 suponen efecto antagónico y valores intermedios se consideran indiferentes.

Por último, se realizó un estudio para evaluar la capacidad de los compuestos para inhibir la formación de biopelículas por parte de las cepas sensibles o bien para disgregar estas biopelículas una vez formadas (Figura 4.11), mediante el método de

tinción con cristal violeta descrito por Djordjevic *et al.*, (2002) con algunas modificaciones. Las suspensiones bacterianas en TSB se incubaron con concentraciones crecientes de cada compuesto, o sin tratamiento, por triplicado en una placa de 96 pocillos (24 h; 30 °C). Los pocillos se lavaron con agua destilada y la biopelícula formada se fijó con metanol. La placa se tiñó con cristal violeta al 0,3% durante 5 minutos, se lavó y se reconstituyó con etanol absoluto. La placa se leyó en un lector de microplacas como anteriormente se ha indicado.

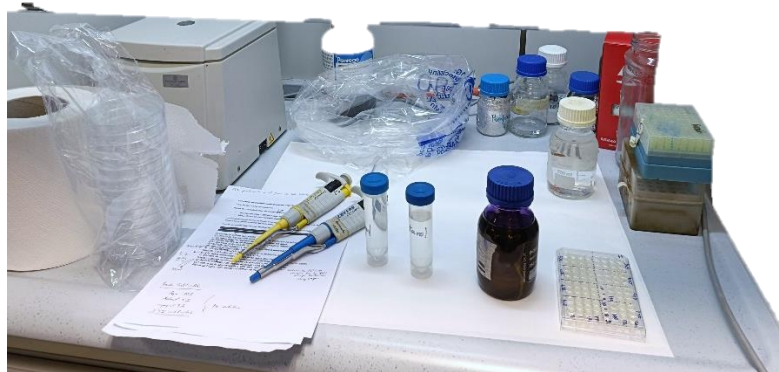


Figura 4.11 Material necesario para el ensayo de Biofilm

La disgregación de las biopelículas previamente formadas se analizó por el mismo método de tinción con cristal violeta (Dean *et al.*, 2011; Ulrey *et al.*, 2014). En este caso, tras la formación de la biopelícula (manteniendo las cepas en medio de cultivo durante 24 h a 30 °C) en placas de 96 pocillos, se retiró el contenido de los pocillos y se añadieron concentraciones crecientes de cada compuesto, por triplicado. Para cada ensayo se dispuso de pocillos sin tratamiento (con medio TSB exclusivamente), que sirvieron como control positivo de formación de las biopelículas. Después de una incubación adicional (24 h, 30 °C), la tinción con cristal violeta (Figura 4.12) se realizó como se describió anteriormente en el ensayo de inhibición de la producción de biopelículas.

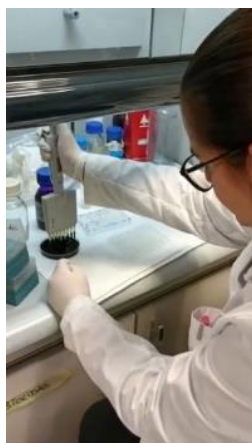


Figura 4.12 Tinción con cristal violeta con una micropipeta multicanal

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Acilación de carvacrol con cloruro de butanoilo en presencia de ácido trifílico

En un primer ensayo se llevó a cabo la reacción de acilación de carvacrol con cloruro de butanoilo y ácido trifílico (ácido trifluorometilsulfónico) siguiendo el protocolo descrito por (Murashige *et al.*, 2011). Según estos autores, la acilación de Friedel-Crafts de un fenol puede llevarse a cabo añadiendo en frío el superácido a una mezcla equimolar del fenol y del cloruro de acilo y dejando agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente hasta su finalización. El ácido trifílico forma un anhídrido mixto con el cloruro de ácido, que es la especie activa que va a reaccionar con el compuesto fenólico. Este anhídrido mixto es un buen agente acilante y puede originar a partir de fenoles, tanto compuestos O-acilados (por acilación del grupo OH fenólico) como compuestos C-acilados (por acilación del anillo aromático, a través de una acilación de Friedel-Crafts, o por migración del grupo acilo del compuesto O-acilado hacia el anillo, a través de un reordenamiento de Fries).

Teniendo en cuenta que nunca antes se había llevado a cabo esta reacción sobre carvacrol, procedimos en un primer ensayo al procesado de la reacción transcurridos 20 minutos desde el inicio. El análisis por cromatografía de gases (CG) del crudo de reacción nos mostró la presencia de 3 picos principales a tiempos de retención ( $t_R$ ) de 14,8 minutos (26,9%), de 16,4 minutos (42,9%) y de 17,9 minutos (25,1%),

además de un pico menor a  $t_R$  de 12,9 minutos, que corresponde a una pequeña cantidad (5,2%) de producto de partida (carvacrol, **1**) sin reaccionar (Figura 5.1).

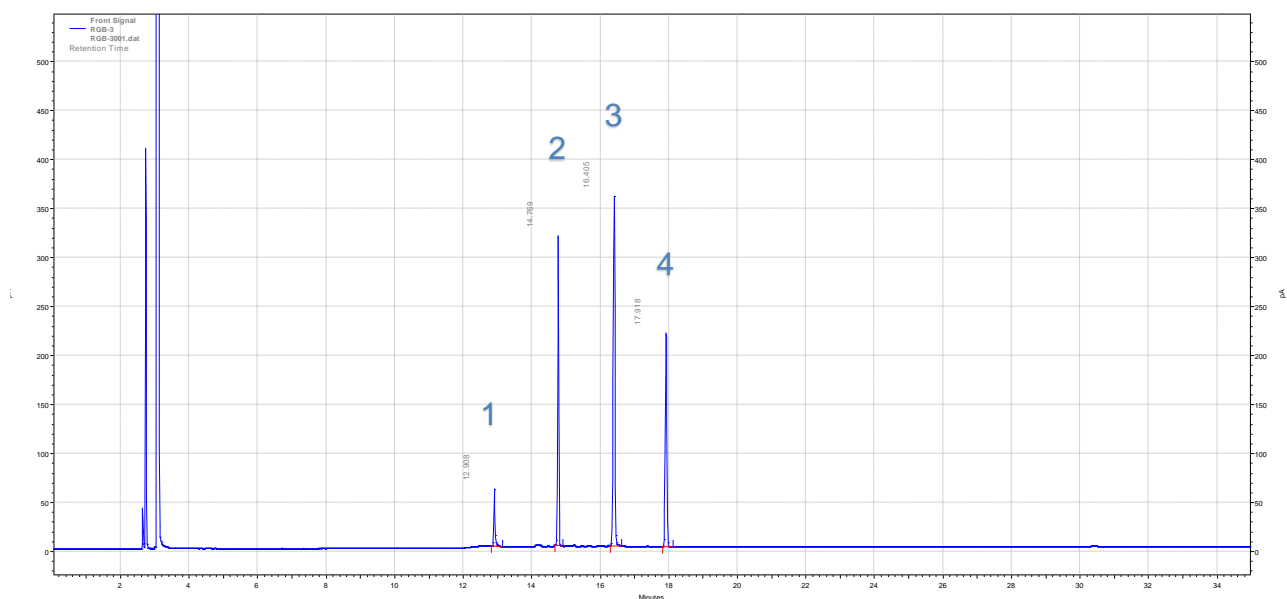


Figura 5.1 Cromatograma de gases de la mezcla de reacción de la acilación de carvacrol (**1**) con cloruro de butanoilo y ácido triflico.

A continuación, se procedió a separar esos tres compuestos obtenidos en la reacción por cromatografía en columna (CC) usando gel de sílice como fase estacionaria y mezclas de hexano-éter, de polaridad creciente, como fase móvil. Como resultado, se aisló el compuesto a  $t_R$  de 14,8 minutos (**2**), con una pureza del 95,4% (Figura 8.22 del Anexo) y el compuesto a  $t_R$  de 16,4 minutos (**3**) con una pureza del 98,4% (Figura 8.23 del Anexo). El compuesto **4** ( $t_R$  de 17,9 minutos) no se consiguió purificar del todo en esta columna cromatográfica, pues se aisló con una pureza máxima del 78,8%.

Aislados los compuestos **2** y **3** con una pureza adecuada se procedió a su determinación estructural por resonancia magnética nuclear (RMN). En el espectro de RMN- $^1\text{H}$  del compuesto **2** aparece un singlete a  $\delta$  2,14 típico de grupo metilo bencílico, y un heptuplete a  $\delta$  2,88 que integra por 1 H y que justifica la presencia de un grupo isopropilo unido a anillo aromático, observadas ambas señales también en el producto de partida (**1**). La aparición de un triplete a  $\delta$  2,57 (de  $J$  7,4 Hz), un sextuplete a  $\delta$  1,82 (de igual  $J$ ) y un triplete a  $\delta$  1,07 (de igual  $J$ ) indican la presencia de un grupo butanoilo en este compuesto **2**. En la región aromática del espectro se

observa un doblete a  $\delta$  7,15 (de  $J$  7,8 Hz), un doble doblete a  $\delta$  7,03 (de  $J$  7,8 Hz y  $J$  1,7 Hz), y otro doblete a  $\delta$  6,86 (de  $J$  1,8 Hz), que conforman un sistema ABX semejante al del producto de partida (**1**), lo que indica que el grupo butanoilo en este compuesto no puede estar unido a ningún carbono del anillo aromático, sino al átomo de oxígeno. La presencia en el espectro RMN- $^{13}\text{C}$  de un carbono cuaternario a  $\delta$  172,1, propio de grupo éster, y de tres carbonos más a  $\delta$  36,3 ( $\text{CH}_2$ ), 18,7 ( $\text{CH}_2$ ) y 13,9 ( $\text{CH}_3$ ), ponen de manifiesto la presencia de un grupo butanoilo enlazado al anillo aromático a través de una función éster. Teniendo en cuenta los datos de RMN mencionados puede concluirse que el compuesto **2** posee la estructura de *O*-butanoil-carvacrol (Figura 5.2). Este derivado de carvacrol es un producto natural identificado inicialmente en los aceites esenciales y rizomas de especies del género *Arnica* (Rinn, 1970). Se ha propuesto su uso como aditivo para piensos (Zhou *et al.*, 2016) y para el tratamiento y prevención de la infección por piojos de mar en peces (Mansilla *et al.*, 2012).



Figura 5.2 Estructura química de los derivados de carvacrol **2** y **3**.

En el espectro de RMN- $^1\text{H}$  del derivado **3** aparece una señal singlete a  $\delta$  2,25, típica de grupo metilo bencílico, un heptuplete a  $\delta$  3,53 que integra por 1 H, propio de grupo isopropilo unido a anillo aromático, y un singlete a  $\delta$  3,48 que justifica la presencia del grupo OH. Todas estas señales se observan también en el producto de partida (**1**). Lo más destacado del derivado **3** es la presencia de sólo dos hidrógenos aromáticos a  $\delta$  7,34 y 6,81, que resuenan como singletes. La presencia en el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de un carbono cuaternario a  $\delta$  204,6 indica que el grupo carbonilo es de naturaleza cetónica. Las señales a  $\delta$  44,2 ( $\text{CH}_2$ ), 18,3 ( $\text{CH}_2$ ) y 13,8 ( $\text{CH}_3$ ) completan el resto del grupo de butanoilo. Teniendo en cuenta estos datos espectroscópicos se deduce que la cadena de butanoilo estaría situada en posición para respecto del OH. Por lo tanto, puede concluirse que el compuesto **3** posee la estructura de *C*-butanoil-carvacrol (Figura 5.2). Este derivado **3** se describió por

primera vez en 1928 como producto de síntesis al tratar carvacrol con diferentes cetonas (Rosenmund y Qué, 1928. Teniendo en cuenta que en aquellos años no se disponía de las actuales técnicas de determinación estructural, como la RMN, puede decirse que este compuesto se ha descrito en este TFG de una forma más actual y certera.

Dado que el compuesto **4** no se pudo purificar adecuadamente en la columna cromatográfica de la reacción descrita anteriormente, repetimos la reacción en las mismas condiciones experimentales indicadas, pero analizando cada 3 minutos la composición de la mezcla de reacción, con la doble finalidad de conocer la evolución de los productos finales de reacción con el paso del tiempo, y en qué momento se forma mayor cantidad del compuesto **4**, para proceder a su posterior purificación. Este análisis de la reacción en función del tiempo se hizo extrayendo periódicamente (cada 3 minutos) una pequeña alícuota del matraz de reacción, con la ayuda de una jeringa, y procediendo a su neutralización y análisis por cromatografía de gases (CG). Los porcentajes de presencia de los compuestos **1-4** en la mezcla de reacción cada 3 minutos, determinados por CG, se han representado en la Figura 5.3.

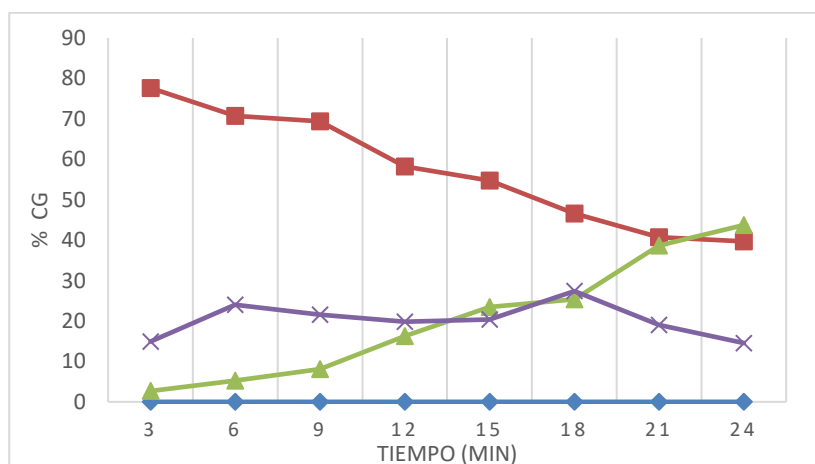
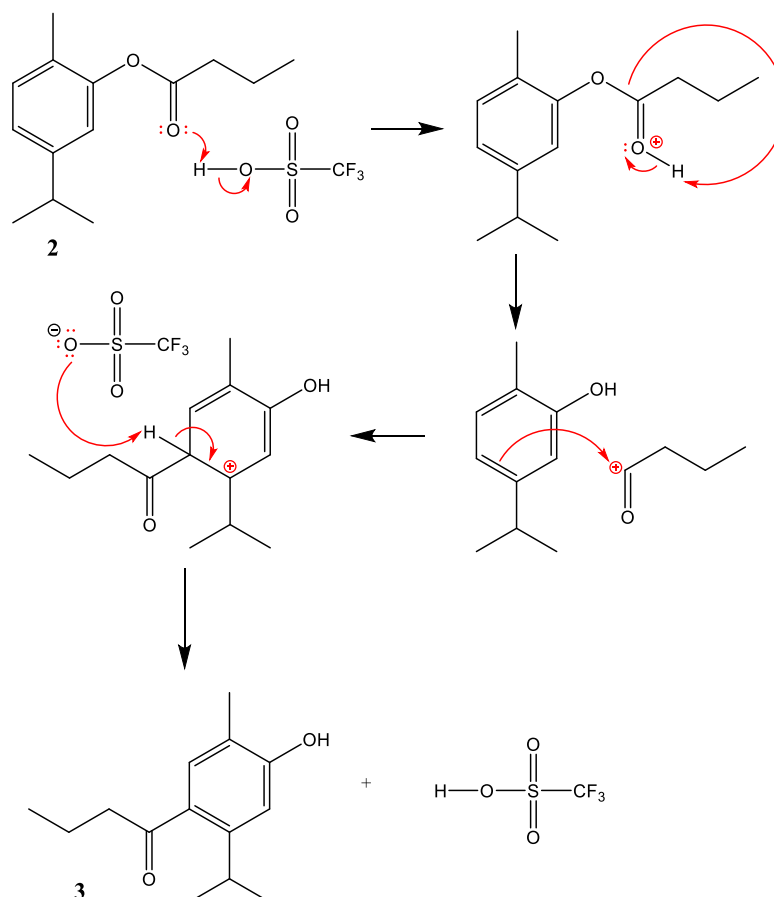


Figura 5.3 Representación gráfica del progreso en el tiempo de la reacción de acilación de carvacrol, por adición de TfOH a la mezcla de reacción de **1** y cloruro de butanoilo (en cantidades equimolares) a 0 °C, y posterior agitación a temperatura ambiente (línea roja: derivado **2**, línea morada: derivado **4**, línea verde: derivado **3**; línea azul: producto de partida, **1**).

Como se puede observar en la gráfica, ya en el minuto 3 de reacción ha desaparecido el producto de partida (**1**) y prácticamente el único producto de reacción es el derivado O-butanoil-carvacrol (**2**). Apenas se ha formado el derivado

C-butanoil-carvacrol (**3**), pero sí que se ha formado cierta cantidad del compuesto **4** (pendiente de identificación). Si se observa la gráfica con el transcurso de los minutos, destaca la progresiva disminución del compuesto **2**, al mismo tiempo que se produce el incremento del derivado **3**. Eso podría significar que se está dando la conversión del éster aromático **2** en el producto de C-acilación **3** en el mismo medio de reacción, a través de un reagrupamiento de Fries (March y Smith, 2007; Puteri-Tachrim 2017), como se indica en el esquema 5.1



Esquema 5.1 Conversión de **2** en **3** por reagrupamiento de Fries en presencia de ácido triflico (TfOH).

En cuanto al derivado **4**, prácticamente su presencia permanece constante a lo largo de la reacción (oscila entre el 14,8% y el 27,3%), lo que significa que en estas condiciones de reacción no se da un porcentaje suficientemente alto que permita hacer una columna cromatográfica para llevar a cabo su purificación con mayor probabilidad de éxito.

Se plantea, por tanto, en un segundo ensayo, conocer la influencia de la temperatura en la formación del derivado **4**, así como la influencia del empleo de una cantidad molar doble de agente acilante (cloruro de butanoilo). Para ello, se introdujeron en la



reacción los siguientes cambios: (a) la adición del ácido triflico sobre la mezcla de **1** y cloruro de butanoilo se llevó a cabo a temperatura ambiente, no a 0 °C; (b) la reacción se mantuvo a temperatura ambiente hasta el minuto 12, a partir del cual la mezcla de reacción se calentó a 35 °C; (c) la reacción se llevó a cabo con doble cantidad molar de cloruro de butanoilo que de producto de partida (**1**). Este último cambio está basado en la sospecha de que el compuesto **4** pudiera ser un producto de doble acilación, en cuyo caso habría que esperar que subieran sus porcentajes de presencia en la mezcla de reacción como consecuencia de incrementar la cantidad de agente acilante en el medio. Así, los porcentajes de presencia de los compuestos **1-4** en la mezcla de reacción en estas nuevas condiciones experimentales, determinados por CG, se han representado en la Figura 5.4.

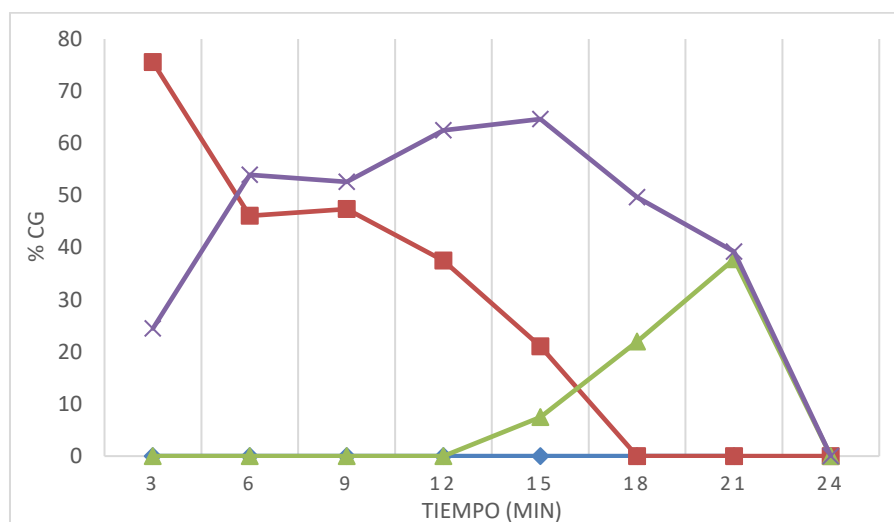


Figura 5.4 Representación gráfica del progreso en el tiempo de la reacción de acilación de carvacrol, por adición de TfOH a la mezcla de reacción de **1** y cloruro de butanoilo a temperatura ambiente, con doble cantidad de agente acilante que de **1**, y posterior calentamiento a partir del minuto 12 (línea roja: derivado **2**, línea morada: derivado **4**, línea verde: derivado **3**; línea azul: producto de partida, **1**).

Como se puede observar en la gráfica, ya en el minuto 3 de reacción ha desaparecido el producto de partida (**1**) y prácticamente los productos de reacción que se observan son el derivado *O*-butanoil-carvacrol (**2**) y el compuesto **4**. No se ha formado el derivado *C*-butanoil-carvacrol (**3**). Si se observa la gráfica con el transcurso de los minutos, destaca la progresiva disminución del compuesto **2**, al mismo tiempo que se produce el incremento del derivado **4**. Cuando se empieza a calentar el matraz a partir del minuto 12 se observa un aumento del derivado *C*-

butanoil-carvacrol (**3**) mientras se produce una disminución importante de los derivados **2** y **4**. Se deduce, por tanto, que calentar el matraz no favorece la obtención del derivado **4**. En consecuencia, se planteó la realización de un tercer ensayo a temperatura ambiente. Teniendo en cuenta que se ha observado que incluso en los minutos 12 y 15 estaba en aumento este derivado, procedimos a realizar la reacción con doble de agente acilante, pero dejando la reacción más tiempo (1 h). Se analizó el crudo de reacción resultante por CG (Figura 5.5), observándose que la mezcla de reacción estaba prácticamente formada por el compuesto **4** (75,1%), acompañado de una cantidad menor del derivado **2** (24,9%), y prácticamente nada de **1** y **3**.

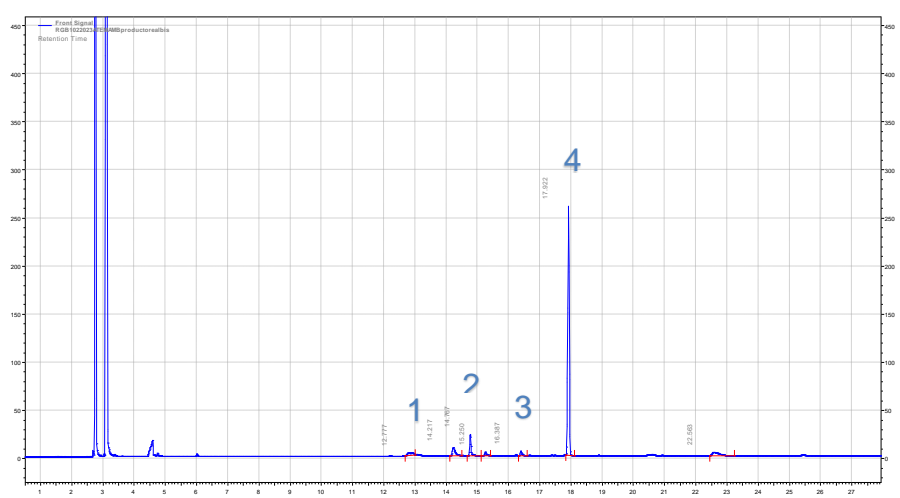
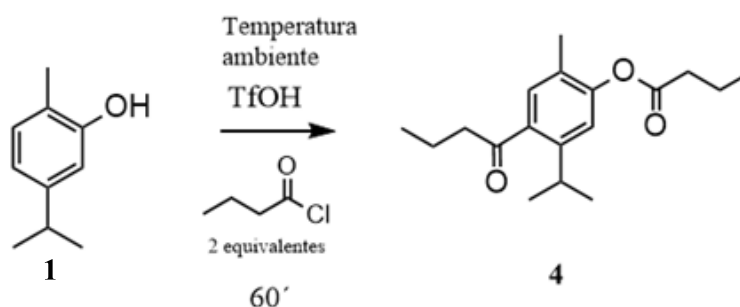


Figura 5.5 Cromatograma de gases de la mezcla de reacción de la acilación de carvacrol (**1**) con cloruro de butanoilo (con doble cantidad de agente acilante que de **1**) y ácido tríflico a temperatura ambiente.

A continuación, fue necesario realizar una columna “flash” para purificar el derivado **4** con las condiciones idénticas al primer crudo de reacción. Los tubos 20-26 contenían el derivado **4** con un buen grado de pureza, pero fue el tubo 22 el que lo

contenía (Esquema 5.2) al 100% (Figura 8.24 del Anexo).



Esquema 5.2 Formación del compuesto **4** a partir de carvacrol (**1**) en la reacción con dos equivalentes de cloruro de butanoilo en presencia de ácido triflico a temperatura ambiente y un tiempo total de reacción de 1 hora.

A continuación, habiendo ya conseguido el derivado **4** con una pureza adecuada para hacer RMN se procedió a su determinación estructural. La aparición en el espectro de RMN-<sup>13</sup>C de un carbono cuaternario a  $\delta$  205,7, típico de una cetona, y la cadena alifática de las señales de  $\delta$  44,9 (CH<sub>2</sub>), 18,8 (CH<sub>2</sub>) y 14,0 (CH<sub>3</sub>), indican una cadena de butanoilo. La señal a  $\delta$  172,1 es propia de carbonilo de éster, y correlaciona en HMBC con las señales a  $\delta$  36,3 (CH<sub>2</sub>), 17,9 (CH<sub>2</sub>) y 13,9 (CH<sub>3</sub>), deduciéndose la presencia de otra cadena de butanoilo. En la región aromática del espectro de RMN-<sup>1</sup>H destaca la presencia de un singlete a  $\delta$  7,29 y la de otro singlete a  $\delta$  7,00, similares al derivado **3**, lo que está indicando que un grupo butanoílo debe estar unido al oxígeno fenólico y el otro al carbono anular C-4. La cadena de butanoilo con la cetona se correlaciona con los carbonos aromáticos a  $\delta$  130,2 (C-3),  $\delta$  147,2 (C-5) y  $\delta$  119,8 (C-6), confirmándose así su posición. La presencia de un carbono cuaternario a  $\delta$  151,3, que correlaciona en HMBC con las señales a  $\delta$  130,2 y  $\delta$  147,2, justifica la posición de la cadena de butanoilo que contiene el éster. Todas estas señales permiten concluir que el compuesto **4** tiene la estructura de di-butanoil-carvacrol, tratándose de un compuesto descrito por primera vez en este TFG.

En la Figura 5.6 se muestra el esquema resumen de obtención de los derivados **2** y **3** a partir de **1**, a través de una acilación en condiciones estándar, usando un equivalente de agente acilante durante 20 minutos, y de la obtención del derivado diacilado **4**, usando dos equivalentes de agente acilante y un tiempo de reacción superior (60 minutos).

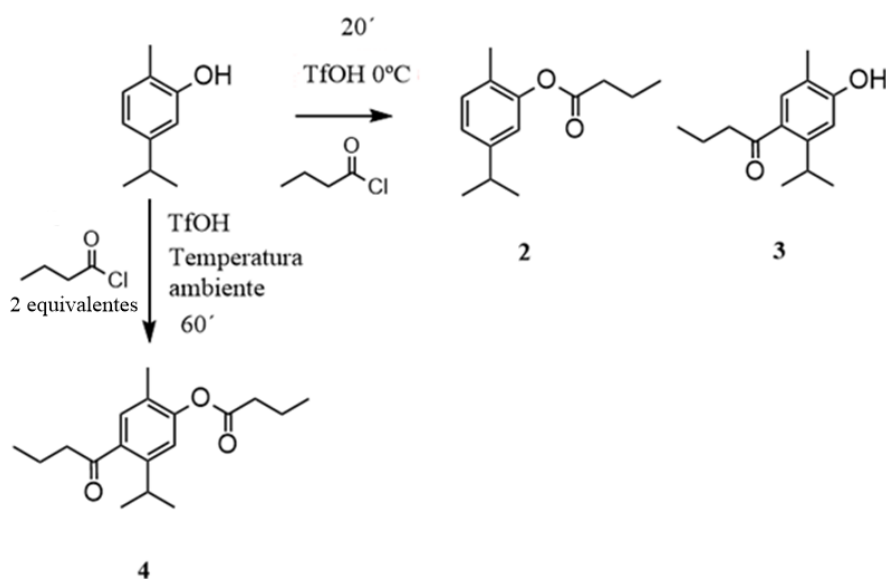


Figura 5.6 Acilaciones de carvacrol (1) para rendir los derivados monoacilados 2 y 3, o el derivado diacilado 4, dependiendo de las condiciones experimentales usadas.

## 5.2. Actividad antimicrobiana de los derivados obtenidos

Tras realizar un ensayo preliminar por difusión en agar se seleccionaron los compuestos más activos para realizar una estimación cuantitativa de su actividad antimicrobiana. La mayor actividad de los compuestos se obtuvo sobre bacterias Gram positivas (Tabla 5.1), obteniéndose las siguientes CMI:

Tabla 5.1 Concentraciones mínimas inhibitorias de los compuestos frente a las cepas diana.

Compuesto	Cepa	CMI* (µg/mL)
Producto de partida (1)	<i>S.aureus</i> UJA 34f	25
Derivado 3	<i>S.saprophyticus</i> UJA 27g	100
Derivado 3	<i>B.cereus</i> UJA 27q	100
Derivado 3	<i>S.aureus</i> CECT 976	100

\*CMI: concentración mínima inhibitoria

A la vista de que el producto de partida (1) y el derivado 3 fueron especialmente activos frente al género *Staphylococcus*, se realizó un ensayo para determinar posibles efectos sinérgicos entre ambos compuestos sobre las cepas pertenecientes a ese género. Se encontró un cierto efecto sinérgico entre ambos compuestos sobre la cepa *S. aureus* UJA 34f obteniéndose un valor de FICI de 0,05625, en el límite

del valor considerado para asegurar un efecto sinérgico. Las combinaciones de ambos compuestos no mostraron efecto antagónico ni sinérgico sobre el resto de las cepas ensayadas.

En el efecto de los derivados sobre la formación de biopelículas se obtuvo un 22% de inhibición en la formación de biopelículas por parte de la cepa *S.aureus* CECT 976 con el derivado **3** a una concentración de 10 µg/mL. El efecto del derivado **3** sobre la cepa UJA 27q con todas las concentraciones ensayadas tuvieron un efecto similar logrando entre un 55% y un 60% de inhibición de formación de biopelícula respecto al control. El resto de compuestos ensayados no mostraron diferencias significativas respecto al control (Tabla 5.2).

En cuanto a la capacidad de los compuestos para disgregar las biopelículas, se observó una disminución de un 57% por parte del producto de partida (**1**) sobre la cepa *S.aureus* UJA 34f a una concentración de 0,1 µg/mL, así como un 36% por parte del derivado **3** sobre la cepa *S.aureus* CECT 976 a una concentración de 0,1 µg/mL, un 35% con el derivado **3** sobre la cepa *B.cereus* UJA 27q a 0,1 µg/mL y un 20% de disgregación de biopelículas con el derivado **3** sobre la cepa *S.saprophyticus* UJA 27g a 1 µg/mL (Tabla 5.3).

Tabla 5.2 Porcentaje de formación de biopelículas por las cepas diana en presencia de los derivados ensayados.

Concentración (µg/mL)	<i>S.aureus</i> UJA 34f	<i>B.cereus</i> UJA 27q	<i>S.saprophyticus</i> UJA 27g	<i>S.aureus</i> CECT 976
	Producto de partida ( <b>1</b> )	Derivado <b>3</b>	Derivado <b>3</b>	Derivado <b>3</b>
<b>10</b>	103,6	<b>39,7</b>	237,2	<b>78,2</b>
<b>1</b>	94,3	<b>43,1</b>	208,5	101,2
<b>0,1</b>	83,2	<b>39,3</b>	227,0	103,3
<b>0,01</b>	<b>91,2</b>	<b>44,4</b>	<b>257,1</b>	<b>102,7</b>

Tabla 5.3 Porcentaje de biopelículas no disgregadas tras contacto con los derivados ensayados.

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>S.aureus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>S.saprophyticus</i>	<i>S.aureus</i>
	UJA 34f	UJA 27q	UJA 27g	CECT976
	Producto de partida (1)	Derivado 3	Derivado 3	Derivado 3
10	74,3	128,7	94,1	69,5
1	78,6	109,8	80,4	94,3
0,1	43,6	65,2	88,2	64,8
0,01	75,5	191,9	95,8	90,5

Las cepas diana identificadas como sensibles a derivados del carvacrol en el presente estudio habían sido previamente aisladas de alimentos ecológicos, identificadas y clasificadas como altamente tolerantes a biocidas y/o antibióticos (Fernández-Fuentes *et al.*, 2012). Previamente se había descrito actividad inhibidora de la formación de biopelículas sobre las cepas UJA 34f y UJA 27q por parte de derivados de procianidinas (Alejo *et al.*, 2018), obteniéndose resultados similares a los descritos en este trabajo, lo que corrobora la actividad antimicrobiana asociada a los derivados fenólicos. En conclusión, hemos descrito aquí la síntesis de tres derivados de carvacrol, la capacidad de **1** (el propio compuesto de partida) y **3** para inhibir el crecimiento de cuatro bacterias resistentes aisladas de alimentos ecológicos, sus efectos inhibidores sobre la formación de biopelículas y sus capacidades para disgregar las biopelículas previamente formadas. En el caso del derivado **3** se observa una mayor actividad que en el propio carvacrol. Teniendo en cuenta las actividades antimicrobiana e inhibidora de la formación de biopelículas, se puede deducir que la polaridad relativamente más alta del derivado **3** y la presencia del grupo OH (Baser, 2008) le confiere a la molécula mayor actividad biológica que su producto de partida. Estos compuestos, con probadas propiedades antimicrobianas y bloqueadoras de la formación de biopelículas podrían, por tanto, ser útiles en la obtención de plásticos activados o films para el envasado de alimentos.

Sin embargo, esta familia de compuestos tiene también una gran diversidad de actividades sobre células de mamíferos (Xu *et al.*, 2021) y sería necesaria la comprobación de sus posibles efectos secundarios para realizar una evaluación completa de su utilidad práctica en el campo de la industria alimentaria.

Igualmente importante sería la evaluación de sus concentraciones citotóxicas mínimas (CCMs), es decir, aquellas necesarias para causar alteraciones microscópicamente detectables en la morfología normal de las células, o bien el porcentaje de células sobrevivientes a una incubación con los compuestos antimicrobianos activos. Estos ensayos serán objeto de futuras colaboraciones con otro grupo de investigación centrado en cultivos celulares, con la finalidad de buscar compuestos con las menores CMI y las mayores CCMs que sea posible.

## 6. CONCLUSIONES

1. La reacción de carvacrol (**1**) con cloruro de butanoílo, en cantidades equimolares, y usando ácido tríflico como catalizador, ha permitido obtener un derivado O-acilado (**2**), un derivado C-acilado (**3**) y un derivado C y O-acilado (**4**). Estos tres compuestos se han purificado por cromatografía en columna y se han identificado por resonancia magnética nuclear
2. El estudio de la reacción de acilación de **1** en función del tiempo y modificando algunos parámetros ha permitido encontrar condiciones experimentales selectivas de conversión de **1** en el derivado diacilado **4**. Este compuesto se ha descrito por primera vez en este TFG.
3. Los compuestos analizados (**1-4**) presentan buena actividad antimicrobiana específicamente sobre bacterias Gram positivas.
4. Si bien el compuesto de partida (carvacrol) es el que menor concentración mínima inhibitoria presenta frente a la cepa *S.aureus* UJA 34f, el derivado **3** muestra actividad antimicrobiana frente a un rango mayor de bacterias.
5. Se observa un cierto efecto sinérgico entre el carvacrol y el derivado **3** sobre la cepa aislada de alimentos ecológicos *S.aureus* UJA 34f .
6. El derivado **3** muestra un potente efecto inhibitor de la formación de biopelículas y una buena capacidad para disgregar biopelículas previamente formadas por parte bacterias de los géneros *Staphylococcus* y *Bacillus*.
7. Los resultados obtenidos refuerzan la hipótesis de que una polaridad relativamente más alta y la presencia del grupo OH le confieren al derivado **3** mayor actividad biológica que su producto de partida, lo que puede constituir la base del desarrollo de nuevas estrategias de conservación de alimentos utilizando estos derivados fenólicos como biocidas o como conservantes en alimentos, una vez descartados sus posibles efectos citotóxicos
8. Los resultados de este trabajo sin duda podrán contribuir, en el ámbito de los objetivos de desarrollo sostenible (ODS), con la meta 3.3 para combatir las enfermedades transmisibles, la meta 12.3 para reducir el desperdicio de alimentos y la meta 9.5, fomentando la investigación científica, la innovación y la mejora de la capacidad tecnológica del sector de la industria alimentaria en este caso.



## 7.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alejo Armijo A, Glibota N, Frías M.P , Altarejos J, Galvez A, Salido S, Ortega-Morente E, (2018). Synthesis and Evaluation of Antimicrobial and Antibiofilm Properties of A-Type Procyanidin Analogues against Resistant Bacteria in Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66(9): 2151–2158.

Alejo Armijo A, Glibota N, Frías M.P, Altarejos J, Galvez A, Salido S, Ortega Morente E, (2017). Antimicrobial and antibiofilm activities of procyanidins extracted from laurel wood against a selection of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Science and Technology* 52: 679–686.

Baser, K.H (2008). Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Current Pharmaceutical Design* 14: 3106-3119.

Chengguang Z, Yali Z, Peng Z, Jian W, Wenfei H, Dengjian S, Huameng L, Guang L, Shulin Y, (2015). Synthesis and biological evaluation of a novel class of curcumin analogs as anti-inflammatory agents for prevention and treatment of sepsis in mouse model *Drug Design, Development and Therapy* 9: 1663–1678.

Domingo D, López-Brea M, (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Sociedad Española de Quimioterapia* 16: 385-388

De Vincenzi, Stamatii M, De Vincenzi A, Silano M, (2004). Constituents of aromatic plants carvacrol. *El Servier* 75: 801-803.

Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough L.A, (2002). Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2950-2958.

Fernandez-Fuentes M.A, Ortega-Morente E, Abriouel H, Pérez-Pulido R, Gálvez A, (2012). Isolation and identification of bacteria from organic foods: sensitivity to biocides and antibiotics. *Food Control* 26: 73-78.

Franz C, Baser K.C.H., Windisch W, (2009). Essential oils and aromatic plants in animal feeding – a European perspective. A review. *Flavour and Fragrance Journal* 25: 327-340.

Gallegos Flores P.I, Bañuelos Valenzuela R, Delgadillo Ruiz L, Meza López C, Echavarría Cháirez F, (2019). Antibacterial activity of five terpenoid compounds: carvacrol, limonene, linalool,  $\alpha$ -terpinene and thymol *Tropical and Subtropicals Agroecosystems. Food Microbiology* 27:241-243.

Gil Ruiz, Pilar. (2002). Productos naturales. Pamplona: Universidad Pública de Navarra.

Grande M.J, Abriouel H, Lucas R, Valdivia E, Ben Omar N, Martínez Canamero M, Gálvez A, (2007a). Efficacy of enterocin AS-48 against bacilli in ready-to-eat vegetable soups and purees. *Journal of Food Protection* 70: 2339-2345.

Grande M.J, Lopez R.L, Abriouel H, Valdivia E, Ben Omar N, Maqueda M, Martínez-Canamero, Gálvez A, (2007b). Treatment of vegetable sauces with enterocin AS-48 alone or in combination with phenolic compounds to inhibit proliferation of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection* 70: 405-411.

Goudarzi M, Seyedjavadi S.S, Nasiri M.J, Goudarzi H, Sajadi Nia R, (2013). Antimicrobial activity of some novel synthesized pivaloyl esters. *Journal of Medical Microbiology* 62(11):1685-90

Guo N, Wu X, Yu L, Jinbo L, Rizeng M, Jing J, Huijun L, Xueling W, Shuhanyan, Xuming D, (2010). In vitro and in vivo interactions between fluconazole and allicin against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida albicans* determined by alternative methods. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 58: 193-201.

Horst Surburg y Johannes Panten (1985) Common Fragrance and Flavor Materials. 231-232

Mansilla, Marco Antonio Muñoz; Vásquez, Carlos Arturo Román; Rikardsen, Kjersti Steinsvoll; Fyrand, Kjetil; Busch, Bernd Wrege; Hjelstuen, Olaug (2012). Anti-sea lice compositions and their use. PCT Int. Patent WO2012/001668.

March Jerry, Smith Michael B, (2007). March's advanced organic chemistry reactions, mechanisms and structure. Sexta edición. Capítulo 11: 735-737.

Marchese A, Arciola C.R, Coppo E, Barbieri R, Barreca D, Chebaibi S, Sobarzo-Sánchez E, Nabavi S.F, Nabavi S.M, Daglia M, (2018). The natural plant compound carvacrol as an antimicrobial and anti-biofilm agent: mechanisms, synergies and bio-inspired anti-infective materials. *Biofouling* 34(6): 630-656.

Masyita A, Reka Mustika S, Ayun Dwi A, Budiman Y, Nur Rahma R, Talha Bin E, Firzan N, Simal-Gandara J, (2022). Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food Chemistry* 13: 2.

Mathur H, Beresford T.P, Cotter P.D, (2020). Health Benefits of Lactic Acid Bacteria (LAB) *Fermentates*. *Nutrients* 12(6):1679.

Murashige R, Hayashi Y, Ohmori S, Torii A, Aizu Y, Muto Y, Murai Y, Oda Y, Hashimoto M, (2011). Comparisons of O-acylation and Friedel–Crafts acylation of phenols and acyl chlorides and Fries rearrangement of phenyl esters in trifluoromethanesulfonic acid: effective synthesis of optically active homotyrosines *Tetrahedron* 67: 641-649.

Nazar C.J, (2007) Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello* 67: 61-62.

Jeffrey B. Harborne F.R.S, Herbert B, Gerard P.M, (1999). *Phytochemical Dictionary. A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*.

Lee S.J, Lim H.G, Han S.H, (2012). Antimicrobial activity of 1-(4-hydroxy-2-isopropyl-5-methylphenyl)-2-phenylethane-1,2-dione against bacteria and fungi. *International Journal of Antimicrobial Agents* 40(5): 456-459.

Ortega-Morente E, Hikmate A, Lucas-Lopez R, Ben Omar N, Gálvez A, (2010) Antibacterial activity of carvacrol and 2-nitro-1-propanol against single and mixed populations of foodborne pathogenic bacteria in corn flour dough. *Food Microbiology* 27: 274-278.

Ortega-Vidal J, Cobo A, Ortega-Morente E, Gálvez A, Martínez-Bailén M, Salido S, Altarejos J, (2022). Antimicrobial activity of phenolics isolated from the pruning wood

residue of European plum (*Prunus domestica* L.). *Industrial Crops and Products* 176: 1-7.

Ortega-Vidal J, Cobo A, Ortega-Morente E, Gálvez A, Alejo-Armijo A, Salido S, Altarejos J, (2021). Antimicrobial and antioxidant activities of flavonoids isolated from wood of sweet cherry tree (*Prunus avium* L.). *Journal of Wood Chemistry and Technology* 41: 104-117.

Puteri Tachrim Z, Wang L, Murai Y, Yoshida T, Kurokawa N, Ohashi F, Hashidoko Y, Hashimoto M, (2017). Trifluoromethanesulfonic Acid as Acylation Catalyst: Special Feature for C- and/or O-Acylation Reactions. *Catalysts* 7(40): 2-28.

Rinn W, (1970). Isobuttersäurethymylester – hauptbestandteil des ätherischen öles der rhizome und wurzeln von *arnica chamissonis*. *Planta Médica* 18(2): 147-9

Rosenmund K.W, Qué Chienchi (1928). Cetonas de carvacrol. *Archiv der Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft* 266: 407-11.

Rukayadi Y, Lee K, Lee M.S, Yong D, Hwang J.K, (2009). Synergistic anticandidal activity of xanthorrhizol in combination with ketoconazole or amphotericin. *FEMS Yeast Research* 9: 1302–1311.

Salehi B, Mishra A.P, Shukla I, Sharifi-Rad M, Contreras M.D.M, Segura-Carretero A, Fathi H, Nasrabadi N.N, Kobarfard F, Sharifi-Rad J, 2018. Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytotherapy Research* 32(9): 1688-1706.

Sharifi-Mehdi ,Varoni E.M ,Iriti M, Martorell M, Setzer W, Contreras M.D.M ,Bahare S,Soltani-Nejad A ,Sadegh Still W., Kahn M, Mitra A, (2018). Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *Journal of Organic Chemistry* 43: 2923-2925.

Suntres Z.E, Coccimiglio J, Alipour M, (2015). The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55(3): 304-18.

Wu J, Wu J, Hu X, Dai L, Li L, Zhao J, (2019). 1-(4-hydroxy-2-isopropyl-5-methylphenyl)-2-phenylethane-1,2-dione suppresses proliferation, migration, and

invasion and induces apoptosis in human non-small cell lung cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 120(10): 18131-18140.

Zhang Y, Li X, Wang Y, Liu Y, Zhang H, Ma L, (2021). Anti-biofilm activity of a novel synthesized hexanoic acid derivative against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology* 21(1): 1-11.

Zhou, Jiancheng (2016) Preparación de ésteres de carvacrol como aditivos para piensos. CN 105753696.

Zielinska-Błajet M, Przemysław P, Feder-Kubis J, (2021). Selected Monocyclic Monoterpenes and Their Derivatives as Effective Anticancer Therapeutic Agents. *International Journal of molecular sciences* 22: 1-3.

## 8. ANEXOS

### A) Espectros de carvacrol

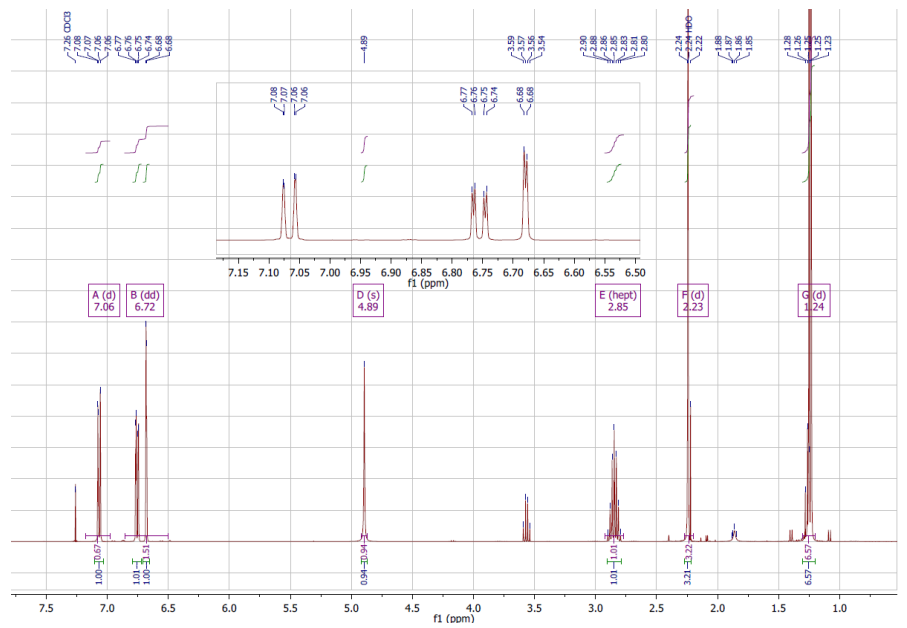
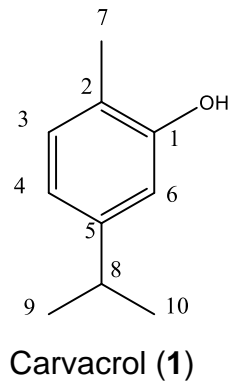


Figura 8.1 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del carvacrol (1)

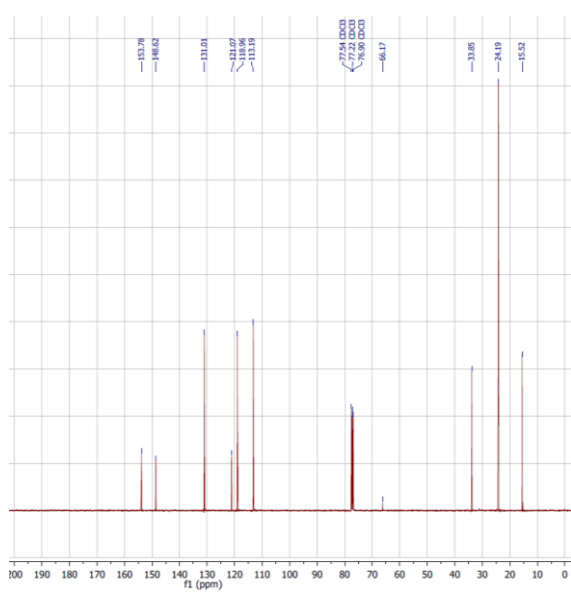


Figura 8.2 Espectro de  $^{13}\text{C}$  del derivado 1

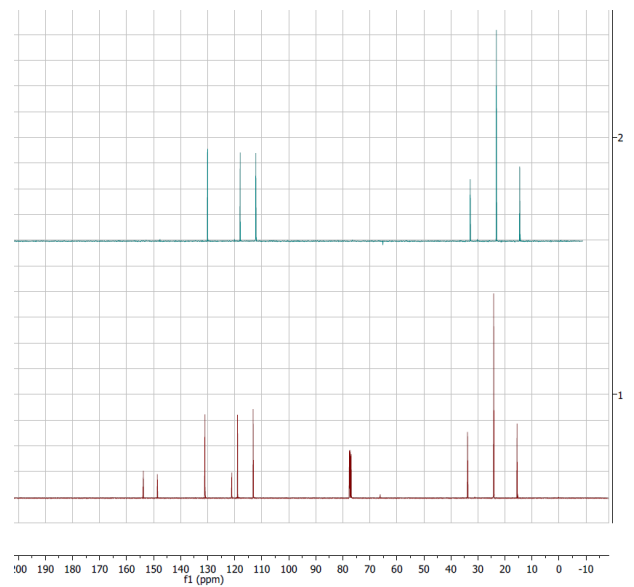


Figura 8.3 Comparación DEPT y  $^{13}\text{C}$

## B) Espectros de O-butanoilcarvacrol

Figura 8.4 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del O-butanoilcarvacrol (2)

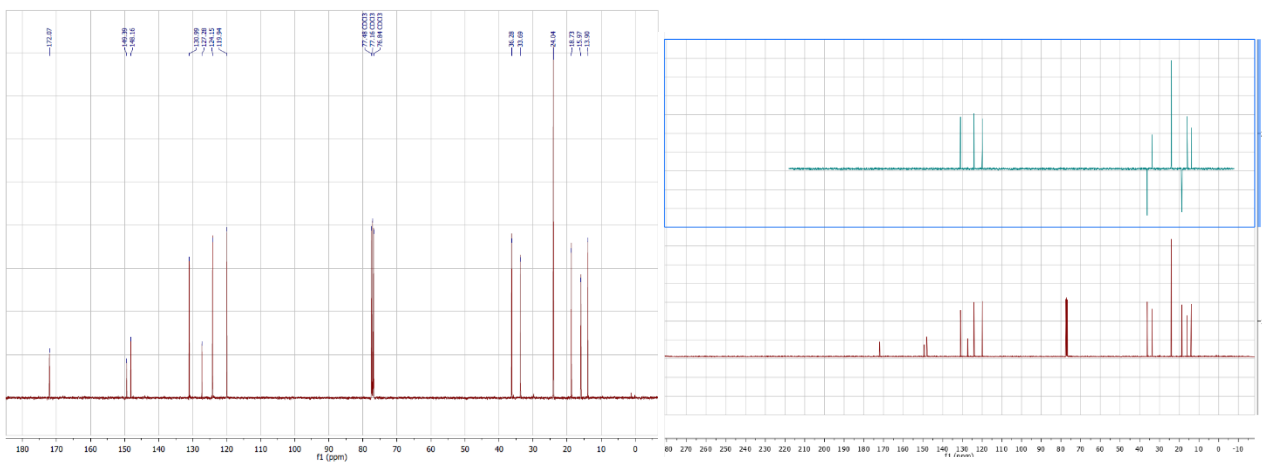
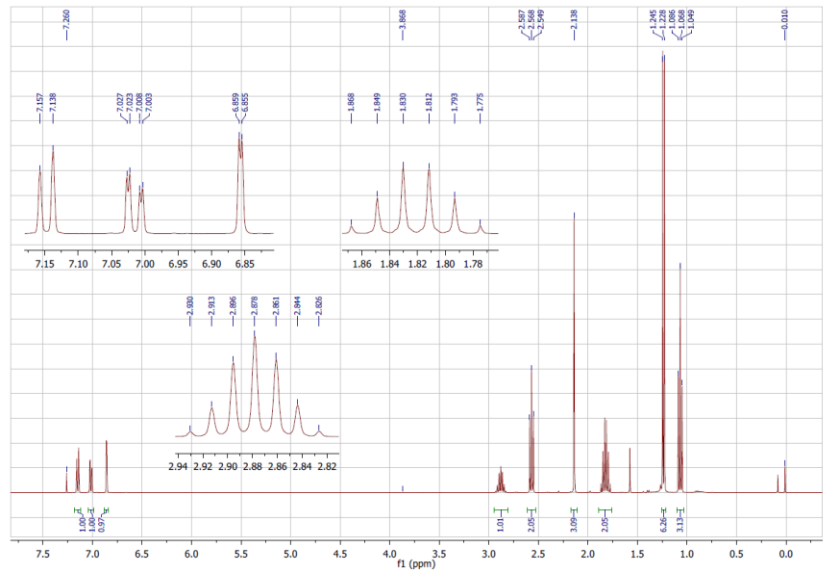
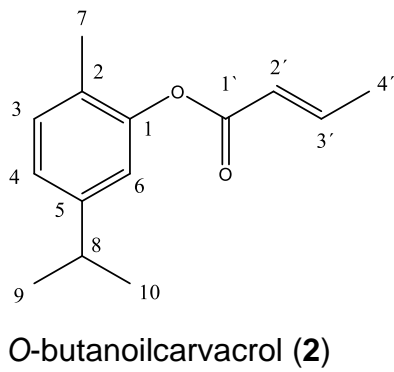


Figura 8.5 Espectro de  $^{13}\text{C}$  del derivado 2

Figura 8.6 Comparación DEPT y  $^{13}\text{C}$

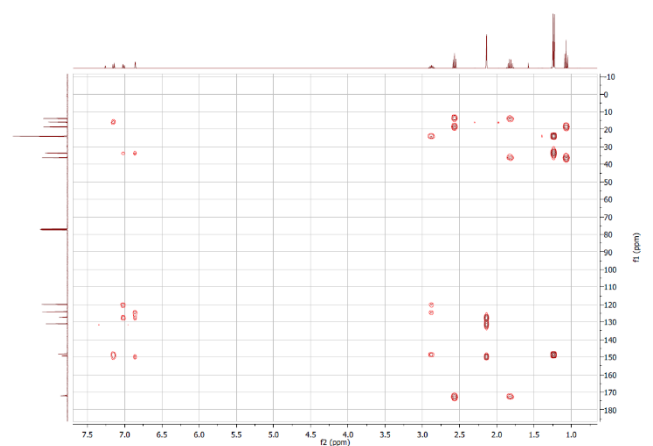
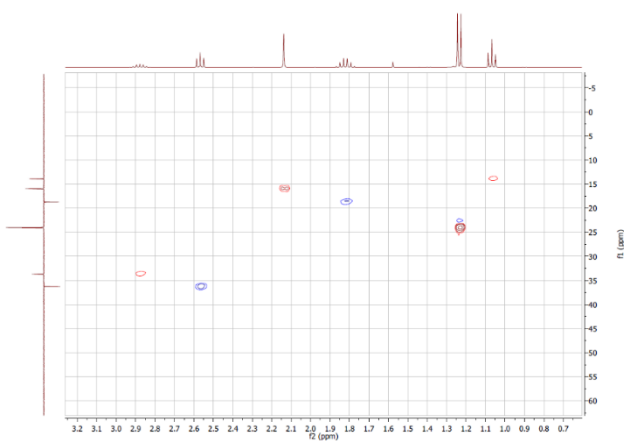


Figura 8.7 Espectro de HSQC del derivado 2

Figura 8.8 Espectro HMBC del derivado 2

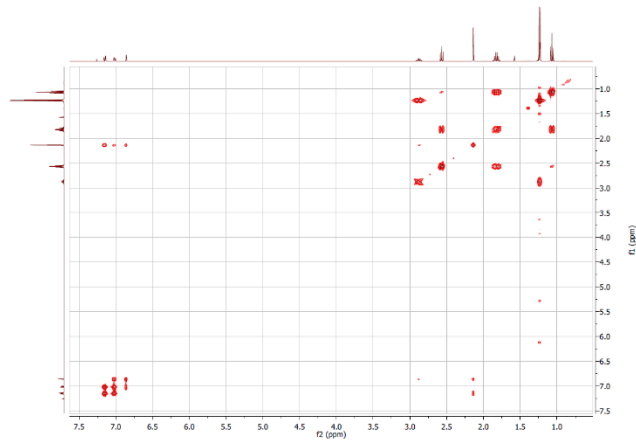
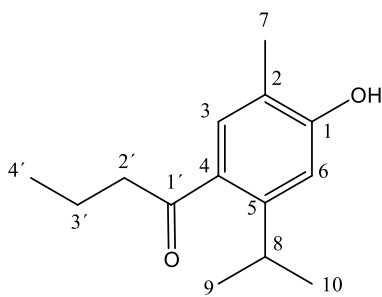


Figura 8.9 Espectro de COSY del derivado 2

### C) Espectros de C-Butanoil-carvacrol



C-Butanoil-carvacrol (3)

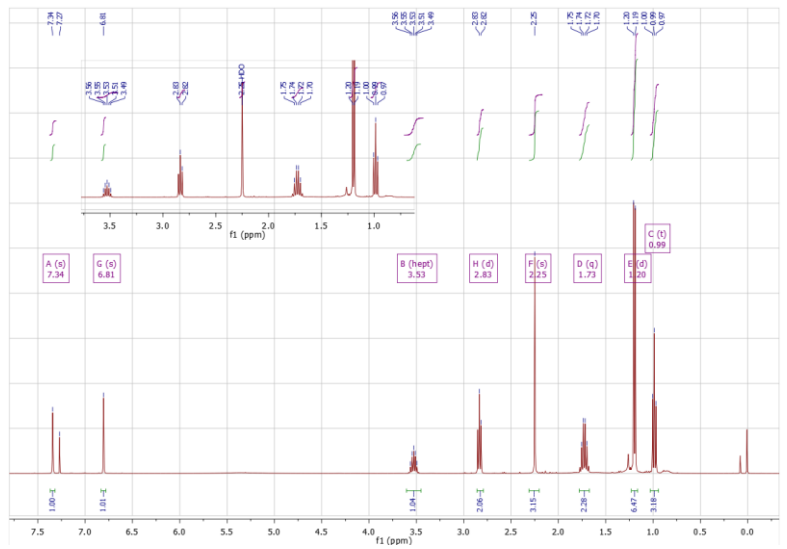


Figura 8.10 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del C-Butanoil-carvacrol (3)

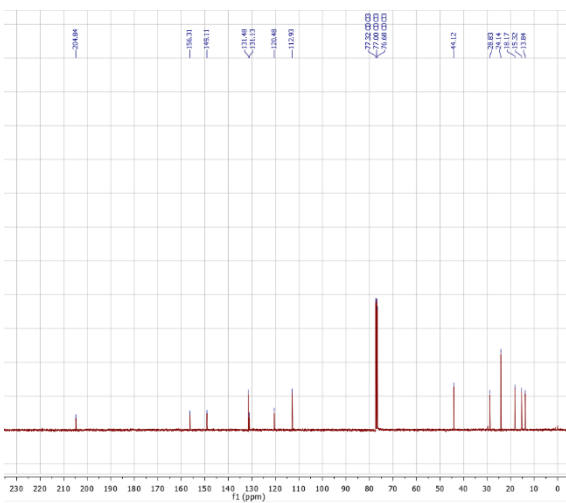


Figura 8.11 Espectro de  $^{13}\text{C}$  del derivado 3

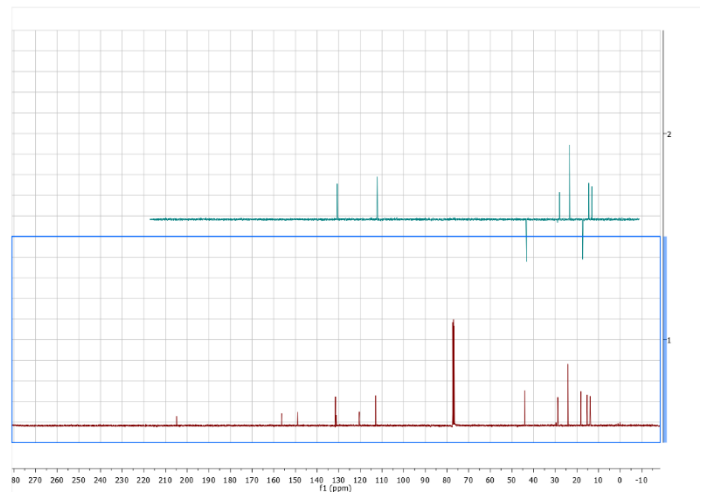


Figura 8.12 Comparación DEPT y  $^{13}\text{C}$



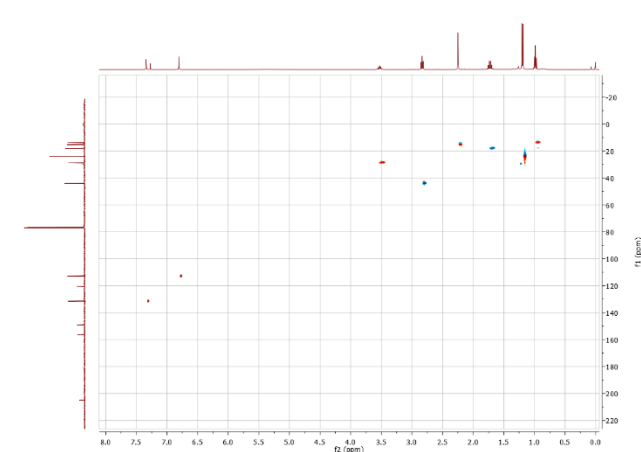


Figura 8.13 Espectro de HSQC del derivado **3**

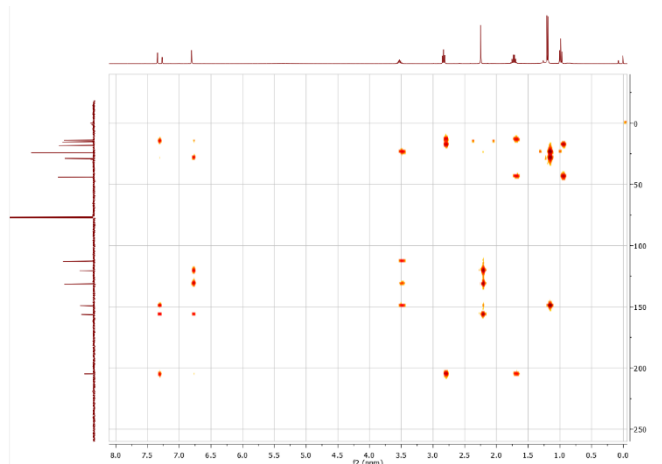


Figura 8.14 Espectro HMBC del derivado **3**

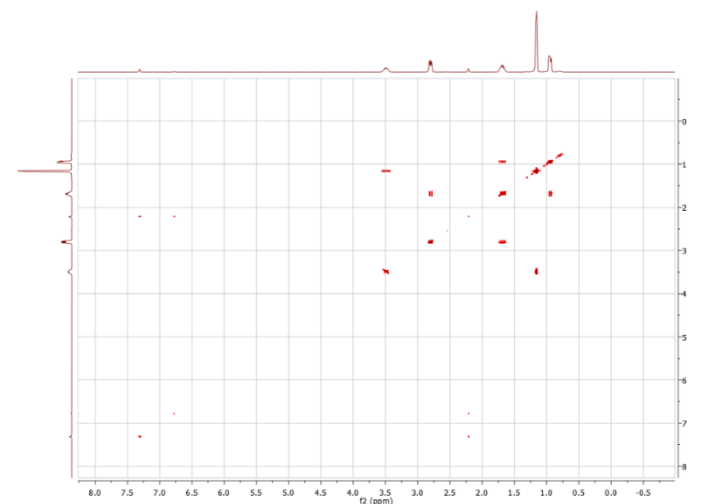
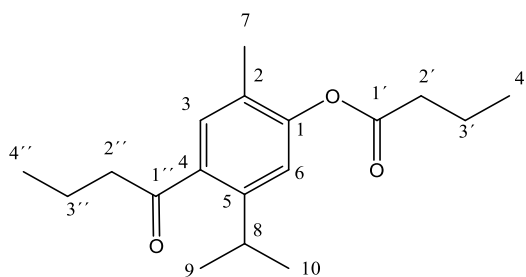


Figura 8.15 Espectro de COSY del derivado **3**

## D) Espectros de di-butanoil-carvacrol



Di-butanoil-carvacrol (**4**)

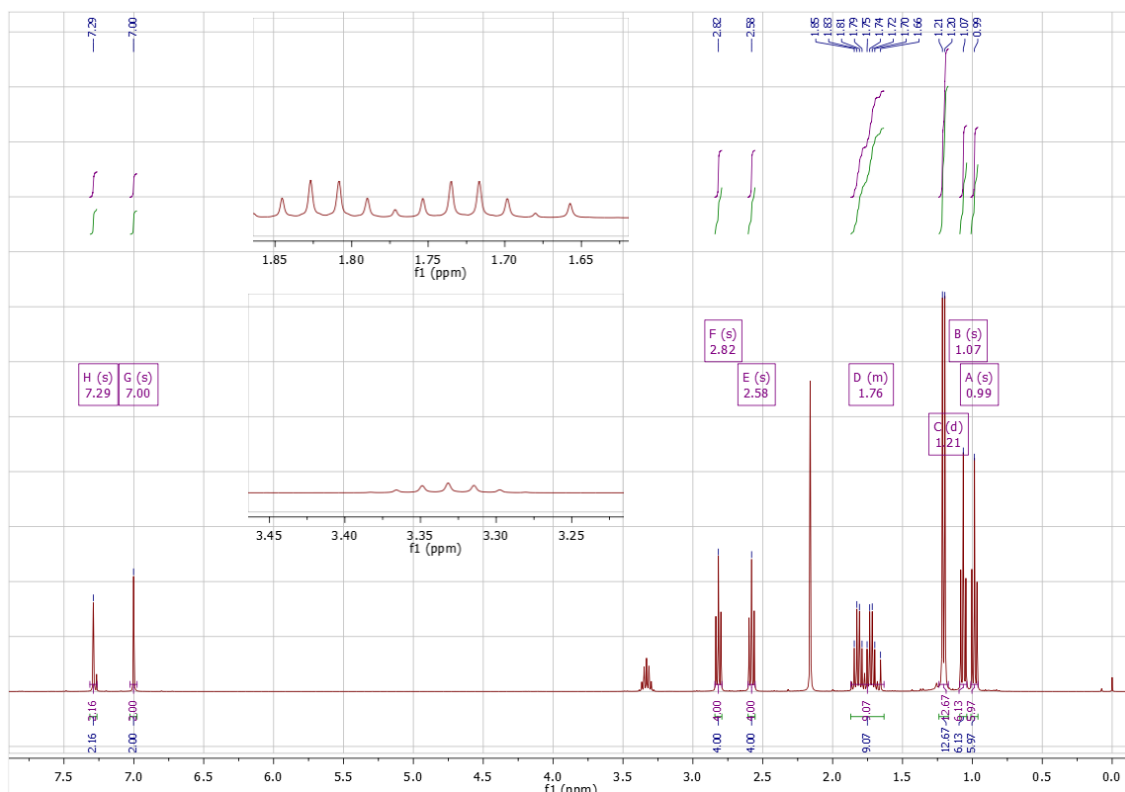


Figura 8.16 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del di-butanoil-carvacrol 4

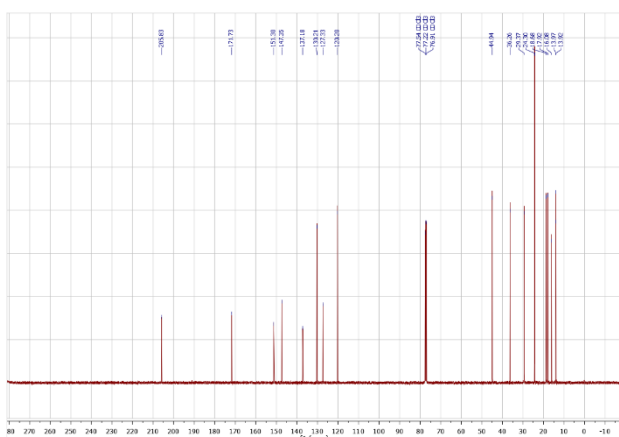


Figura 8.17 Espectro de  $^{13}\text{C}$  del derivado 4

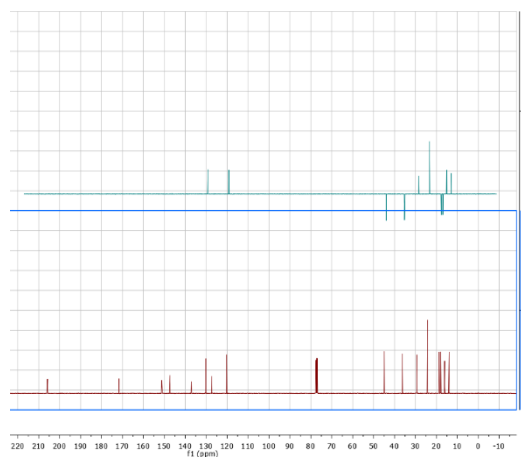


Figura 8.18 Comparación DEPT y  $^{13}\text{C}$

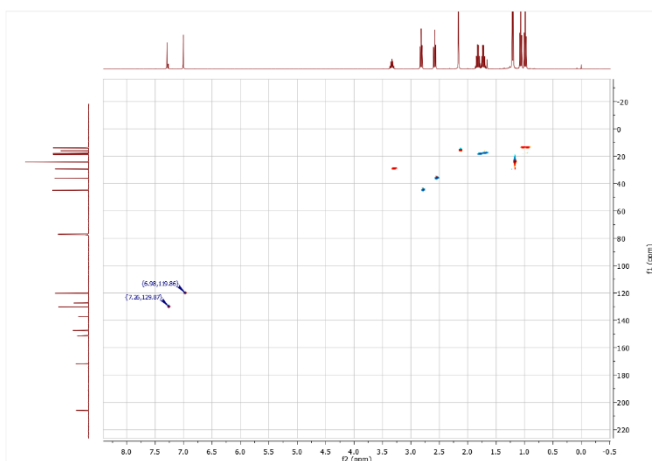


Figura 8.19 Espectro de HSQC del derivado 4

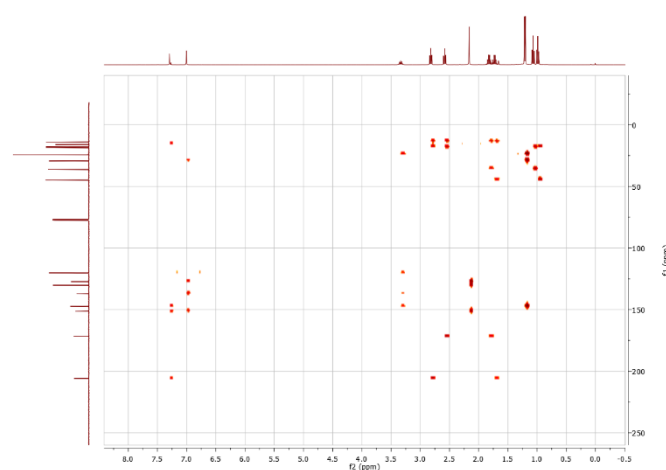


Figura 8.20 Espectro HMBC del derivado 4

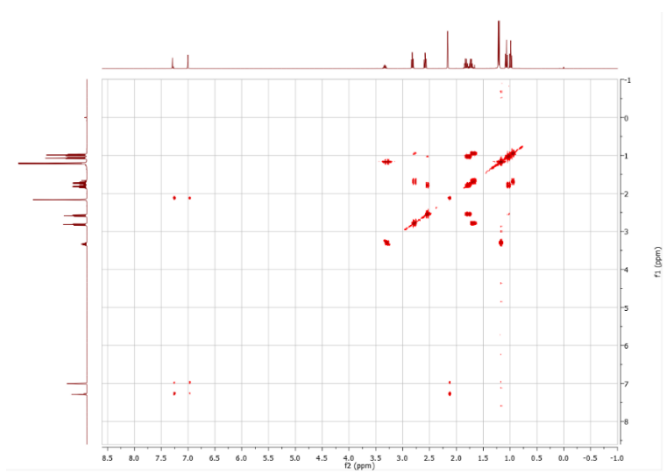


Figura 8.21 Espectro de COSY del derivado 4

### E) Cromatogramas del análisis en CG

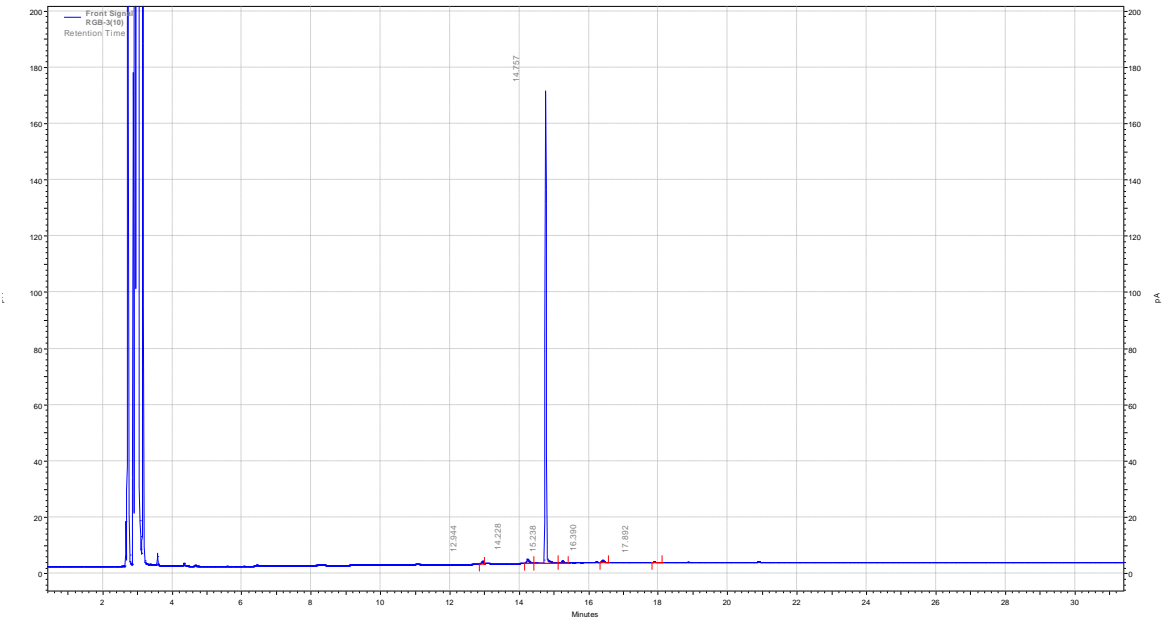


Figura 8.22 Cromatograma del derivado 2

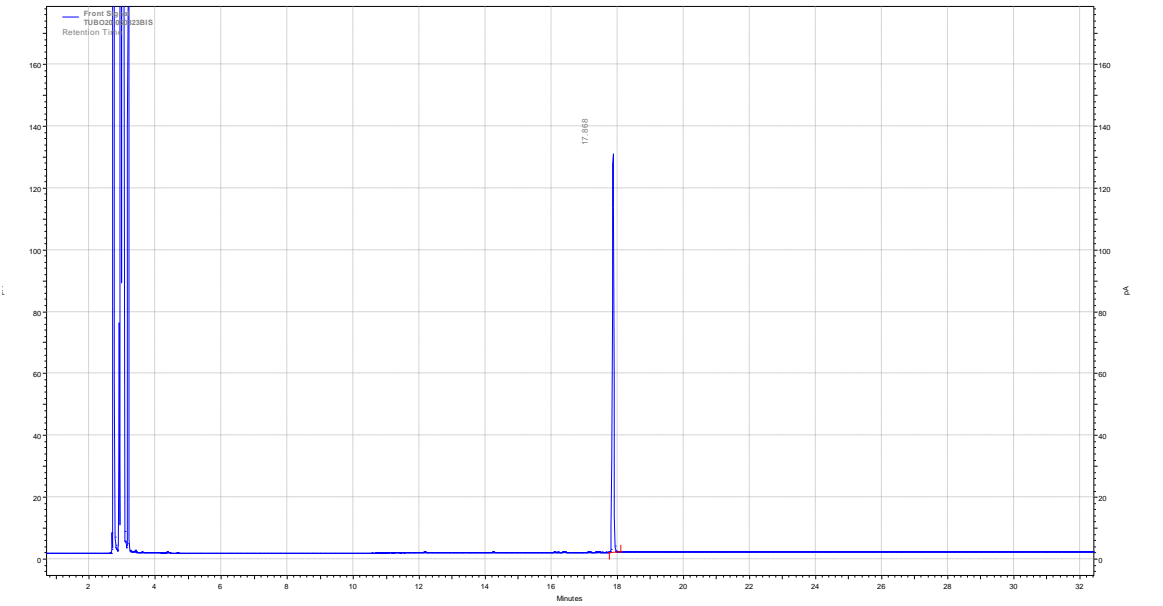


Figura 8.23 Cromatograma del derivado 3

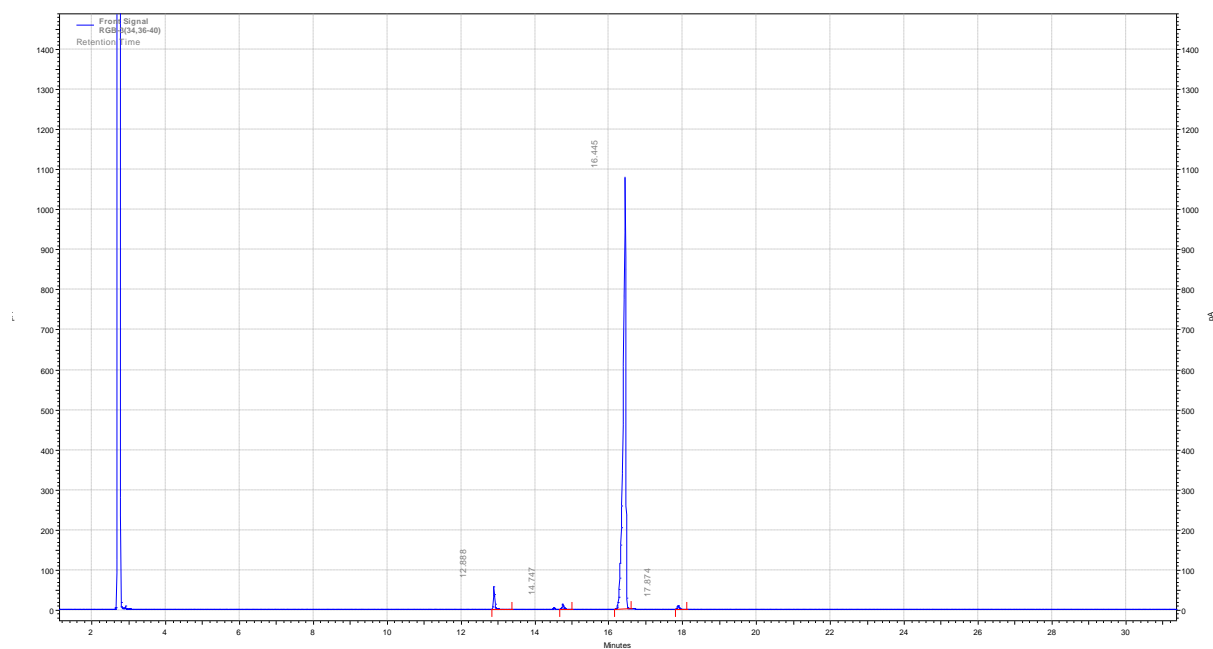


Figura 8.24 Cromatograma del derivado 4