

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Parasitología    Departamento de Farmacología

Actividad larvicida de aceites esenciales de plantas  
aromáticas y sus componentes principales frente a  
larvas L<sub>3</sub> de *Anisakis simplex* s.l.



H-8  
3  
34

*Ignacio Hierro Marín*  
*Granada, 2004*



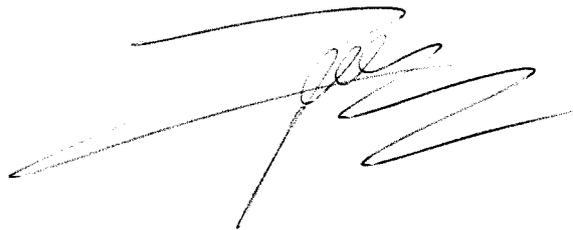


Encuadernación  
Impresión Digital  
Diseño Gráfico  
**Martín Arquiza**

Avda. de Madrid, 20 - Local 5  
Teléfono 958 27 85 99 - [caarquiza@worldonline.es](mailto:caarquiza@worldonline.es)  
18012 - GRANADA

ESPERO QUE ESTA EXPERIENCIA HAYA SIDO  
PARA TI CASI TAN EXCITANTE E INOLVIDABLE COMO  
PARA MI, SERA MUY DIFÍCIL OLVIDARME DE  
TODO LO QUE HEMOS PASADO JUNTOS, DE TU  
CARINO HACIA MI Y DE LOS CONOCIMIENTOS QUE,  
A TU VERA, HE IDO ADQUIRIENDO EN ESTOS CUATRO  
AÑOS.  
NUNCA SABEMOS LO QUE NOS DEPARA EL FUTURO,  
PERO EL TIEMPO PASADO JUNTO A TI ES ALGO QUE  
NO CAMBIO POR NADA. DESDE ~~EL~~ PRIMERO DIA QUE  
FUI A PEDIRTE CONSEJO HASTA LA FECHA. NUNCA ME  
HAS ABANDONADO, TODO LO CONTRARIO, ME HAS GUIADO  
SIEMPRE POR LA MEJOR DE LAS SENDAS POSIBLES.

MUCHAS GRACIAS DE CORAZÓN, ADELA



CIUDAD, 17 DE DICIEMBRE DE 2004

H-8  
3  
34

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Parasitología Departamento de Farmacología



Actividad larvicida de aceites esenciales de plantas  
aromáticas y sus componentes principales frente a  
larvas L<sub>3</sub> de *Anisakis simplex* s.l.

Memoria que presenta el Licenciado D. Ignacio Hierro  
Marín para aspirar al Grado de Doctor.

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA  
GRANADA

N.º DOCUMENTO 623068942  
N.º COPIA 123442372



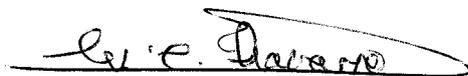
Granada, Diciembre de 2004.

BIBLIOTECA  
F. DE FARMACIA  
GRANADA



La Dra. M<sup>a</sup> Concepción Navarro Moll, Catedrático del Departamento de Farmacología, y la Dra. Adela Valero López, Profesora Titular del Departamento de Parasitología, de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, Directoras de la Tesis “Actividad larvicida de aceites esenciales de plantas aromáticas y sus componentes principales frente a larvas L<sub>3</sub> de *Anisakis simplex* s.l.”, de la que es autor D. Ignacio Hierro Marín;

AUTORIZAN la presentación de la referida Tesis para su defensa y mantenimiento de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 185/1985, de 23 de enero.



Fdo. M<sup>a</sup> Concepción Navarro Moll



Fdo. Adela Valero López

Granada, Diciembre de 2004.



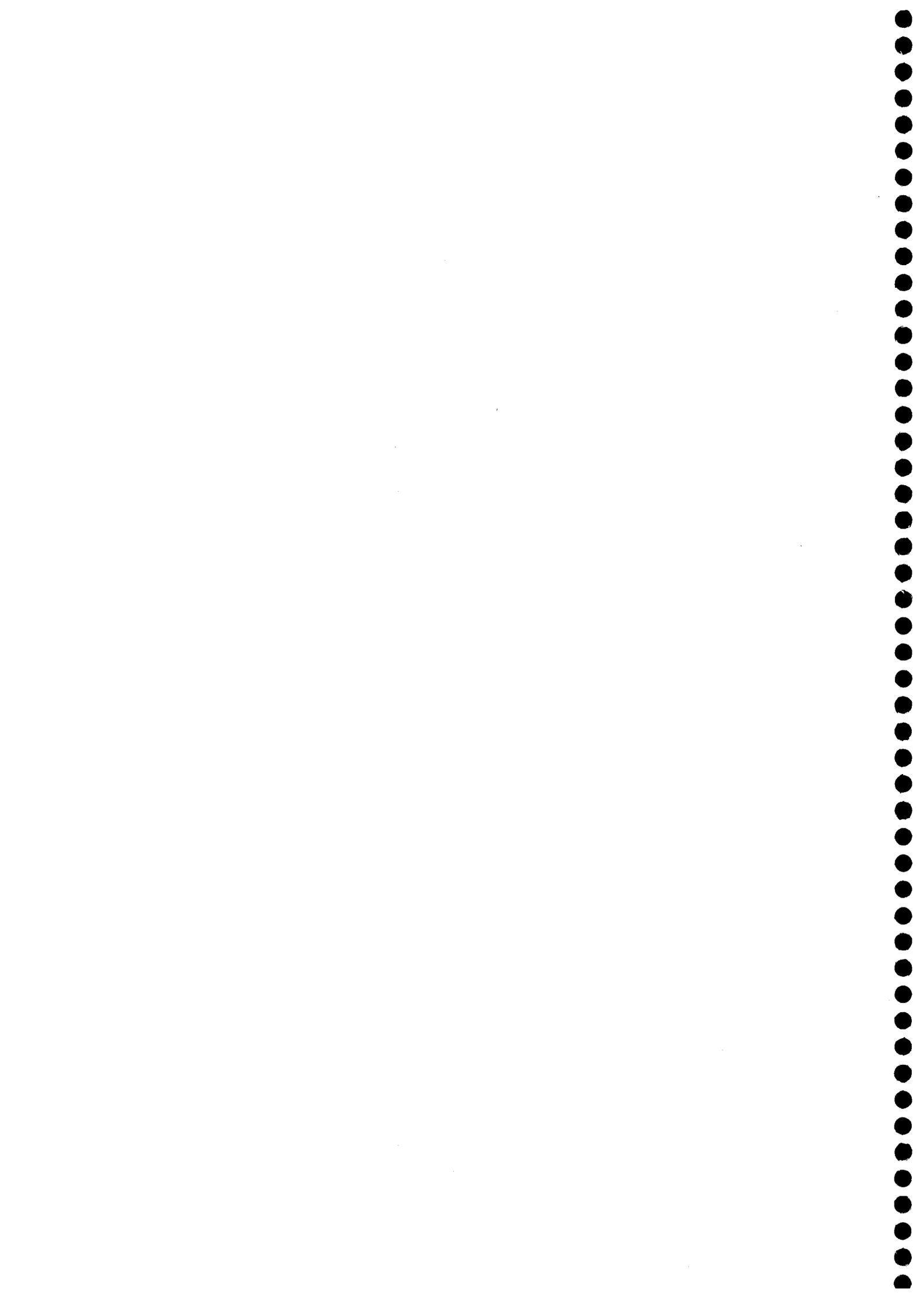
El Dr. Francisco Morillas Márquez, Profesor Titular y Director del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada;

AUTORIZA la presentación de la Tesis “Actividad larvicida de aceites esenciales de plantas aromáticas y sus componentes principales frente a larvas L<sub>3</sub> de *Anisakis simplex* s.l.”, de la que es autor D. Ignacio Hierro Marín, para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'F. Morillas', with a large, stylized flourish underneath.

Fdo. Francisco Morillas Márquez

Granada, Diciembre de 2004.



A María,  
la persona más importante de mi vida

A Lupe y Rafael,  
sin los cuales no sería quien soy



# AGRADECIMIENTOS



Ya falta menos:

Aún no soy del todo consciente de que al escribir estas líneas estoy cerrando un capítulo muy importante de mi vida que inicié hace poco más de cuatro años. En todo este tiempo han pasado tantas cosas que se me hace complicado acordarme de todo, pero si de algo estoy seguro, es de que me hubiese sido del todo imposible llegar a este momento sin la ayuda de una serie de personas que han estado junto a mí, y a las que les debo mucho.

De Adela y Concha he aprendido tanto, que no sé por donde empezar. Como docentes ya sabía que eran muy buenas, puesto que tuve la fortuna de ser alumno suyo en la licenciatura; pero es que como personas van más allá. La calidad humana que me han demostrado atesorar, junto con el trabajo (¡y cómo trabajan las dos!), la capacidad de sufrimiento, la constancia y el saber hacer, tanto en las situaciones de éxito como en las menos felices; me hacen decir que no he podido encontrar mejores tutores. Si yo he disfrutado tanto realizando esta Tesis y he aprendido tantísimo os lo debo, en gran parte, a vosotras.

A todos los que formamos el Departamento de Parasitología, sin excepción, os agradezco el buen ambiente que siempre ha reinado por los pasillos, imprescindible para desarrollar cualquier actividad, así como la colaboración y ayuda que, en determinadas situaciones, me habéis brindado sin ninguna condición. He de resaltar a Pili, compañera infatigable a la que le debo un cachitõ de esta Tesis; a José Antonio, que siempre estás disponible para todo; a Paco y Joaquì, por vuestras conversaciones tan interesantes; a David, por la compañía tan amena (¿te acuerdas cuando estábamos solos?); Alejandro y Cristina, aunque llegasteis más tarde, también os merecís estar aquí por ser tan buena gente. Marina, Marga, Pepa, Inma, Rocío, Javier, Víctor, Luis, Amparo, Santiago, Sheila, Sergio, Manolo, Patricia, y seguro que me dejo a alguien más por el camino (espero que me perdone); el aire tan sano que se respira en nuestro Departamento tiene mucho que ver con vosotros.

En el Departamento de Farmacología, a pesar de estar poco tiempo, tuve la suerte de encontrarme muy a gusto, y de conocer a gente que merece la pena de verdad, como Julio, Mercedes y, sobre todo, Desì, quien aportó su granito de arena a mi trabajo.

Yudi, desde un principio te brindaste a colaborar con nosotros, facilitando todo el trabajo. Tuya es también una parte.

Simonetta, con te tutto è più facile, dal inizio sempre mi hai aiutato tanto che non posso dimenticare il mio soggiorno a Roma. Angelo e Valeria, grazie mille!. Di voi tre è anche una piccola parte della mia Tesi.

Dánjal Petur, you have been so kind, that I need to mention it here.

Hay otro grupo de gente que a lo largo de mi vida ha estado siempre ahí, en las duras y en las maduras, por lo que es de ley que figuren en estas líneas por méritos propios. “A Dios lo que es de Dios y al César lo que es del César”.

Son tantos los recuerdos, hay tanto que decir; se me hace un nudo en la garganta cuando pienso que sin vosotros tres esta vida no tendría sentido. Joaquín, apoyo incondicional hasta el final (Anova incluida), las cosas se ven de otra forma cuando estás a mi lado. Raúl, amigo donde los haya, nunca me has dejado tirado (¡me ca... en Bill Gates!). Jesús, contigo me río hasta en el infierno, donde seguramente nos veremos (no me faltes, ¿eh?).

Carlos, son tantos años juntos (desde pábulos, ¿te acuerdas?) que siempre que miro atrás te veo. Eduardo, sé que te habría gustado estar más presente estos años. Pili y Raquel, esas pedazo de primas.

La verdad es que esta experiencia ha merecido mucho la pena, por lo que no me queda nada más que agradecer a todos los que la habéis hecho posible, de un modo u otro, vuestra ayuda, vuestro ánimo, vuestro cariño y, sobre todo, vuestra amistad. ¡Muchas Gracias!.

“Solo no puedo, con amigos sí”

# ÍNDICE



<b>ÍNDICE</b> .....	13
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	19
<b>A. ANISAKIOSIS</b> .....	21
A.1. Concepto.....	21
A.2. Clasificación de <i>Anisakis simplex</i> s.l. ....	22
A.3. Características morfológicas de las L <sub>3</sub> de <i>A. simplex</i> s.l. ....	23
A.4. Ciclo biológico de <i>A. simplex</i> s.l. ....	24
A.5. Epidemiología.....	25
A.6. Profilaxis.....	27
A.7. Patología.....	29
A.7.1. Anisakidosis gástrica.....	29
A.7.2. Anisakidosis intestinal.....	30
A.7.3. Anisakidosis extragastrointestinal.....	32
A.8. Diagnóstico.....	32
A.9. Tratamiento.....	34
<b>B. ACEITES ESENCIALES</b> .....	37
B.1. Concepto.....	37
B.2. Características.....	37
B.3. Extracción y normalización.....	38
B.4. Toxicidad.....	39
B.5. Acciones farmacológicas y aplicaciones.....	40
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	45
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	47
1. Material Biológico.....	49
1.1. Hospedador.....	49
1.2. Parásito.....	49

1.3. Aislamiento de los parásitos.....	50
1.4. Identificación morfológica de los parásitos.....	50
1.5. Identificación de larvas mediante electroforesis de isoenzimas.....	51
2. Productos Naturales Ensayados.....	54
2.1. Cromatografía de gases-espectroscopia de masas.....	55
2.2 Actividad antioxidante <i>in vitro</i> .....	56
3. Ensayos <i>In Vitro</i> .....	56
3.1. Material necesario.....	56
3.2. Axenización de los parásitos.....	57
3.3. Procedimiento.....	58
3.4. Incubación.....	58
3.5. Lectura.....	58
4. Técnicas Histológicas.....	59
4.1. Conservación de los parásitos.....	59
4.2. Deshidratación y fijación.....	59
4.3. Inclusión.....	60
4.4. Cortes histológicos.....	60
4.5. Desparafinado e hidratación.....	61
4.6. Tinción de hematoxilina-eosina.....	62
4.7. Tinción tricrómica de masson.....	62
5. Ensayos <i>In Vivo</i> .....	64
5.1. Material necesario.....	64
5.2. Dosis administrada.....	64
5.3. Procedimiento.....	65
6. Curva Dosis-Respuesta <i>In Vivo</i> .....	67
7. Medición de la Actividad Mieloperoxidasa (MPO) Tisular.....	68
7.1. Material necesario.....	68
7.2. Procedimiento.....	69
8. Métodos Estadísticos.....	70
8.1. Diseños experimentales.....	70
8.1.1. Diseño experimental del ensayo <i>in vitro</i> .....	70
8.1.2. Diseño experimental de los ensayos <i>in vivo</i> .....	70
8.1.3. Diseño experimental para el estudio de la curva dosis-respuesta.....	71

8.1.4. Diseño experimental de la actividad MPO tisular.....	71
8.2. Análisis estadístico de los diseños experimentales.....	71
APÉNDICE.....	73
Sistemas tampón y reactivos empleados en la electroforesis isoenzimática.....	75
Estructura química de los derivados ensayados.....	76
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>77</b>
1. Identificación de Larvas Mediante Electroforesis de Isoenzimas.....	79
2. Análisis de los Aceites Esenciales y de sus Principales Componentes.....	80
2.1 Cromatografía de gases-espectroscopia de masas.....	80
2.2 Actividad antioxidante <i>in vitro</i> .....	84
3. Ensayos <i>In Vitro</i> .....	85
3.1. Aceites esenciales.....	85
3.2. Componentes de los aceites esenciales.....	97
4. Estudio Histológico de las Larvas de <i>Anisakis simplex</i> s.l. de los Ensayos <i>In Vitro</i> ....	109
5. Ensayos <i>In Vivo</i> de los Componentes de los Aceites Esenciales.....	118
6. Estudio Histológico de las Larvas de <i>Anisakis simplex</i> s.l. de los Ensayos <i>In Vivo</i> ....	133
7. Curva Dosis-Respuesta <i>In Vivo</i> .....	139
8. Medición de la Actividad Mieloperoxidasa (MPO) Tisular.....	140
9. Análisis Estadístico.....	142
9.1. Análisis estadístico de los ensayos <i>in vitro</i> .....	142
9.1.1. Componentes de los aceites esenciales.....	142
9.1.2. Aceites esenciales.....	143
9.2. Análisis estadístico de los ensayos <i>in vivo</i> .....	144
9.2.1. Porcentaje de larvas muertas.....	144
9.2.2. Porcentaje de hemorragias.....	145
9.3. Análisis estadístico de la curva dosis-respuesta <i>in vivo</i> .....	145
9.4. Análisis estadístico de la actividad mieloperoxidasa (MPO) tisular.....	146

APÉNDICE.....	147
Cromatogramas de los aceites esenciales.....	149
Estudio comparativo de la actividad larvícida <i>in vitro</i> de los aceites esenciales y de sus componentes.....	153
Estudio histológico comparativo de L <sub>3</sub> de <i>A. simplex</i> s.l. ....	156
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>159</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>175</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>179</b>
<b>PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS.....</b>	<b>201</b>
1. Publicaciones.....	203
2. Comunicaciones a Congresos.....	203

# INTRODUCCIÓN



## A. ANISAKIOSIS

### A.1. Concepto

La anisakiosis es la afección parasitaria producida por larvas L<sub>3</sub> de nematodos del género *Anisakis* que el hombre adquiere por el consumo de pescado crudo o insuficientemente cocinado. Durante años, el término anisakiasis se utilizó para referirse a la enfermedad humana producida por nematodos de la familia Anisakidae. Más tarde, se cuestionó este término y Margolis (1977) sugirió llamar anisakiasis a la parasitación por larvas del género *Anisakis*, y anisakiasis inespecífica a la enfermedad producida por larvas de la familia Anisakidae. Posteriormente, Oshima y Kliks (1987) diferencian entre anisakiasis y pseudoterranovasis, en función del género al que pertenezca la larva, *Anisakis* o *Pseudoterranova*. Un año después, expertos nombrados por el "Comité Ejecutivo de la Asociación Mundial para el Avance de la Parasitología Veterinaria" (Executive Committee of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology) recomiendan la utilización de los términos anisakidosis para designar las parasitosis causadas por miembros de la familia Anisakidae y anisakiosis a la enfermedad producida por larvas del género *Anisakis*.

Los géneros de nematodos que producen la anisakidosis humana son: *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum* e *Hysterothylacium*; si bien este último parece estar implicado, sobre todo, en cuadros alérgicos. Dentro de ellos, las principales especies halladas en el hombre pertenecen al complejo *Anisakis simplex* s.l., y, en menor medida, *A. physeteris* y *Pseudoterranova decipiens*.

## A.2. Clasificación de *Anisakis simplex* s.l.

Las especies de nematodos pertenecientes al género *Anisakis*, [21 según Hartwich (1974)], se encuadran taxonómicamente, de acuerdo con Anderson (1992), de la siguiente forma:

Clase Nematoda

Subclase Secernentea

Orden Ascaridida

Superfamilia Ascaridioidea

Familia Anisakidae

Subfamilia Anisakinae

Género *Anisakis*

Berland (1961) reconocía dos tipos de larvas de *Anisakis* en función de sus caracteres morfológicos, correspondiendo la tipo I a *A. simplex* y la tipo II a *A. physeteris*. En cambio, Davey (1971) aceptaba solo tres especies válidas *A. simplex*, *A. typica* y *A. physeteris*, considerando catorce más como sinónimas, y las cuatro restantes como especies con escasas descripciones. Orecchia et al. (1986) demostraron la existencia, mediante electroforesis de isoenzimas, de dos especies gemelas dentro de *A. simplex* s.l., *A. pegreffii*, de localización principalmente mediterránea, y *A. simplex sensu stricto*, de localización principalmente noratlántica. Este mismo grupo de investigación (Mattiucci et al., 1997) halla, por el mismo procedimiento anterior, una nueva especie dentro del complejo *A. simplex*, localizada en el Pacífico norte y en regiones australes, *A. simplex* C. Un año después, Paggi et al. (1998) comunican el descubrimiento de una nueva especie, *A. ziphidarum*, aislada en ballenas del Mediterráneo y la costa africana. Posteriormente, Mattiucci et al. (2001) demuestran que *A. brevispiculata*, distribuida en las zonas sur y central del Océano Atlántico, es una especie aislada reproductivamente de *A. physeteris*, perteneciendo ambas morfológicamente al tipo II. Por último, Mattiucci et al. (2004) detectan dos nuevas especies; *Anisakis* sp. I en dos ballenas (*Mesoplodon mirus* y *M. densirostris*), las formas adultas, y en dos peces (*Merluccius merluccius* y *Aphanopus carbo*), las formas larvarias, del océano Atlántico sur y central; y *Anisakis* sp. II en dos ballenas (*Kogia*

*breviceps* y *K. simus*) del centro y sur del Atlántico (las formas adultas) y en merluza (*M. merluccius*) de la costa atlántica española (las formas larvarias), en simpatria con *A. brevispiculata* pero aisladas reproductivamente. Estos últimos autores, sugieren un nuevo género llamado *Skrjabinisakis* (Mozgovoï, 1951), donde se incluya *A. physeteris*, *A. brevispiculata* y *A. simplex* sp. II, y mantener en el género *Anisakis* (Dujardin, 1845) las especies *A. simplex* s.l. (*A. simplex* s.s., *A. pegreffii* y *A. simplex* C), *A. ziphidarum*, *A. typica* y *A. simplex* sp. I, atendiendo a su distinción genética y morfológica.

### A.3. Características morfológicas de las L<sub>3</sub> de *A. simplex* s.l.

Las larvas tienen un color blanco pálido, con una longitud entre 7 y 30 mm y un diámetro entre 0,24 y 0,60 mm. La cutícula tiene estriaciones transversales irregulares y poco profundas distribuidas por todo el cuerpo, entre las que se observan estriaciones longitudinales paralelas. La estriación transversal es más patente en las proximidades de los extremos de la larva (Weerasooriya et al., 1986). En el extremo anterior se encuentra un diente triangular, la boca triangular con tres labios, uno dorsal bilobulado y dos subventrales monolobulados, y el poro excretor entre las bases de los labios subventrales, cuya célula excretora se observa desde el extremo anterior del nematodo hasta la porción de intestino próxima al ventrículo (Grabda, 1976).

En el interior de la larva y próximo al extremo anterior, se observa un esófago de entre 2,50 y 3 mm de longitud, dotado de una glándula dorsal y dos glándulas subventrales (Buzzell y Sommerville, 1985). El esófago se divide en tres zonas. La primera, esófago preventricular, internamente dividida en tres sectores por células musculares radiales y donde la glándula dorsal se abre a la luz del esófago por un conducto secretor a la altura del anillo nervioso. La siguiente, la zona de transición, es donde las glándulas subventrales se abren a la luz esofágica. Por último, el ventrículo, donde la glándula dorsal se expande rodeando el lumen y la subventral se encuentra alrededor de la dorsal, abrazándola y ocupando casi todo el espacio esofágico.

A continuación del esófago está el intestino, que se extiende hasta el extremo final del parásito. El plano de unión entre el ventrículo y el intestino es oblicuo, y no se aprecia ni apéndice ventricular ni ciego intestinal. El extremo posterior es cónico y termina en un mucrón, con el recto formando un canal oblicuo que desemboca en el ano

situado en posición ventral y rodeado de tres glándulas anales, una ventral y dos dorsales.

#### **A.4. Ciclo biológico de *A. simplex* s.l.**

El ciclo biológico de estos parásitos según Koie et al. (1995), comienza en el interior de grandes mamíferos marinos como los cetáceos (ballenas, cachalotes, delfines) y a veces los pinnípedos (focas, leones marinos). En el tracto digestivo las hembras adultas depositan los huevos que se expulsan al mar junto con las heces del hospedador.

Estos huevos pueden sobrevivir un tiempo variable en el mar en función de la temperatura del agua (Hojgaard, 1998). En su interior tienen lugar dos mudas, llegando a eclosionar a los 20-27 días de la puesta, a una temperatura ambiente de entre 5 y 7°C (Cocheton et al., 1991). En estas condiciones se libera una larva tipo 3 aún envuelta por la cutícula de la L<sub>2</sub>.

Dicha L<sub>3</sub> puede permanecer libre en el mar de 6 a 7 semanas entre 5 y 7°C (Banning, 1971), hasta que es ingerida por crustáceos, principalmente eufausidos, presentes en el plancton marino.

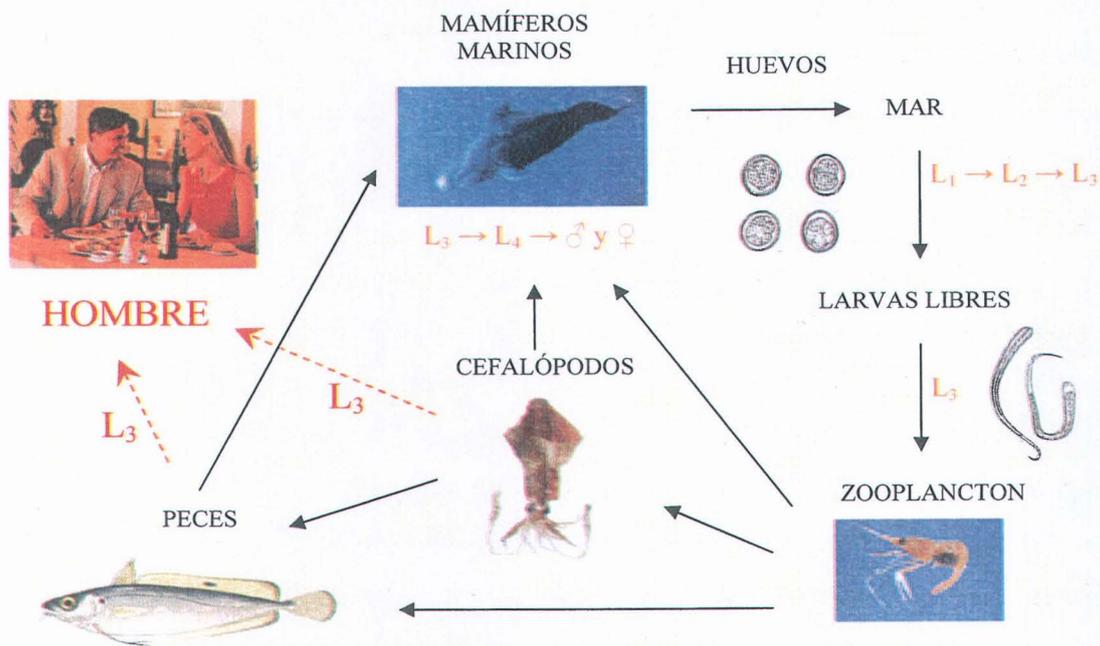
El tercer estadio larvario es infectivo para el hospedador definitivo, ya que el plancton forma parte de su dieta diaria, llegando a ingerir varias toneladas al día.

Puede ocurrir que otros peces y cefalópodos se alimenten de zooplancton infectado con L<sub>3</sub>. En este caso, las larvas quedan libres en el estómago de estos hospedadores, atraviesan la pared del tracto digestivo y se encapsulan en las vísceras e incluso en la musculatura, sin sufrir ninguna muda. Los peces o cefalópodos infectados con L<sub>3</sub> de *Anisakis* los pueden ingerir otros peces o cefalópodos de mayor tamaño, y pasan a las vísceras y musculatura por el mismo procedimiento, pudiendo tener lugar un fenómeno de acumulación de parásitos en estos predadores.

El ciclo se cierra al llegar las L<sub>3</sub> al interior de los hospedadores definitivos, bien a través del zooplancton, bien a través de peces y cefalópodos. Las L<sub>3</sub> sufren dos mudas y alcanzan la madurez sexual.

El hombre entra en el ciclo como hospedador accidental, al consumir pescado o calamares crudos o insuficientemente cocinados que portan en su interior L<sub>3</sub> de *Anisakis* (Figura 1).

Figura 1. Ciclo biológico de *Anisakis simplex* s.l.



#### A.5. Epidemiología

La distribución de las larvas de *A. simplex* s.l. es muy amplia ya que se han encontrado en un alto número de hospedadores, tales como calamares, peces y mamíferos marinos, de prácticamente todos los mares y océanos. Algunos autores cifran en más de 200 el número de peces donde se han hallado sus larvas (Smith y Wootten, 1978; Hojgaard, 1998). La especie *A. simplex* s.s. se ha hallado entre el paralelo 30° N y el círculo polar ártico, en el Atlántico y el Pacífico; *A. pegreffii* en el Mediterráneo y en la región austral, entre los paralelos 35° S y 55° S, desde el Atlántico sur hasta Gibraltar y el Pacífico; y *A. simplex* C en el Pacífico septentrional, el Atlántico meridional y la región austral (Mattiucci et al., 1997).

La localización de las larvas en el interior de los peces hospedadores es muy amplia, dependiendo en muchos casos de una serie de factores: especie de hospedador, alimentación, grado de infestación, edad y almacenamiento después de su captura.

El primer caso mundial diagnosticado en el hombre, fue en Holanda en 1955 (Van Thiel et al., 1960), donde se halló una larva de *Anisakis* en la pared intestinal de un paciente que había comido arenques crudos. Ellos identifican la larva de un nematodo como *Eustoma rotundatum*. Posteriormente, VanThiel (1962) le da el nombre de *Anisakis*.

En Japón Asami et al. (1965) son los primeros en identificar larvas del tipo *Anisakis*, idénticas a las comunicadas por Van Thiel et al. (1960 y 1962), como causantes de dos casos de granuloma estomacal.

Desde entonces, son numerosos los casos comunicados y/o citados de anisakidosis humana en el mundo. Cabe destacar el alto número de casos que se dan en Japón, aunque dependiendo de los autores consultados oscila entre 1000 y 2000 al año (Nakata et al., 1980; Matsui et al., 1985; Kasuya et al., 1989; Minamoto et al., 1991; Shirama et al., 1992; Matsumoto et al., 1992; Ishikura et al., 1992; Kagei et al., 1995). Esto se debe a las costumbres culinarias de este país, con una importante presencia en su dieta de pescado crudo o poco cocinado, así como a la preparación del personal sanitario, bastante más habituado a reconocer los síntomas de la anisakidosis y a usar métodos de diagnóstico específicos (gastroscopio). Tanto es así, que ya en 1965 se forma el primer "Grupo de Investigación del Granuloma Parasitario" (Research Group on Parasitic Granuloma) (Smith y Wootten, 1978).

Uno de los países europeos que ha tenido mayor incidencia de anisakidosis ha sido Holanda, donde es frecuente comer pescado crudo, especialmente arenques. Según Hubert et al. (1989) antes del año 1965 se daban hasta 300 casos anuales. A partir de entonces el número de casos disminuyó, citando 292 casos hasta 1992 (Ishikura et al., 1992). Como consecuencia de los estudios realizados en 1968 por el "Comité de *Anisakis*" (*Anisakis* Committee) (Smith y Wootten, 1978), el gobierno holandés obligó a congelar los arenques a -20°C antes de 12 horas después de su captura, y almacenarlos 24 horas a esa temperatura antes de su consumo crudo, y para el marinado, los arenques debían permanecer en un baño a pH 4,0 y a una concentración de NaCl superior al 6,5 % durante 30 días. Por último, si estaban destinados al ahumado, se sometían a una

temperatura de 50°C durante el proceso (Oshima, 1972). Estas medidas redujeron el número de casos de 46 en 1967 a sólo 5 en 1968 (Ruitenbergh et al., 1971).

En otros países, el número de casos ha ido aumentando en los últimos 20 años: en Bélgica (Smith y Wootten, 1978; Verhamme y Ramboer, 1988), Francia (Smith y Wootten, 1978; Goldfain y Potet, 1984; Petithory y Marty, 1988; Hubert et al., 1989; De Montigni, 1991; Ishikura et al., 1992; Viu et al., 1996), Estados Unidos (Smith y Wootten, 1978; Matsui et al., 1985; Deardorff et al., 1986; Desowitz, 1986; Kwee y Sautter, 1987; Ishikura et al., 1992), Inglaterra (Ishikura et al., 1992; Moore et al., 2002), Dinamarca y Korea (Smith y Wootten, 1978; Ishikura et al., 1992), norte de Europa (Olson et al., 1983), y otros países como Alemania, Noruega, Polonia, Chile, Canadá, Suecia, Brasil, Israel, Italia, Nueva Zelanda, Samoa, Taiwan y Tahití (Ishikura et al., 1992). A este hecho ha contribuido la mejor formación de los profesionales sanitarios, el diagnóstico más preciso y los gustos culinarios importados de Oriente, especialmente de Japón, y de otros países escandinavos o latinoamericanos. Los platos preparados con pescado crudo (sushi, sashimi, izushi, sunomomo, cebiche, etc.), especiados o no, así como los marinados, ahumados, etc., incrementan el riesgo de padecer la enfermedad.

En España, desde que se publicó el primer caso en Valladolid por Arenal Vera et al. (1991), el número de casos denunciados ha ido en aumento (López Vélez et al., 1992; Valero et al., 1992; Clavel et al., 1993; Daschner et al., 1997; Del Olmo Escribano et al., 1998; Gómez et al., 1998; Rosales et al., 1999; Cusí et al., 1999; Oliveira et al., 1999; López Peñas et al., 2000; Martínez Ubeira et al., 2000; entre otros). En nuestro país, la principal fuente de riesgo la constituyen los apreciados boquerones en vinagre, plato muy expandido por toda la geografía española (Del Rey, 2003).

#### **A.6. Profilaxis**

Prácticamente, desde que se diagnosticaron los primeros casos de anisakidosis en el mundo, se han propuesto diferentes medidas profilácticas por parte de los gobiernos, industrias pesqueras, pescadores y consumidores para evitar que sigan aumentando los casos de anisakidosis humana.

Oshima (1972) indica la irradiación del pescado (con resultados negativos sobre sus caracteres organolépticos) y el eviscerado del mismo, inmediatamente después de su captura, si bien esta práctica no afecta a las larvas presentes en la musculatura y puede propagar la parasitación de la zona si las vísceras se arrojan al mar sin congelación previa. El mismo autor propone, por una parte, una mejor educación en Salud Pública con programas que enseñen a no comer crudos aquellos peces con mayor índice de parasitación y, por otra, la preparación del pescado calentándolo a más de 60°C o congelándolo a -20°C en un tiempo inferior a 12 horas desde su captura, y almacenarlo durante 24 horas o más a esa temperatura.

Otras medidas de prevención de la infección accidental con *Anisakis* citadas por Smith y Wootten (1978) son: el “transparentado” (candling) de los filetes de pescado en las industrias para ver si tiene larvas, esta medida es ineficaz en pescados de carne oscura; el fileteado del pescado al que se le ha quitado la musculatura hipoaxial, que es donde se concentra un mayor número de larvas, el inconveniente es que en el producto final sigue habiendo larvas; la congelación de los desechos de la pesca antes de tirarlos al mar o alimentar peces de piscifactoría con vísceras parasitadas para evitar la transmisión de las larvas.

La Unión Europea, mediante la Directiva 91/493/CEE de 22 de julio de 1991, relativa a la salubridad de los productos de la pesca, junto con la Resolución de 21 de diciembre de 1992 para su aplicación, fija las normas sanitarias aplicables a la pesca y a la puesta en el mercado de los productos pesqueros. En concreto, indica que la salubridad de los pescados y productos a partir de pescado destinados al consumo sin ulterior transformación, está garantizada por la obligatoriedad de su congelación a -20°C durante 24 horas. Hace especial hincapié en arenques, caballas, espadines y salmones salvajes del Atlántico y del Pacífico. De esta manera, la mayoría de los productos que están destinados a su consumo en salazón, marinado, ahumado o crudo, se deberán congelar (Angot y Brasseur, 1995).

En España, el Real Decreto 1437/1992, de 27 de noviembre (BOE del 13 de enero de 1993), fija las normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de los productos pesqueros y de la agricultura, basado en la legislación europea referida.

En definitiva, las únicas medidas realmente eficaces para acabar con las larvas presentes en el pescado, y además recomendadas por la OMS, son el calentamiento a más de 60°C durante algunos minutos en función del grosor de la pieza (para 30 mm 7

minutos a 70°C o 20 minutos a 60°C), y la congelación a -20°C, seguida del almacenado del pescado a esa Tª al menos 24 horas.

## A.7. Patología

La clasificación patológica de la enfermedad según Ishikura et al. (1992) es la siguiente: anisakidosis gástrica, intestinal y extragastrointestinal. Las dos primeras pueden adoptar la forma aguda o fulminante y la forma crónica o suave.

La mayoría de los casos de anisakidosis humana se dan en estómago y en íleo por el efecto barrera que frente a las larvas hacen tanto el píloro como la válvula de Bauhin, respectivamente, concentrándose en dichas zonas un mayor número de larvas (Ishikura et al., 1992).

### A.7.1. Anisakidosis gástrica

La forma aguda se da a las 4 o 6 horas de haber ingerido pescado crudo o poco cocinado, apareciendo dolores estomacales, náuseas y vómitos. Muchos de estos casos evolucionan a la forma crónica por no diagnosticarse correctamente, prolongándose los síntomas durante varias semanas e incluso 1 o 2 años. En más de la mitad de los casos se observa eosinofilia, acompañada de una nula o ligera leucocitosis (Oshima 1972), y también más del 60 % de los pacientes presenta hipoacididad gástrica, lo que según Asami e Inoshita (1967) estimula la penetrabilidad de la larva en la pared gástrica.

En la anisakidosis gástrica aguda, con el gastroscopio se observa la larva intacta penetrando en la pared gástrica del paciente. Dicha pared, se encuentra inflamada con un edema extensivo, erosión, sangrado y exudado fibroso, junto a una eosinofilia con infiltración masiva de neutrófilos, macrófagos y linfocitos. Esta reacción se denominó "respuesta a un cuerpo extraño" (Kozima et al., 1966; Oshima, 1972). A veces la larva se encuentra en el lumen gástrico, y otras veces se ven puntos erosivos en la pared producidos por el nomadismo de una larva o más.

Los investigadores japoneses (Kozima et al., 1966; Oshima, 1972; Ishikura et al. 1992) clasifican las lesiones gastrointestinales por anisakidosis en cinco tipos o fases. La primera sería la descrita para el caso de la anisakidosis gástrica aguda, y las

siguientes se darían de manera consecutiva en la anisakidosis gástrica crónica, la cual se suele confundir con cáncer estomacal o úlcera gástrica.

La de tipo flegmonosa es la primera etapa de una lesión crónica, y se produce a la semana de la infección. Una reinfección con otra larva induciría una reacción inmunológica. La apariencia histológica es casi idéntica a la de una anisakidosis aguda. También se le llama “reacción de tipo Arthus”, y es más frecuente en parasitosis intestinales.

La segunda etapa, tipo absceso, se caracteriza por un marcado absceso en la submucosa con numerosos eosinófilos, neutrófilos, macrófagos y linfocitos, localizado alrededor de la larva. El absceso está a su vez rodeado de tejido granulomatoso, con necrosis, hemorragia y exudado fibrinoso en las capas más internas del granuloma. La cutícula de la larva, en el centro de la lesión comienza a degradarse y existe infiltración de eosinófilos en la propia larva. Esta reacción está causada por una respuesta inmunológica ante antígenos de las larvas de *Anisakis* por reinfección, especialmente de excreción-secreción, también llamada “reacción de exacervación” (Kozima et al, 1966).

El tipo absceso-granuloma es la tercera, se da a los 6 meses o más de la infección. El absceso se reduce y los restos de la larva se encuentran en el centro del mismo, rodeado por tejido granulomatoso. La reacción celular es menos intensa y la larva está invadida por eosinófilos, lo que a veces dificulta su reconocimiento. En esta fase la infiltración y proliferación linfocítica predomina sobre la eosinofílica.

Tipo granuloma, cuarta y última etapa, es un estado avanzado de la anterior. El absceso se reemplaza por tejido granulomatoso con infiltración de células gigantes, linfocitos y en menor medida eosinófilos, y los restos de la larva apenas se ven en el centro de la lesión. El grado de destrucción de la larva depende del tiempo que haya transcurrido desde la infección, con lo que puede servir de ayuda para calcular el tiempo de duración de la enfermedad. Este tipo de lesión, se observa pocas veces y se debe a un diagnóstico tardío de un caso de anisakidosis crónica o suave.

#### A.7.2. Anisakidosis intestinal

De acuerdo con los datos aportados por Ishikura (1990) y Matsui et al. (1985), la forma aguda tiene lugar a los siete días de la ingestión del pescado crudo o poco

cocinado, con fuertes dolores en el bajo abdomen, náuseas, vómitos, mareos, diarreas y sangre en las heces. El dolor es difuso y no localizado, lo que diferencia esta dolencia de una apendicitis. En este caso es rara la eosinofilia, pero se observa una marcada leucocitosis. La región afectada del intestino delgado, normalmente el íleo terminal, está cubierta por un exudado fibroso y presenta un engrosamiento edematoso (de 3 a 5 veces el tamaño normal), debido a un intenso edema (con proliferación de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos y linfocitos) por lo que se produce obstrucción parcial y distensión proximal del intestino. La zona de penetración de la larva presenta necrosis e infiltración celular. La mayoría de las veces la zona lesionada se retira mediante intervención quirúrgica por un diagnóstico erróneo de íleo paralítico. Los avances en las técnicas de radiología e inmunología hacen posible el diagnóstico de la anisakidosis aguda intestinal sin necesidad de cirugía, aunque el definitivo sólo se da al identificar la larva en la muestra retirada al paciente por cirugía, algo que no siempre se logra.

La anisakidosis intestinal crónica o suave produce leves síntomas, hallándose muchos casos por casualidad al practicar una laparatomía al paciente por otros motivos. Se consideran casos de infección primaria en los que la larva produce un estrechamiento de la luz intestinal, causando síntomas abdominales crónicos, por lo que se confunde con un tumor. Si el parásito logra penetrar y alcanzar la cavidad abdominal del paciente los síntomas se suavizan y se absorben poco a poco, con lo que el paciente queda sensibilizado y, en caso de reinfección, se da una respuesta inmunológica severa en el sitio de penetración de la primera larva, dando lugar a los síntomas de la forma fulminante (anisakidosis intestinal aguda) según Ishikura et al. (1992).

La forma crónica intestinal parece estar causada por una prolongación de la respuesta alérgica frente a antígenos larvarios de una infección primaria con contaminación bacteriana, y su histopatología es prácticamente la misma que la de la forma suave estomacal (Ishikura et al. 1992):

-Primera etapa (tipo flegmonosa), cuya apariencia es idéntica a la forma fulminante intestinal.

-Segunda etapa (tipo absceso), considerada una evolución de la anterior (alergia tipo Arthus) complicada por una infección bacteriana.

-Tercera etapa (tipo absceso-granuloma). La mayoría de estos casos se descubren por accidente cuando el paciente entra al quirófano por una enfermedad intestinal (íleo paralítico, tumor o enteritis crónica).

-Cuarta etapa (tipo granuloma), este tipo, al contrario que en el caso de la anisakidosis estomacal crónica, se encuentra en contadas ocasiones, ya que las larvas se extraen, junto con el tejido intestinal inflamado, mediante intervención quirúrgica, mucho antes de que la enfermedad evolucione hasta esta etapa.

### A.7.3. Anisakidosis extragastrointestinal

Este tipo de anisakidosis, también llamada heteróloga o ectópica, se da con mucha menos frecuencia que las anteriores (Smith y Wootten, 1978; Cocheton et al., 1991).

Las localizaciones de las larvas fuera del conducto gastrointestinal son, por un lado, boca, faringe, laringe y esófago; donde producen picores e incluso pueden penetrar la membrana mucosa, dando lugar al “síndrome del hormigueo en la garganta” (tingling throat). En estos casos se suelen expulsar mediante tos.

Por otra parte, puede ocurrir que alguna larva logre atravesar la pared del tracto gastrointestinal y produzca el llamado “síndrome de larva migrans”, alcanzando zonas tales como : omento y mesenterio, hígado, vesícula, pancreas, ovarios, pleura, nodos linfáticos, etc. En estos lugares, la larva puede morir o encapsularse, permaneciendo así hasta que el cuerpo humano la va degradando paulatinamente, con lo que los antígenos que se van produciendo, tanto en el paso de la larva, como en su encapsulación y/o descomposición, sensibilizan al paciente ante una futura exposición al parásito (Ishikura et al., 1992).

### A.8. Diagnóstico

En los últimos años, se ha incrementado en todo el mundo el número de casos de anisakidosis diagnosticados. Este hecho, es debido a varios factores, entre ellos, al mayor conocimiento de la enfermedad por parte de los profesionales sanitarios y a la mejora de técnicas de diagnóstico. Desde que por primera vez se diagnosticó un caso de anisakiosis humana en Holanda en 1955 (Van Thiel et al., 1960), cada año ha ido incrementándose el número de casos descritos. Hasta esta fecha, e incluso más adelante, se confundían los síntomas con diversas dolencias del aparato digestivo. Un ejemplo de

ello lo aporta Ishikura (1969), quién examinó con detenimiento el diagnóstico clínico antes de la intervención quirúrgica, de 153 pacientes con anisakidosis gástrica y 66 con anisakidosis intestinal. De los 153 con anisakidosis gástrica, inicialmente fueron diagnosticados como sigue: 37 úlcera gástrica, 31 cáncer estomacal, 32 pólipo estomacal, 6 gastritis crónica, etc.; y de los 66 con anisakidosis intestinal: 22 apendicitis aguda, 12 ileitis aguda, 6 obstrucción intestinal, 4 tumor abdominal, etc.

Otro ejemplo de diagnóstico fallido tuvo lugar en Japón, donde entre 1976 y 1990 se diagnosticaron 71 casos de “tumor de estómago que desaparece” (vanishing tumor of the stomach), en los que se daban a la vez las tres condiciones siguientes: sombra de tumor vista en roentgenografía, gran tamaño, y desaparición en un periodo corto de tiempo. De ellos, al menos en 29 se descubrió, mediante una investigación etiológica posterior, que el agente causante fueron estos nematodos, mientras que otros 15 casos se diagnosticaron como probable anisakidosis (Ishikura et al., 1992).

La gastrofibroscopia es fundamental a la hora de diagnosticar la anisakidosis gástrica aguda. De hecho, en Japón el 93 % de los casos diagnosticados son de anisakidosis gástrica y el 4,4 % intestinal, frente a otros países, donde el 75,3 % es intestinal y el 10,6 % estomacal. Esto se debe a que en Japón el uso del gastroscopio es mucho más frecuente, como revela el dato de que el 81 % de los pacientes sospechosos de tener anisakidosis fueron sometidos a este método, con la consiguiente localización y retirada de la mayoría de las larvas (Ishikura et al., 1992).

En cuanto a la anisakidosis intestinal, su diagnóstico se basa, fundamentalmente, en el interrogatorio médico al paciente que se presente con los síntomas típicos de la patología, para saber si vienen precedidos del consumo de pescado crudo o poco cocinado. Este dato, junto con el avance experimentado en los últimos años en las técnicas de diagnóstico inmunológico, permite establecer rápidamente el posible agente causante de la dolencia y proceder a un tratamiento no invasivo que puede a veces resultar eficaz.

El diagnóstico inmunológico se basa en la detección del aumento de la IgE específica y total (López Peñas et al., 2000). Los valores se elevan a partir del tercer día y, sobre todo, entre los 30 y 60 días post-infestación, tanto en anisakidosis gástrica como intestinal. El “inmunoblotting”, junto con el enzimo-inmuno-análisis (ELISA) y el fluoro-enzimo-inmuno-análisis (FEIA) son los métodos que determinan los niveles de IgE específica.

En general, las demás pruebas inmunológicas suelen presentar reacciones cruzadas con otros parásitos, por ejemplo *Ascaris* o *Toxocara*, por lo que los datos que aportan son escasos para el diagnóstico clínico, más bien se usan para estudiar las reacciones de hipersensibilidad.

### A.9. Tratamiento

La mayoría de los autores coinciden en que el remedio más eficaz para los casos diagnosticados como anisakidosis gástrica aguda, es la exéresis de la larva con la ayuda del gastrofibroscopio (Oshima, 1972; Smith y Wootten, 1978; Carvajal, 1984; Deardorff et al., 1986; Pethitory y Marty, 1988; Kasuya et al., 1989; Cocheton et al., 1991; De Montigni et al., 1991). Nakata et al. (1980), en un estudio realizado entre 1975 y 1977 en Japón, trataron 41 casos de anisakiosis gástrica aguda, 21 con endoscopia y exéresis de la larva y otros 20 con analgésicos y antiácidos. El tratamiento elegido se decidió en función del dolor: si era intolerable, intervención por endoscopia con fórceps; si era soportable, el tratamiento sintomático lo hacía remitir en una semana.

De igual modo, en los casos de anisakidosis gástrica crónica, recomiendan la resección de la zona lesionada.

Para tratar los cuadros agudos intestinales, la solución más común es la intervención quirúrgica, con laparatomía y retirada de la lesión (Oshima, 1972; Carvajal, 1984; Deardorff et al., 1986; Kwee y Sautter, 1987; Pethitory y Marty, 1988; Verhamme y Ramboer, 1988; Minamoto et al., 1991). Pero, en aquellos casos en los que el diagnóstico está claro, se puede prescribir un tratamiento conservador, con antibióticos (estreptomina combinada con eritromicina), antipiréticos y solución de glucosa isotónica (Oshima, 1972). La administración de tiabendazol (25 mg/kg, dos veces al día, durante tres días), se aconseja como alternativa (Kwee y Sautter, 1987), si no requiere intervención porque la obstrucción intestinal no es muy grande.

En definitiva, la mayoría de los tratamientos que no requieren intervención quirúrgica y, por tanto, no retiran las larvas o las zonas afectadas (Tabla 1), no acaban con el problema en sí, sino con los síntomas de la enfermedad, pudiendo en ocasiones darse con posterioridad un "síndrome de larva migrans visceral", o sufrir una encapsulación las larvas (en pared gastrointestinal, vísceras o musculatura abdominal).

El paciente queda así sensibilizado ante un futuro contacto con nuevas larvas, motivo por el cual son cada vez más frecuentes los casos de reacciones anafilácticas, llamados comúnmente “alergia al pescado”.

**Tabla 1.** Tratamientos probados o citados por algunos autores.

AUTORES	TRATAMIENTOS
Matsui et al. (1985)	Conservador con anticolinérgicos.
Verhamme y Ramboer (1988)	Prednisolona intravenosa (50 mg al día) en cuadros intestinales.
Petithory y Marty (1988)	Antihelmínticos (tiabendazol o flubendazol) en anisakiosis intestinal subaguda y crónica. Corticoides para los fenómenos alérgicos.
Cocheton et al. (1991)	Antiácidos en formas gástricas poco dolorosas. En casos de granulomas eosinofílicos: corticoides, ACTH o ACTH+antihelmínticos. Antihistamínicos en formas intestinales sin cirugía. Antihelmínticos: piperazina, mebendazol y derivados de imidazol.
Shirama et al. (1992)	Sintomático sin cirugía en anisakiosis intestinal
Moore et al. (2002)	Albendazol 400 mg 2 veces al día durante 21 días

ACTH = hormona adrenocorticotrópica

Teniendo en cuenta que no se conoce ningún fármaco en el mercado de eficacia contrastada, muchos investigadores, sobre todo japoneses, han ensayado la acción de distintos compuestos frente a las larvas de anisákidos, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Manley y Embil (1989) estudian el efecto *in vitro* de la ivermectina frente a L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub> y adultos de *Pseudoterranova decipiens*, observando la pérdida total de la movilidad a la mayor concentración ensayada (500 µg/mL) en un tiempo de 48 horas.

Murata y Yasuda (1989) encuentran que determinadas medicinas comunes en el mercado chino tienen efectos inhibitorios sobre larvas de *A. simplex*, especialmente el “anethole”, provocando la ruptura de la pared esofágica larvaria a 10,20 mg/dL de concentración.

Kasuya et al. (1988) comprueban que las larvas L<sub>3</sub> de *Anisakis* pierden totalmente la movilidad *in vitro* a las 24 horas en contacto con extractos salinos de las plantas *Perilla frutescens* (5%), *Zingiber officinale* (5% y 2,5%), *Wasabia japonica* (5% y 2,5%), *Allium sativum* (5%), y etanol (8% v/v), además de conseguir una letalidad máxima con algunos de sus componentes tales como: [6]-shogaol (62,5 µg/mL), [6]-gingerol (250 µg/mL), perillaldehído (125 µg/mL) y perillil alcohol (250 µg/mL). Otros extractos de plantas así como el tiabendazol (10 mg/mL) resultaron prácticamente ineficaces *in vitro*. Más adelante, Kasuya et al. (1990) profundizan en el estudio *in vitro* de los componentes del extracto de la hoja de *Perilla frutescens*, usada en la medicina tradicional China y también como condimento del pescado crudo. El perillaldehído, principal componente del aceite esencial de esta planta, resultó el más eficaz, alcanzando a las 24 horas el 100% de letalidad a 125 µg/mL. Los autores sugieren que este efecto se debe a una acción sobre el sistema nervioso, ya que no observan cambios aparentes en el estudio histológico de los nematodos. Esto explicaba que en las zonas de China donde se usaba esta planta para condimentar el pescado crudo la prevalencia de la anisakidosis era menor. En este mismo ensayo *in vitro* demuestran que ni el tiabendazol ni el pamoato de pirantel son activos incluso a 1 mg/mL de concentración. Este grupo de investigación (Goto et al., 1990), estudia *in vitro* los componentes de *Zingiber officinale*; de ellos, el [6]-shogaol, a la concentración de 62,5 µg/mL, causó una letalidad del 100% a las 16 horas, produciendo daños en el tracto digestivo y en la cutícula de las larvas.

La (+)-ar-turmerona, obtenida de *Curcuma longa*, también ha presentado actividad frente a las larvas de este nematodo según Suzuki et al. (1994).

El mebendazol, otro antihelmíntico usado con frecuencia, administrado *in vivo* a una concentración de 400 ppm en el alimento de ratas infectadas por vía oral con 10 L<sub>3</sub> de *A. simplex*, no disminuyó el porcentaje de larvas que se fijaban y/o penetraban en la pared gastrointestinal hasta pasadas las 36 horas (Oshima et al., 1990).

Un conjunto bastante extenso de antihelmínticos se han probado *in vitro* frente a L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> de *A. simplex* (Tojo et al., 1992). El grupo formado por los benzimidazoles (mebendazol, oxibendazol, albendazol, flubendazol, oxfendazol y fenbendazol) fue totalmente inactivo salvo el triclabendazol (100% de L<sub>3</sub> muertas a las 48 horas a 1,50 g/L); los derivados fenólicos (nitroxinil, niclofolan y bithionol sulfóxido) tienen efecto sobre L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> a partir de 0,05 g/L; de las salicilanilidas (closantel, rafoxanida y

niclosamida) sólo las dos primeras tienen alguna acción y a las concentraciones más altas ( $>1\text{g/L}$ ) a partir de las 12 horas; la actividad de los derivados piperacínicos (las sales citrato y dihidroclorhídrica, y la dietilcarbamacina) fue nula; otros como la ivermectina (100% de letalidad a las 48 horas a  $1,5\text{ g/L}$ ), el nitroscanato (100% de  $L_3$  muertas a las 12 horas a  $2\text{ g/L}$ ), el praciquantel ejerce una acción muy discreta, y el pamoato de pirantel es inactivo.

## **B. ACEITES ESENCIALES**

### **B.1. Concepto**

Los aceites esenciales son sustancias volátiles de naturaleza compleja obtenidas por procesos físicos a partir de especies vegetales aromáticas, en cuya composición entran a formar parte, de manera mayoritaria, derivados terpénicos (mono y sesquiterpénicos), y en menor proporción, derivados fenilpropánicos y, en ocasiones, otros componentes correspondientes a distintas categorías químicas (Navarro et al., 1999).

### **B.2. Características**

Son volátiles y arrastrables en corriente de vapor de agua, solubles en alcohol, éter y otros disolventes orgánicos, e insolubles en agua, son incoloros (salvo el de manzanilla) y permanecen líquidos a temperatura ambiente (salvo el de alcanfor). Presentan índices de refracción elevados y muchos de ellos son ópticamente activos. La densidad de los aceites esenciales suele ser inferior a la del agua (excepto los de canela, clavo y safrán). Poseen olor característico.

En cuanto a su composición química, los derivados terpénicos pueden pertenecer a uno de los siguientes grupos (Francis, 1971; Loomis y Croteau, 1980; Croteau, 1981): hidrocarburos monoterpénicos (acíclicos, monocíclicos y bicíclicos); derivados oxigenados de los hidrocarburos monoterpénicos (alcoholes, aldehídos, cetonas, éteres, ésteres, óxidos, peróxidos, fenoles); hidrocarburos sesquiterpénicos

(acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, etc.); y derivados oxidados de los mismos. Dentro de los derivados fenilpropánicos predominan los alil y propenilfenoles.

Los principales factores que determinan la variabilidad en la composición cuali y cuantitativa de los aceites esenciales son: el momento de recolección y las características climáticas y edáficas de la zona donde se desarrolla la especie aromática.

Se encuentran predominantemente en especies vegetales superiores (Croteau, 1977) de más de 50 familias pertenecientes a las Angiospermas (Labiadas o Lamiáceas, Compuestas o Asteráceas, Lauráceas, Mirtáceas, Rutáceas, Coníferas, Magnoliáceas, etc.), variando los órganos encargados de sintetizar y/o almacenar los aceites esenciales (sumidad, raíz, rizoma, leño, corteza, hoja, fruto, flor, semilla), si bien las hojas y las flores son los órganos vegetales que presentan, en términos generales, una mayor riqueza en aceites esenciales.

Tienen un papel ecológico en las plantas que los sintetizan, ya que pueden comportarse como inhibidores de la germinación, actuar como defensa frente a agentes nocivos (insectos u hongos) y como atrayentes de los agentes polinizantes (Oh et al., 1967; Dodson et al., 1969; Rao y Nigam, 1970; Halligan, 1975).

### **B.3. Extracción y normalización**

En términos generales, todas las plantas aromáticas se deben recolectar en la época de floración, para proceder a la obtención de los aceites esenciales. Existen varios métodos (hidrodestilación, expresión, extracción con disolventes, destilación-extracción simultánea, extracción por fluidos supercríticos); de entre ellos, el de hidrodestilación es con el que se obtienen los productos extractivos que en mayor medida responden al concepto de aceite esencial (Navarro et al., 1999).

Para la normalización de los aceites esenciales, las farmacopeas recomiendan el uso de índices físicos (poder rotatorio, índice de refracción, solubilidad en alcohol) y químicos (saponificación, aceto, método de la mezcla bisulfítica, solubilidad en soluciones alcalinas). Para el establecimiento de la composición cuali y cuantitativa de los aceites esenciales es de especial interés la aplicación de técnicas cromatográficas (cromatografía en capa fina, técnicas de espacio de cabeza, cromatografía líquido-líquido de alta resolución). La cromatografía gaseosa es hoy en día la técnica más

precisa para separar las mezclas volátiles complejas que son los aceites esenciales, caracterizada por su rapidez, sensibilidad y poder resolutivo (Mateo et al., 1978; Cabo et al., 1980). Los sistemas de detección acoplados que más se utilizan son el detector de ionización de llama y el detector de espectrometría de masas (Bruins, 1979; Papageorgiov y Argyriadov, 1981). En el caso de la cromatografía de gases con detector de ionización de llama, la identificación se realiza habitualmente por comparación de los tiempos de retención de los componentes con los de los patrones puros correspondientes. La aplicación de la cromatografía de gases acoplada a un detector de espectroscopia de masas se considera hoy día imprescindible para la confirmación de la identidad de los distintos componentes de los aceites esenciales, por comparación de los espectros de masas de cada uno de los constituyentes del aceite esencial con los de productos puros o con los de otras fuentes (bibliografía especializada, memoria del espectrómetro de masas).

La cuantificación se puede realizar mediante el método de normalización interna de áreas, así como por aplicación del método del patrón interno (Kanas y Loukis, 1987).

#### **B.4. Toxicidad**

En cuanto a su toxicidad, los aceites esenciales tienen un amplio margen terapéutico, estando la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) por encima de 1 g/kg de peso corporal en los empleados con más frecuencia. Determinados componentes, como los derivados fenilpropánicos asarona, safrol y estragol, están provistos de toxicidad crónica y, si se administran de manera continuada, sus metabolitos pueden inducir la formación de tumores hepáticos e intestinales. Por otra parte, los derivados oxidados de los monoterpenos, como la pinocanfona y la tuyona, así como los aceites esenciales de eucalipto, nuez moscada y clavo, a altas dosis, pueden dar lugar a crisis de tipo epiléptico, convulsiones tetánicas y alteraciones psíquicas por depresión del sistema nervioso central. Por último, mencionar que los de alto contenido en apiol y acetato de sabinilo están considerados como abortivos (Tisserand y Balacs 1995; Navarro et al., 1999).

### B.5. Acciones farmacológicas y aplicaciones

La importancia farmacognóstica de los aceites esenciales reside, en términos generales, en tres acciones farmacológicas: antimicrobiana, espasmolítica e irritante.

La gran mayoría de aceites esenciales tienen, en mayor o menor grado, actividad antimicrobiana (Allegrini et al., 1972; Burt, 2004). Son activos frente a un alto número de bacterias y microorganismos tales como hongos y levaduras (Bullerman et al., 1977; Pellecuer et al., 1977; Agarwall y Mathela, 1979). Las plantas cuyos aceites esenciales tienen una mayor actividad antimicrobiana pertenecen a los géneros *Thymus* y *Bupleurum*, además de los aceites esenciales de clavo, hinojo, lavanda y ajedrea. Se ha demostrado que los derivados oxidados de los monoterpenos son los más activos, entre ellos: timol, carvacrol, linalol, geraniol, alcanfor y citral (Yousef y Tawil, 1979; Megalla et al., 1980; Kurita et al., 1981). Debido a esta acción, se usan de manera tópica (llagas, ulceraciones, forúnculos), o como antisépticos de las vías renales (en nefritis benigna y uretritis benigna) y respiratorias.

Por otra parte, también se ha visto que los aceites esenciales (tomillo, melisa, romero y mentas) se comportan como espasmolíticos frente a distintos agentes espasmógenos (Boettge, 1954; Rochat, 1970; Van der Broucke y Lemli, 1980), tales como acetilcolina, noradrenalina e histamina, porque inhiben la disponibilidad del calcio. Se usan en dolores cólicos intestinales y en mala digestión, ya que, en mayor o menor grado, estimulan las secreciones gástricas.

Por último, el carácter irritante de los aceites esenciales hace que se usen en forma de linimentos con efecto rubefaciente (dolores musculares y articulares), descongestivo (procesos catarrales) y analgésico (Navarro et al., 1999). También se toman vía oral como expectorantes (eucalipto, tomillo y niauli), y como carminativos ante hinchazones epigástricas, flatulencias y digestiones lentas (anís verde, anís estrellado e hinojo), ya que incrementan la motilidad intestinal e inhiben las fermentaciones.

Determinados aceites esenciales son capaces de dar lugar a otras acciones distintas a las ya relacionadas. Así, la administración continuada del aceite esencial de melisa reduce el colesterol plasmático. Los de clavo y nuez moscada son inhibidores de la agregación plaquetaria (por su contenido en eugenol e isoeugenol). El de manzanilla posee propiedades antiinflamatorias (por el camazuleno y el  $\alpha$ -bisabolol), sin efecto

ulcerogénico. El eucaliptol actúa como inductor enzimático en hígado, acelerando la metabolización de algunos medicamentos (Navarro et al., 1999).

El eugenol, principal componente del aceite esencial de clavo (*Eugenia caryophyllus*), se emplea en odontología, ya que a su efecto antimicrobiano une su capacidad anestésica local, si bien su abuso puede conducir a la destrucción de la pulpa dentaria. Así mismo, el aceite esencial de clavo se comporta como antiagregante plaquetario y antiinflamatorio.

Otro aceite esencial de posible interés en el ámbito terapéutico es el de geranio (rico en geraniol y citronelol), que tiene actividad antitumoral *in vitro* (Fang et al., 1989), y en la que se encuentra implicado el geraniol; Crowell (1999) también ha demostrado *in vivo* su acción antitumoral frente a leucemia. El mecanismo de acción se basa en la detoxificación carcinogénica, en fase de iniciación, y en la apoptosis y/o inhibición de las proteínas reguladoras del crecimiento, en fase de post-iniciación. Carnesechi et al. (2001) lo proponen como un nuevo agente de quimio-prevención del cáncer, actuando sobre el metabolismo de las poliaminas de células cancerosas de colon humano. Según Perry et al. (2001), el geraniol puede tener actividad antiinflamatoria y estrogénica; estos mismos autores indican que los aceites esenciales de *Salvia lavandulaefolia* (salvia española) y algunos de sus constituyentes químicos, entre ellos el geraniol, presentan propiedades que pueden ser relevantes para el tratamiento del Alzheimer.

A lo ya expuesto sobre el potencial farmacológico de los aceites esenciales, se añaden los resultados obtenidos por distintos autores sobre las posibilidades terapéuticas, especialmente por su acción biocida frente a distintos microorganismos, que abren distintos aceites esenciales y/o sus principales componentes (Tabla 2).

Además de las aplicaciones terapéuticas indicadas anteriormente y de las potencialidades farmacológicas de muchos de ellos, los aceites esenciales y sus componentes son objeto de un amplio uso en perfumería y cosmética (perfumes, desmaquillantes, cremas y lociones), industria agroalimentaria (aromatizantes, saborizantes y conservantes), industria farmacéutica (mejora de los caracteres organolépticos de determinados medicamentos) e industria química (como productos de partida en semisíntesis) (Navarro et al., 1999).

Actividad larvica de aceites esenciales de plantas aromáticas y sus componentes principales frente a larvas L<sub>3</sub> de *Anisakis simplex* s.l.

**Tabla 2.** Acciones de distintos aceites esenciales frente a organismos patógenos.

AUTORES	ACEITE ESENCIAL	MONOTERPENOS	ACCIÓN
Onawunmi et al. (1984)	<i>Cymbopogon citratus</i>		Antibacteriana
Chaumont y Léger (1992)		Geraniol, citronelol y citral	Antifúngica
Vartak y Sharma (1993)		Citronelol	Repelente de <i>Aedes aegypti</i>
Viollon y Chaumont (1994)		Carvacrol, timol, geraniol, citronelol y citral	Antifúngica <i>in vitro</i> ante <i>Cryptococcus neoformans</i>
Rice y Coats (1994)		Carvacrol, citronelol y citral	Insecticida
Mahmoud (1994)		Eugenol, timol, geraniol, citronelol y citral	Suprimen el crecimiento y la síntesis de aflatoxinas del <i>Aspergillus flavus</i>
Chinou et al. (1996)	<i>Helichrysum amorginum</i> <i>H. italicum</i>	Geraniol	Antibacteriana
Pattnaik et al. (1997)		Geraniol y citral	Antibacteriana y antifúngica
Hammer et al. (1997)	<i>Melaleuca alternifolia</i>		Activo frente a <i>Malassezia furfur</i>
Lee et al. (1997)		Timol y citronelol	Insecticida <i>Musca domestica</i> (timol). Larvica <i>Diabrotica virgifera</i> , gusano del maíz (citronelol)
Lis-Balchin y Deans (1997)		Eugenol, timol, geraniol y citronelol	Anti <i>Listeria</i>
Kayser et al. (1997)	<i>Pelargonium reniforme</i> y <i>P. sidoinis</i>		Antimicrobiana
Lis-Balchin et al. (1998)	<i>Pelargonium</i> sp.		Antibacteriana
Hammer et al. (1998)	<i>Melaleuca alternifolia</i>		Anticandidiásica
Rajab et al. (1998)		Geraniol	Activo frente <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Boyanova y Neshev (1999)	<i>Rosa</i> sp.	Geraniol	Inhibición de <i>Helicobacter pylori</i>
Ultee et al. (1999)		Carvacrol	Activo frente <i>Bacillus cereus</i>
Kulevanova et al. (2000)	<i>Thymus</i> sp.	Timol, geraniol y citral	Antimicrobiana
Govere et al. (2000)	<i>Pelargonium reniforme</i> y <i>Cymbopogon excavatus</i>		Repelente de <i>Anopheles arabiensis</i>
Lindberg et al. (2000)		Carvacrol y timol	Acaricida frente <i>Varroa jacobsoni</i>
Botha y McCrindle (2000)	<i>Pelargonium graveolens</i>	Citronelol	Repelente frente a insectos
Dorman y Deans (2000)	<i>Pelargonium graveolens</i> y <i>Origanum vulgare</i>		Antibacteriana

Karatzas et al. (2000)		Carvacrol y timol	Inhiben a <i>Listeria monocytogenes</i>
Mansour et al. (2000)	<i>Thymus capitatus</i>	Carvacrol y timol	Activo frente a distintas fases de <i>Culex pipiens</i>
Lampman et al. (2000)	<i>Glycine max</i>	Citral	Larvicida frente a <i>Culex pipiens</i>
Zhu et al. (2001)	<i>Vetiver</i>	Eugenol, citronelol y citral	Termicida
Tawatsin et al. (2001)	<i>Cymbopogon winterianus</i>		Repelente de <i>Aedes aegypti</i> , <i>Anopheles dirus</i> y <i>Culex quinquefasciatus</i>
Aliyiannis et al. (2001)	<i>Origanum sp.</i>	Carvacrol	Antimicrobiana y antifúngica
Arras y Usai (2001)	<i>Thymus capitatus</i>	80-83 % carvacrol	Antifúngica
Karaman et al. (2001)	<i>Thymus revolutus</i>	Carvacrol	Antibacteriana y antifúngica
Periago y Moezelaar (2001)		Carvacrol	Activo frente a <i>Bacillus cereus</i>
Isman et al. (2001)	<i>Satureia hortensis</i> , <i>Thymus serpyllum</i> y <i>Origanum creticum</i>	Carvacrol y timol	Insecticida tópica frente a larva III de <i>Spodoptera litura</i>
Knowles y Roller (2001)		Carvacrol	Inhibe a <i>Listeriae</i> , <i>Salmonellae</i> y distintas levaduras
Lambert et al. (2001)	<i>Origanum sp.</i>	Carvacrol y timol	Inhibición de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>
Tsoukatou et al. (2001)	<i>Crithmum maritimum</i>	Carvacrol	Insecticida y repelente de la hormiga <i>Pheidole pallidula</i>
Martins et al. (2001)	<i>Aframomum danielli</i> , <i>Curcuma longa</i> y <i>Zingiber officinale</i>		Antimicrobiana
Varel y Miller (2001)		Carvacrol y timol	Antimicrobiana y antifermentativa
Carson et al. (2002)	<i>Melaleuca alternifolia</i>	Terpinen-4-ol	Activo frente a <i>Staphylococcus aureus</i>
Velutti et al. (2003)	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> , <i>Eugenia caryophyllus</i> , <i>Cymbopogon citratus</i> , <i>C. martinii</i> y <i>Origanum sp.</i>		Inhiben el crecimiento y la producción de fumonisina B <sub>1</sub> en <i>Fusarium proliferatum</i>
Friedman et al. (2004)		Carvacrol, geraniol, eugenol, citral y linalol.	Antibacteriana frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella enterica</i>
Farag et al. (2004)	<i>Melaleuca sp.</i>		Antimicrobiana, antifúngica y antiviral.



## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Distintos trabajos realizados con aceites esenciales y/o sus principales componentes, han puesto de manifiesto el creciente interés de los mismos dentro del ámbito de la Parasitología. En este sentido, cabe citar, entre otros, el efecto inhibitorio que ejercen algunos derivados monoterpénicos como carvacrol, linalol y  $\alpha$ -terpineol frente a promastigotes de *Leishmania infantum* (Morillas Márquez et al., 2004), así como la actividad antihelmíntica *in vivo* mostrada por una mezcla de *Thymus vulgaris*, *Melissa officinalis* y *Echinacea purpurea*, frente a *Ascaris suum* (Gaasenbeek et al., 2004). En relación con la posible actividad de aceites esenciales y/o de sus principales componentes frente a larvas L<sub>3</sub> de *Anisakis simplex* s.l., destacan los trabajos realizados por Kasuya et al. (1988 y 1990), quienes ponen de manifiesto la actividad larvicida *in vitro* del aceite esencial de *Perilla frutescens* y de su principal componente, el aldehído perilla.

Por todo lo expuesto, y habida cuenta de la no disponibilidad de tratamientos farmacológicos eficaces frente a la anisakidosis humana, se ha abordado el estudio de la posible actividad larvicida de distintos aceites esenciales y de sus principales componentes, frente a las larvas L<sub>3</sub> de *A. simplex* s.l., tanto *in vitro* como *in vivo*, y valorar así su posible uso en el tratamiento de esta enfermedad.



# MATERIALES Y MÉTODOS



## 1. MATERIAL BIOLÓGICO

### 1.1. HOSPEDADOR

*Micromesistius poutassou* (bacaladilla) procedente del Norte de la Península Ibérica, con una longitud comprendida entre 31 cm y 17 cm, y 22,76 cm de longitud media. En total, utilizamos unos 100 kg de bacaladillas, con un número aproximado de 1.400 ejemplares, adquiridos en diferentes pescaderías de la ciudad de Granada (España). Para la clasificación del hospedador hemos seguido a Bauchot y Pras (1987).

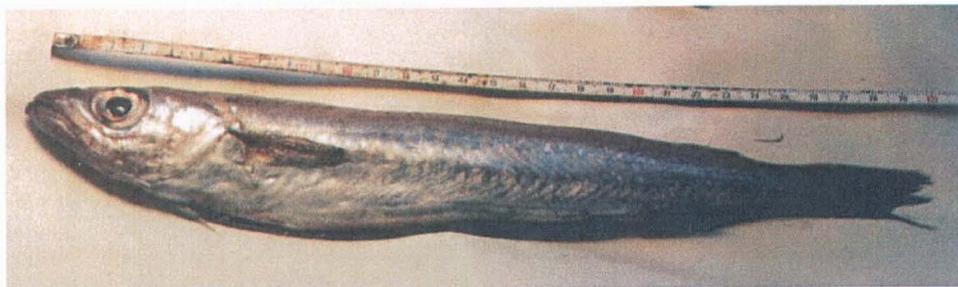


Foto 1. Ejemplar de bacaladilla (*M. poutassou*).

### 1.2. PARÁSITO

Tercer estadio larvario (L<sub>3</sub>) de *A. simplex* s.l. obtenido del hospedador *M. poutassou*.

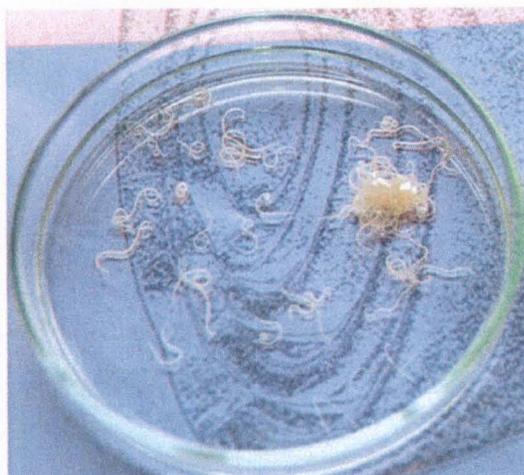
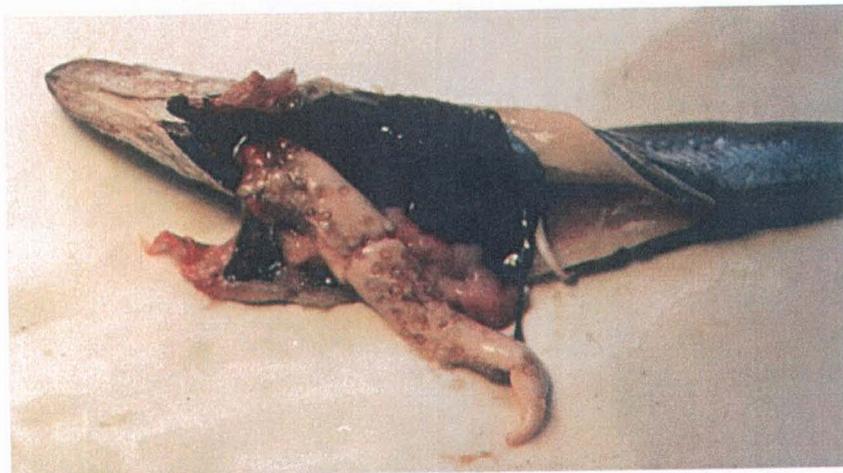


Foto 2. Larvas L<sub>3</sub> de *A. simplex* s.l. en solución de NaCl al 0,9 %.

### 1.3. AISLAMIENTO DE LOS PARÁSITOS

Una vez en laboratorio, con la ayuda de pinzas metálicas y tijeras realizamos una disección completa del pescado, comenzando por el ano y siguiendo la línea alba hasta las branquias. A continuación, con pincel o aguja enmangada se extraen las larvas de *A. simplex* s.l. que se hallan libres en la cavidad abdominal, tras lo cual se procede a la separación del tubo digestivo, vísceras y mesenterio, depositándose en placas de Petri con solución de NaCl al 0,9 %. Posteriormente, se recogen las larvas que se hallan libres en la placa de Petri. Por último, con ayuda del pincel se eliminan los restos adheridos a los parásitos y se lavan varias veces en solución de NaCl al 0,9 %.



**Foto 3.** Larvas L<sub>3</sub> de *A. simplex* s.l. en hígado de bacaladillas.

### 1.4. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS PARÁSITOS

Las larvas de *A. simplex* s.l. se identifican con ayuda de un microscopio estereoscópico. Para completar la identificación, se observan entre portaobjetos y cubreobjetos con una gota de solución de NaCl al 0,9 % a 4x, 10x o 40x bajo el microscopio óptico (Olympus CH-2). Una vez identificadas, se seleccionan aquellas que están sin dañar y se desechan todas las que presentan algún deterioro.

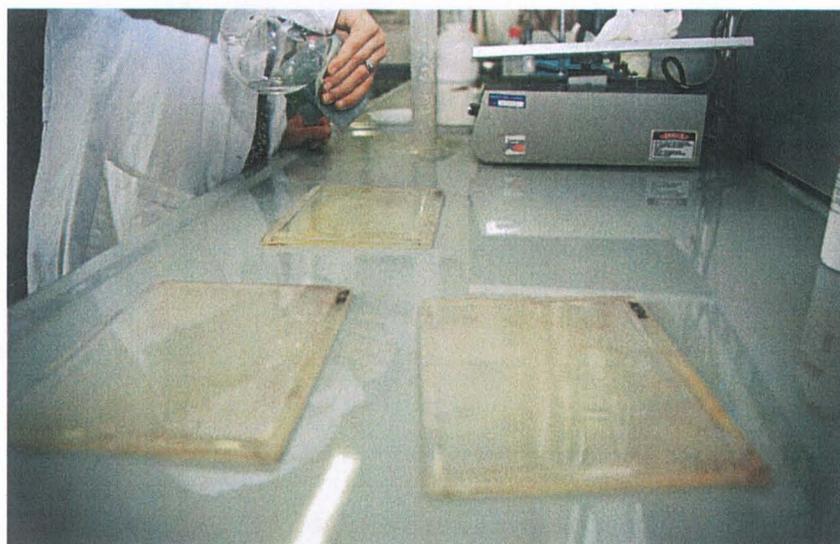
### 1.5. IDENTIFICACIÓN DE LARVAS MEDIANTE ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS

Con el fin de identificar genéticamente las especies de *Anisakis* pertenecientes al complejo *A. simplex* s. l., seleccionamos una serie de larvas de varios ejemplares de hospedadores de distintos días. Una vez lavadas con solución de NaCl al 0,9 % y congeladas a -80°C, analizamos en el Instituto de Parasitología de la Universidad de “La Sapienza”, Roma, bajo la supervisión de la Dra. Mattiucci.

**Tabla 3.** Enzimas estudiados, con su código numérico internacional según la IUBMB (1992).

Enzima	Código numérico	Estructura cuaternaria	Loci	Migración
Malato deshidrogenasa MDH	1.1.1.37	Dimérica	<i>Mdh-1</i>	Anodal/catodal
6-Fosfogluconato deshidrogenasa 6-PGDH	1.1.1.43	Dimérica	<i>6-Pgdh</i>	Anodal
Superóxido dismutasa SOD	1.15.1.1	Dimérica	<i>Sod-1</i>	Anodal
Aspartato amino transferasa AAT	2.6.1.1	Dimérica	<i>Aat-2</i>	Anodal/catodal
Adenilato kinasa ADK	2.7.4.3	Monomérica	<i>Adk-2</i>	Catodal
Peptidasa (leu ala) PEP C	3.4.11	Monomérica	<i>Pep C-1</i>	Anodal
Manosa fosfato isomerasa MPI	5.3.1.8	Monomérica	<i>Mpi</i>	Anodal
Glucosa fosfato isomerasa GPI	5.3.1.9	Dimérica	<i>Gpi</i>	Anodal

Hemos estudiado los enzimas indicados en la Tabla 3, para la identificación de las especies del género *Anisakis* (Orecchia et al., 1986; Mattiucci et al. 2002).



**Foto 4.** Preparación del gel.

En primer lugar, se procede a la preparación de un gel pesando el equivalente a un 10 % de almidón hidrolizado de patata para cada sistema tampón (cuyas composiciones se detallan en el Apéndice de Materiales y Métodos). Se calienta hasta ebullición, agitando a la vez hasta que cambie su consistencia y se aspira el aire que queda en el gel con la ayuda de una bomba de vacío durante aproximadamente 30 segundos, con el fin de evitar que se formen burbujas de aire en él y dificulten el desplazamiento de las proteínas durante el transcurso de la electroforesis. Se vierte el gel sobre los moldes de electroforesis para que solidifique y se deja a durante 1 hora a T<sup>a</sup> ambiente.

**Tabla 4.** Procedimiento electroforético adaptado de Nascetti et al. (1986) y Abollo (1999).

Enzima	Sistema tampón	V/ cm	t h	Tampón coloración	Coenzima	Enzima	Substrato	Activador	Revelado
MDH	ACPH	8	5	-	NAD 20 mg	-	Malato de Na 5 mL	-	MTT 10 mg PMS 2 mg agar 0,8 %
6PGDH	ACPH	9	6	Tris-HCl 0,05 M pH 8;5 mL	NADP 12 mg	-	Ác. 6-P-glucónico 20 mg	MgCl <sub>2</sub> 10 mg	MTT 10 mg PMS 2 mg agar 0,8 %
SOD	PHI	9	5	Tris-HCl 0,05 M pH 8;5 mL	NAD 10 mg	-	-	-	Exponer a la luz
AAT	TC II	9	6	Tris-HCl 0,05 M pH 8 50mL	-	-	Ác. aspártico 200 mg, 100 mg ác. α-cetoglutarico pH 7,5	Piridoxal-5-fosfato 10 mg	Azul rápido BB 150 mg
ADK	TC II	9	6	Tris-HCl 0,05 M pH 8 5 mL	NADP 10 mg	G6PDH 0,02 mg HK 0,02 mg	ADP 30 mg glucosa 45mg	MgCl <sub>2</sub> 10 mg	MTT 10 mg PMS 2 mg agar 0,8 %
PEP C	TC II	8	5	Tris-HCl 0,05 M pH 8 5 mL	-	Peroxidasas 0,04 mg A-oxidasa 0,02 mg	Leucil-alanina 20 mg o-dianisina 10 mg	-	Agar 0,8 %
MPI	PHI	8	5	Tris-HCl 0,05 M pH 8 5 mL	NADP 10 mg	G6PDH 0,02 mg GPI 0,02 mg	Manosa-6-fosfato 25 mg	MgCl <sub>2</sub> 10 mg	MTT 10 mg PMS 2 mg agar 0,8 %
GPI	PHI	8	5	Tris-HCl 0,05 M pH 8;5 mL	NADP 10 mg	G6PDH 0,02 mg	Fructosa-6-fosfato 10 mg	MgCl <sub>2</sub> 10 mg	MTT 10 mg PMS 2 mg agar 0,8 %

La larvas se homogenizan en vidrio de reloj con 100 µl de agua destilada y sobre placa de frío para que no se desnaturalicen las proteínas. El homogenizado se absorbe en papel de cromatografía Whatman 3MM (5x5 mm) y se inserta en los

pocillos de la línea de origen del gel, marcados con la ayuda de un peine, desde donde se desplazarán las proteínas hacia uno de los dos extremos (polos + y -). Con el fin de permitir el paso de corriente eléctrica, el gel se pone en contacto con el tampón de electrodos (Apéndice) con la ayuda de esponjas. Por último, se cubre el gel con una lámina de plástico para protegerlo del polvo.

La electroforesis se realiza a 4°C para evitar el calentamiento excesivo del gel con el paso de la corriente eléctrica. Las condiciones eléctricas se fijan en función del sistema enzimático, al igual que el tiempo de duración de la prueba (de 4 a 6 h) (Tabla 4).

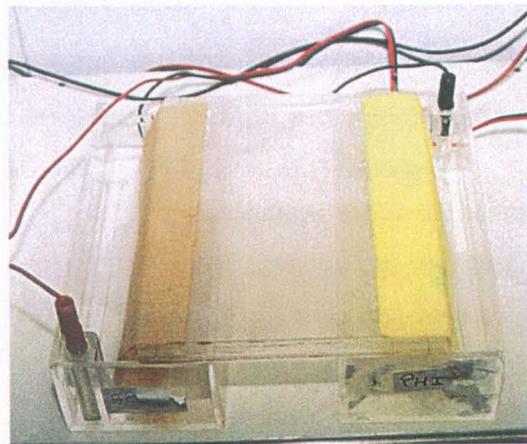


Foto 5. Inicio de la electroforesis isoenzimática.

Transcurrido el tiempo necesario, se realiza la coloración de las placas de almidón, variando el colorante y el tiempo en función del tampón utilizado (Tabla 4). El proceso de revelado se detiene con un fijador (solución de ácido acético al 10 %) y se procede a la posterior lectura e interpretación de los resultados.

La identificación de las larvas se basa en los loci enzimáticos diagnósticos de las especies del complejo isomórfico *A. simplex* (Nascetti et al., 1986; Orecchia et al., 1986; Mattiucci et al., 1997) (Tabla 5). Hemos utilizado controles junto con las muestras objeto de nuestro estudio, para verificar que la electroforesis es correcta y servir de apoyo en la lectura. Los controles usados han sido larvas L<sub>3</sub> del complejo *A. simplex* provenientes del Mar Jónico, Grecia (*A. pegreffii*), y del Mar del Norte, Noruega (*A. simplex* s.s.), cuyo hospedador fue, en ambos casos, *Trachurus trachurus*.

**Tabla 5.** Loci enzimáticos para la identificación genética del complejo *A. simplex*.

	<i>Loci</i>		
	<i>Adk-2</i>	<i>Pep C-1</i>	<i>Sod -1</i>
<i>A. simplex</i> s.s.	105	90	92
<i>A. pegreffii</i>	100	100	100

## 2. PRODUCTOS NATURALES ENSAYADOS

Frente a larvas L<sub>3</sub> de *A. simplex* s.l., hemos ensayado los aceites esenciales siguientes:

- Comino [*Cuminum cuminum* (Apiaceae)]
- Palmarrosa [*Cymbopogon martinii* (Poaceae)]
- Lemongrass [*Cymbopogon citratus* (Poaceae)]
- Geranio Egipto [*Pelargonium graveolens* (Geraniaceae)]
- Litsea cubeba [*Litsea cubeba* (Lauraceae)]
- Orégano [*Coridothymus capitatus* (Lamiaceae)]
- Citronela de Java [*Cymbopogon winterianus* (Poaceae)]

Por otra parte, se ensayaron de manera individual frente al mismo parásito, los principales componentes de los aceites esenciales arriba citados, cuya estructura química se asemeja a la del perillaldehído, nuestro compuesto de referencia (ver Apéndice de Materiales y Métodos). Fueron los derivados monoterpénicos citados a continuación.

Fenólicos:

- Carvacrol
- Timol

Alcohólicos:

- Geraniol

-Citronelol

Aldehídicos:

-Citral

-Aldehído cumínico

-Perillaldehído (compuesto referencia)

De cada uno de los productos (aceites esenciales y componentes) se preparan tres concentraciones distintas con etanol al 96 %:

-12,50 mg/mL.

-6,25 mg/mL.

-3,125 mg/mL.

Tanto los aceites esenciales como sus componentes mayoritarios han sido suministrados por Sensient Fragrances (Granada, España).

## 2.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROSCOPIA DE MASAS

La composición cualitativa y cuantitativa de los aceites esenciales, así como la pureza de sus componentes se ha obtenido mediante cromatografía de gases acoplada a detector de espectrometría de masas (cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890, combinado con un espectrómetro de masas Hewlett-Packard 5973), según las siguientes condiciones instrumentales.

-Automuestreador de líquidos Hewlett-Packard 7673 A.

-Columna de metilsilicona DB-5 (30 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno x 0.25  $\mu$ m de espesor de película).

-Columna capilar Carbowax 20M (30 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno x 0,25  $\mu$ m de espesor de película).

-Temperatura del detector: 250°C.

-Temperatura de inyección: 250°C.

-Volumen de inyección: 0,10  $\mu$ L.

-División de la muestra: 1/70.

-Gas portador: helio.

-Flujo del gas portador: 1,20 mL/minuto.

-Programa de temperaturas:

Temperatura inicial 65°C.

Tiempo inicial 3 minutos.

Temperatura final 210°C.

Gradiente 3,50°C/minuto.

Tiempo final 30 minutos.

Los espectros de masas se obtuvieron en modo de impacto electrónico (EI) con una energía de ionización de 70 eV. La velocidad de barrido fue de 2 scan/segundo en un rango de masas entre 35 y 300 uma (unidades de masa atómica). La identificación de los componentes se hizo en función de sus espectros de masas, por comparación con los conocidos (Jenning y Shibamoto, 1980; Adams, 1995). Por último, el análisis cuantitativo se realizó por el método de las proporciones relativas, calculadas directamente desde las áreas de los picos cromatográficos.

## 2.2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

La capacidad captadora de radicales libres de los derivados monoterpénicos se calculó frente a 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH). Para ello medimos la concentración de solución requerida para disminuir en un 50 % la absorbancia de DPPH (IC<sub>50</sub>), usando ácido ascórbico como control (Navarro et al., 1993).

## 3. ENSAYOS *IN VITRO*

### 3.1. MATERIAL NECESARIO

-Solución de NaCl al 0,9 % (P/V). Dicha solución se prepara utilizando un agitador magnético y, acto seguido, se esteriliza en autoclave a una presión positiva de 1,2 Kg/cm<sup>2</sup> y 121°C durante un tiempo de 30 minutos.

-Alcohol de 70°.

-Placas de poliestireno estériles de 12 pocillos (Iwaki) con una capacidad de 6 mL por pocillo.

-Solución antibiótica (Iglesias et al. 1997) con la siguiente composición para 10 mL:

Sulfato de gentamicina	80 mg
Anfotericina B	0,625 mg
Penicilina G	10.000 U.I.
Sulfato de estreptomicina	10 mg
Solución de Hank's	4,50 mL

Una vez preparada la solución antibiótica se guarda en frascos estériles en alicuotas de 10 mL, protegida de la luz a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

- Agujas enmangadas.
- Pocillos alemanes.
- Pipetas.
- Micropipeta y puntas estériles.
- Jeringas y agujas estériles
- Cámara de flujo laminar.
- Mechero de gas.



Foto 6. Material necesario para los ensayos *in vitro*.

### 3.2. AXENIZACIÓN DE LOS PARÁSITOS

Las larvas se colocan dentro de la cámara de flujo laminar (Kowell) en pocillos alemanes, previamente enjuagados en alcohol de  $70^{\circ}$  y flameados, con 2 mL de solución antibiótica durante aproximadamente 20 minutos.

### 3.3. PROCEDIMIENTO

Se trabaja dentro de la campana de flujo laminar y cerca de un mechero de gas para asegurar la esterilidad.

Con jeringa y aguja estéril se depositan en cada pocillo de las placas de poliestireno 2 mL de solución de NaCl al 0,9 % estéril, y con micropipeta y punta estéril 20 µl del producto natural. De este modo, las concentraciones finales ensayadas de los productos son 125, 62,50 y 31,25 µg/mL. A continuación, las larvas se introducen en los pocillos, se tapan las placas de poliestireno y se etiquetan.

De forma paralela se realizan dos controles con solución de NaCl al 0,9 % (control n°1) y etanol al 1 % (control n°2), con 2 mL de cada uno por pocillo, en las mismas condiciones que los productos, para comprobar si el disolvente de los productos naturales o el medio empleado en los ensayos afectan a la supervivencia de los nematodos.

### 3.4. INCUBACIÓN

Los parásitos se mantienen, dentro de los pocillos de sus respectivas placas de poliestireno, en un incubador (Forma Scientific) a 37°C y con un 5 % de CO<sub>2</sub>.

### 3.5. LECTURA

La observación de los parásitos se lleva a cabo en el microscopio estereoscópico a las 4, 8, 24 y 48 horas. Atendiendo a criterios de movilidad, se marcan en cada intervalo de tiempo las larvas que se mueven (vivas) y aquellas que no lo hacen (*muertas*).

Con el fin de que los resultados sean lo más fidedignos posibles, cada producto y cada dilución del mismo se ensaya tres veces en las condiciones descritas anteriormente, y en días diferentes para asegurarnos de que los parásitos se mueren por acción de los productos y no por otras causas.

Se determinan los siguientes parámetros: Supervivencia Media (SM = % de L<sub>3</sub> vivas) a las 4, 8, 24 y 48 horas del inicio del ensayo; Supervivencia 50 (S<sub>50</sub> = tiempo al

que la mitad de las L<sub>3</sub> están vivas) y Supervivencia Máxima (S<sub>máx</sub>= número de L<sub>3</sub> vivas a las 48 horas).

#### 4. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

Para observar los daños causados por los componentes de los aceites esenciales en las larvas de *A. simplex* s.l., se procede a la realización de cortes histológicos. La técnica que se sigue se resume a continuación.

##### 4.1. CONSERVACIÓN DE LOS PARÁSITOS

Las larvas muertas se retiran de sus respectivos pocillos y se conservan en frascos con formol tampón al 10 %:

Fosfato sódico monobásico dihidratado	3,84 g
Fosfato sódico anhidro purísimo	15,38 g
Agua destilada	192 mL
Añadir:	
Formol comercial 40 % en agua destilada	134 mL
Agua destilada c.s.p.	1 L

##### 4.2. DESHIDRATACIÓN Y FIJACIÓN

Se lleva a cabo en un procesador automático de tejidos (Autotechnicon Duo modelo 2 A). Las larvas previamente deben haber permanecido en formol tampón al 10 %, al menos 24 horas.

Los parásitos se introducen en una canasta de plástico (Bio Cassette) y se someten a una serie de baños en alcoholes de graduación creciente, seguidos de xileno y parafina para completar su deshidratación.

- 1° Alcohol 50° 30 minutos.
- 2° Alcohol 70° 30 minutos.
- 3° Alcohol 96° 30 minutos.
- 4° Alcohol 96° 1 hora.
- 5° Alcohol 100° 1 hora.

6° Alcohol 100° 1 hora.

7° Xileno 30 minutos.

8° Xileno 1 hora.

9° Parafina 30 minutos.

10° Parafina a 56 °C 1,5 horas.

Al final del procesado, la muestra permanece dentro del último baño de parafina hasta la inclusión.

#### 4.3. INCLUSIÓN

Con la ayuda de un molde metálico (Tissue Tex II) y un dispensador de parafina (Selecta) a 58°C se incluyen las larvas en bloques de parafina. Se dejan a temperatura ambiente hasta que la parafina solidifica, y se guardan a 4°C hasta el momento de su uso.



Foto 7. Bloques de parafina con las L<sub>3</sub> de *A. simplex* s.l. incluidas.

#### 4.4. CORTES HISTOLÓGICOS

Se realizan cortes de 3 µm, con un microtomo (Reichert-Jung 2030 MOT) y cuchillas desechables (Feather S-35), previo desbastado del bloque de parafina mediante cortes de 20 µm. Los cortes se depositan con ayuda de un pincel en un baño de agua a 40°C y, seguidamente, se colocan en la superficie de portaobjetos, marcando estos con

el número de la muestra y del corte. A continuación, se procede al secado. Para ello, los portaobjetos, dispuestos en cestillas, se introducen en una estufa a 37°C durante 24 horas.

#### 4.5. DESPARAFINADO E HIDRATACIÓN

Son dos pasos previos a la tinción. Con los cortes histológicos marcados y secos, y aún dentro de las cestillas, se procede a desparafinarlos, introduciéndolos en 2 baños consecutivos de xileno de 20-25 minutos de duración cada uno.

La hidratación se realiza mediante la introducción de las cestillas con los cortes en una serie de alcoholes de graduación decreciente.

- 1° Alcohol 100° 5 minutos.
- 2° Alcohol 100° 5 minutos.
- 3° Alcohol 96° 5 minutos.
- 4° Alcohol 96° 5 minutos.
- 5° Alcohol 90° 5 minutos.
- 6° Alcohol 80° 5 minutos.
- 7° Alcohol 70° 5 minutos.
- 8° Alcohol 60° 5 minutos.
- 9° Alcohol 50° 5 minutos.



Foto 8. Hidratación, tinción de hematoxilina-eosina y deshidratación.

#### 4.6. TINCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA

La técnica que usamos es la indicada por García del Moral (1993).

Las preparaciones se introducen en los siguientes productos durante el tiempo indicado:

1° Hematoxilina 2 minutos.

2° Agua corriente 20 minutos.

3° Lavamos en agua destilada.

4° Eosina 30-60 segundos.

5° Deshidratación:

a) Alcohol 50° 2 minutos.

b) Alcohol 60° 2 minutos.

c) Alcohol 70° 2 minutos.

d) Alcohol 80° 2 minutos.

e) Alcohol 90° 2 minutos.

f) Alcohol 96° 2 minutos.

g) Alcohol 96° 2 minutos.

h) Alcohol 100° 2 minutos.

i) Alcohol 100° 2 minutos.

6° Xileno 2 minutos

7° Montamos las preparaciones con una gota de pegamento (Eukitt) entre porta y cubreobjetos. Los cortes se dejan secar a temperatura ambiente.

#### 4.7. TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON

Seguimos la tinción descrita por García del Moral (1993). Las indicaciones de la técnica señalada se describen a continuación:

1° Solución de Bouin 1 hora a 56°C, o toda la noche a T<sup>a</sup> ambiente.

Ácido pícrico saturado en solución acuosa 750 mL

Formol comercial 10 % en agua destilada 250 mL

Ácido acético 50 mL

2° Enfriamos y lavamos en agua corriente hasta que la coloración amarilla desaparezca.

-3° Enjuagamos en agua destilada.

4° Solución de hematoxilina férrica de Weigert 10 minutos.

Solución A:

Hematoxilina cristalizada	1 g
Alcohol 95°	100 mL

Solución B:

Cloruro férrico 29 % en agua destilada	4 mL
Ácido clorhídrico	1 mL
Agua destilada	95 mL

La solución de trabajo resulta de mezclar A y B a partes iguales.

5° Lavamos en agua corriente 10 minutos.

6° Lavamos en agua destilada.

7° Solución de fucsina ácida-escarlata de Bierbrich 2 minutos.

Escarlata de Bierbrich 1 % en agua destilada	90 mL
Fucsina ácida 1 % en agua destilada	10 mL
Ácido acético glacial	1 mL

8° Lavamos en agua destilada.

9° Solución de ácido fosfotúngstico 5 % 10-15 minutos.

Ácido fosfotúngstico	10 g
Agua destilada	200 mL

10° Solución de verde ligero 10 minutos.

Verde ligero	2 g
Agua destilada	98 mL
Ácido acético	1 mL

11° Lavamos en agua destilada.

12° Solución de ácido acético glacial 3-5 minutos.

Ácido acético glacial	1 mL
Agua destilada	100 mL

13° Deshidratación (igual que en el punto 5° de la tinción anterior).

14° Xileno 2 minutos.

15° Montamos (igual que en la tinción anterior en el punto 7°).

## 5. ENSAYOS *IN VIVO*

### 5.1. MATERIAL NECESARIO

- Sondas gástricas de 2,5 mm de diámetro.
- Jeringas de plástico de 2 mL.
- Animales de experimentación (rata Wistar hembra) con un peso aproximado de 150 g. En total se han utilizado 454 ejemplares.
- Campana de cristal.
- Éter dietílico.
- Báscula.
- Tabla de disección (soporte de corcho).
- Tijeras.
- Pinzas metálicas.
- Agujas.
- Pipetas Pasteur.

### 5.2. DOSIS ADMINISTRADA

El cálculo de la concentración de los componentes de los aceites esenciales, productos naturales objeto del ensayo *in vivo*, se realiza de acuerdo con la Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>) para los productos dotados de toxicidad (Tisserand y Balacs, 1995; The Merck Index, 1996), escogiendo la cantidad correspondiente a 1/8 de dicha DL<sub>50</sub> para un peso medio de 150 g. En el caso de los no tóxicos (geraniol, citronelol y citral) optamos por una dosis igual a la calculada para el producto con una mayor DL<sub>50</sub> (perillaldehído). Las diluciones se realizan, en cada caso, en 0,5 mL de aceite de oliva, usado como vehículo. Las concentraciones (D) de cada producto y sus DL<sub>50</sub> son:

- Carvacrol: D = 9,50 mg/0,5mL; DL<sub>50</sub> = 100-810 mg/kg peso corporal.
- Timol: D = 17,30 mg/0,5mL; DL<sub>50</sub> = 980 mg/kg peso corporal.
- Geraniol: D = 46,90 mg/0,5mL; no tóxico.
- Citronelol: D = 46,90 mg/0,5mL; no tóxico.
- Citral: D = 46,90 mg/0,5mL; no tóxico.

-Aldehído cumínico: D = 26 mg/0,5mL; DL<sub>50</sub> = 1390 mg/kg peso corporal.

-Perillaldehído: D = 46,90 mg/0,5mL; DL<sub>50</sub> = 2500 mg/kg peso corporal.

### 5.3. PROCEDIMIENTO

Se han diseñado tres modelos distintos de ensayos *in vivo*, cuyas características se muestran en la Tabla 6. El número medio de animales de experimentación empleado en cada ensayo es 14.

**Tabla 6.** Modelos del experimento *in vivo* y pautas de actuación.

	<b>Infestación</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Sacrificio</b>
<b>Modelo A</b>	Inicio (t = 0 h)	Inicio (t = 0 h)	t = 4 h
<b>Modelo B</b>	Inicio (t = 0 h)	t = 2 h	t = 4 h
<b>Modelo C</b>	Inicio (t = 0 h)	t = 2 h	t = 12 h

En el Modelo A se procede de la siguiente forma: 6 larvas L<sub>3</sub> de *A. simplex* s.l. se introducen en el extremo de una sonda gástrica de plástico de 2,5 mm de sección, conectada por el extremo opuesto con una jeringa de plástico de 2 mL de volumen con la dosis correspondiente de cada producto (D). La sonda gástrica se introduce por la boca de la rata inmovilizada, formando con la cabeza, cuello y tórax una línea recta; se avanza suavemente por la faringe y el esófago hasta llegar al estómago, aprovechando el reflejo de deglución del animal. Una vez allí, se empuja el émbolo de la jeringa para depositar el contenido de la sonda (6 larvas) y de la jeringa (D) en el estómago. Se retira la sonda y nos aseguramos de que todas las larvas se han introducido. A continuación, se mantiene al animal con dieta blanda (agua) en jaulas individuales hasta su sacrificio.

A las 4 horas del inicio se sacrifica el animal en campana de cristal con atmósfera saturada de éter dietílico, observando en todo momento las normas de seguridad recomendadas, y posteriormente se pesa en la báscula.



**Foto 9.** Administración *in vivo* de las larvas y dosis (D) del compuesto.

Acto seguido, se inicia la necropsia reglada del cadáver (Feldman y Seely, 1988), fijando el animal por sus cuatro extremidades a una tabla de disección. Se toma un pellizco de piel junto a la vulva, se hace un corte transversal y se continúa cortando la piel hasta el cuello. Luego se realiza un corte en la musculatura abdominal sobre la línea alba hasta el apéndice sifoides, continuando por las costillas que envuelven el tórax, dejando a la vista tanto la cavidad torácica como la abdominal. Con el fin de evitar que la sangre de los vasos se vierta en las cavidades y dificulte la visión, se corta la aorta y, con una pipeta Pasteur, se retira la mayor cantidad de sangre posible que fluye hacia el tórax. Se realiza un examen visual minucioso de los órganos (hígado, páncreas, riñones, genitales y grasa adyacente) y del interior del roedor para localizar las larvas que pudieran hallarse en la cavidad, se extrae el tracto gastrointestinal desde el esófago hasta el ano, lo colocamos en una placa de Petri para proceder a su apertura e inspección, y localizar el resto de parásitos con ayuda del microscopio estereoscópico. Por último, en el caso de que faltase algún nematodo por recuperar, se inspeccionan las heces de las jaulas, colocándolas en una placa de Petri con agua para que se rehidraten, dispersando su contenido y observándolo con el microscopio estereoscópico.

Se anotan tanto las localizaciones de las larvas como los incidentes derivados del experimento, tales como: hemorragias (gástrica y/o intestinal), nematodos fijados a la pared del estómago o en otro punto del intestino, larvas vivas y muertas, y el número de ellas que no se pudiesen recuperar.

El Modelo B se diferencia del anterior en que el tratamiento con la dosis del producto se administra, mediante sonda gástrica, a las 2 horas del inicio del ensayo, es decir, 2 horas después de la infestación.

En el Modelo C el tratamiento se aplica a las 2 horas del inicio y el sacrificio se lleva a cabo a las 12 horas de la infestación.



**Foto 10.** Necropsia y observación del animal de experimentación.

De forma paralela, hacemos un ensayo control, administrando a un grupo de animales 0,5 mL de aceite de oliva con ayuda de la sonda gástrica junto con 6 larvas del parásito, sacrificando al roedor a las 4 horas y anotando los resultados. Este control se realiza para verificar que el aceite de oliva administrado, en esa cantidad, no interfiere en los resultados obtenidos con los derivados naturales.

## **6. CURVA DOSIS-RESPUESTA *IN VIVO***

El estudio de los compuestos que hayan resultado más eficaces *in vivo* se completa con la realización de una curva dosis-respuesta. Dicha curva se obtiene de la aplicación del Modelo A descrito en el apartado 5.3 con dos dosis distintas, una equivalente al doble ( $2 \times D$ ) y otra a la mitad ( $1/2 D$ ) de la que ya hemos usado anteriormente ( $D$ ), junto con los datos obtenidos de la primera experiencia *in vivo* ( $D$ ).

## 7. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD MIELOPEROXIDASA (MPO) TISULAR

Ante el hecho conocido de que los aceites esenciales producen efecto irritativo en las mucosas (Navarro et al., 1999), estudiamos si los compuestos ensayados además de su acción frente a las larvas de *A. simplex* s.l. producen reacción inflamatoria local a lo largo del tracto gastrointestinal. Para ello, mediante el método descrito por Krawisz et al. (1984), se determina la actividad de MPO (enzima marcador de la infiltración de neutrófilos) en estómago, intestino delgado y ciego de los animales de experimentación tratados con una dosis (D) correspondiente a cada compuesto, igual a la utilizada en el ensayo *in vivo*.

### 7.1. MATERIAL NECESARIO

-Tampón de homogeneización:

Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) 0,5 % (p/v) 5 g/L

Tampón fosfato sódico 50 mM (pH=6,0):

87,70 % NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (PM=137,99) 6,05 g/L

12,30 % Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (PM=141,96) 873 mg/L

-Tampón de reacción (extemporáneo):

Tampón fosfato sódico (pH=6,0) 50 mL

o-dianisidina·HCl 8,35 mg

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % 5 µL

-Patrón de peroxidasa: peroxidasa de rábano (5 UI/50 µL). Mantener a -20°C.

-Reactivo A:

Ácido bicinchonínico (BCA) sal disódica 5 g

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O 10 g

Tartrato sódico 0,8 g

NaOH 2 g

NaHCO<sub>3</sub> 4,75 g

Llevar a 500 mL y ajustar el pH a 11,25. Estable a T<sup>a</sup> ambiente indefinidamente.

-Reactivo B:

CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 2 g

H<sub>2</sub>O

50 mL

Estable a T<sup>a</sup> ambiente indefinidamente.

-Albúmina sérica bovina (BSA): al 10 % en H<sub>2</sub>O. Esparcir la BSA sobre el agua y dejar reposar hasta total disolución sin agitar, someter a ultrasonidos en un tiempo breve y guardar a -20°C.

## 7.2. PROCEDIMIENTO

Se homogeneizan los fragmentos de tejido, picando primero las muestras con tijeras durante 15 segundos, y luego con homogeneizador automático (Heidolph) durante 45 segundos, actuando siempre sobre placa fría para que no se desnaturalice el enzima, y añadimos tampón HTAB en una proporción 1:20 (p/v). El HTAB actúa como detergente para facilitar la liberación de MPO de los neutrófilos. A continuación se congelan y descongelan tres veces las muestras, sin dejar que se calienten para que no se desnaturalicen las proteínas. Por último, se someten a ultrasonidos durante 10 segundos. Estas operaciones se llevan a cabo para facilitar la rotura de las estructuras tisulares y la liberación de la MPO al medio. Se centrifugan las muestras a 7000 G durante 10 minutos a una temperatura de 4°C, quedando la MPO en el sobrenadante y precipitando otras estructuras celulares. Se descongelan y preparan las diluciones seriadas 1:2 del patrón de peroxidasa en tampón HTAB (10 diluciones). En una placa microtiter se añaden por pocillo: 50 µL de cada dilución del patrón, 50 µL de solución HTAB (blanco), y 35 µL de muestra + 15 µL de HTAB. Se ajusta el lector de placas a 37°C, se añaden 150 µL de tampón de reacción y se mide inmediatamente el incremento de absorbancia a 450 nm, durante 2 minutos aproximadamente.

La actividad MPO se calcula por interpolación en la curva patrón. Una unidad de MPO (U) se define como la cantidad necesaria para degradar 1 µmol/minuto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 25°C.

Para la determinación de proteínas, necesaria para poder expresar los resultados de la actividad MPO en U/g de proteína, seguimos la técnica descrita por Smith et al. (1985). La curva patrón se elabora a partir de BSA al 10 % en agua, haciendo diluciones 1:10 y 1:100, tomando la lectura electrofotométrica a 562 nm. Mezclamos los reactivos A y B en proporción 50:1 (V/V) y añadimos 200 µL a 1 µL de muestra, midiendo de nuevo a 562 nm.

## 8. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

### 8.1. DISEÑOS EXPERIMENTALES

#### 8.1.1. Diseño experimental del ensayo *in vitro*

Para el análisis de los aceites esenciales las variables independientes fueron: *aceite* y *concentración* manipulados entre ensayos, y la variable *hora de observación* manipulada intraensayo. El factor *aceite* reunía los siguientes siete niveles: comino, palamarrosa, lemongrass, geranio, litsea, orégano y citronela. La variable *concentración* presentaba las tres condiciones C<sub>1</sub> (125 µg/ml), C<sub>2</sub> (62,50 µg/ml) y C<sub>3</sub> (31,25 µg/ml). Y, por último, la variable *hora de observación* contenía cuatro niveles que se correspondían con 4, 8, 24 o 48 horas desde el inicio del ensayo. El porcentaje de larvas muertas fue la variable dependiente sobre la que se observa el efecto de las manipulaciones mencionadas.

Para el análisis de los componentes de los aceites replicamos este diseño pero sustituyendo la variable *aceite* por *componente*, manipulada entre grupos con los niveles: carvacrol, timol, geraniol, citronelol, citral, aldehído cumínico y perillaldehído.

#### 8.1.2. Diseño experimental de los ensayos *in vivo*

En los ensayos *in vivo* se evaluó el efecto de dos variables independientes manipulados entre grupos: *componente* y *modelo de administración*. La primera con ocho niveles que corresponden a cada uno de los siete componentes (carvacrol, timol, geraniol, citronelol, citral, aldehído cumínico y perillaldehído) de los aceites esenciales administrados más el aceite de oliva, y el segundo factor con tres niveles que responden a cada una de las tres formas de administración de los componentes que se emplearon. Las variables dependientes sobre las que observamos el efecto de las manipulaciones mencionadas fueron el porcentaje de larvas muertas y el porcentaje de ratas con hemorragias gastrointestinales.

### 8.1.3. Diseño experimental para el estudio de la curva dosis-respuesta

En otro conjunto de ensayos *in vivo* se exploró el efecto de las variables independientes *componente* y *dosis* sobre las variables dependientes porcentaje de larvas muertas y porcentaje de ratas con hemorragia. En esta ocasión, el factor *componente* presentaba las dos condiciones de perillaldehído o geraniol, y el factor *dosis* tres niveles correspondientes a 2 x D, 1/2 D y D.

### 8.1.4. Diseño experimental de la actividad MPO tisular

En este caso, contamos con las variables independientes *componente* y tejido. La primera manipulada entre grupos con ocho niveles (carvacrol, timol, geraniol, citronelol, citral, aldehído cumínico, perillaldehído y aceite de oliva como control) y la segunda intrasujeto con tres niveles que hacen referencia a tres tejidos diferentes: estómago, intestino delgado y ciego. La actividad MPO en cada uno de los tres tejidos mencionados fue la variable dependiente sobre la que evaluamos los efectos de las variables independientes mencionadas.

## 8.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DISEÑOS EXPERIMENTALES

La introducción de más de una variable independiente nos conduce al empleo del Análisis de Varianza (ANOVA) como técnica estadística de elección para comparar los datos obtenidos de las muestras de las diferentes condiciones de nuestro diseño experimental.

Cuando la aplicación del ANOVA mostraba que varios grupos diferían significativamente en sus valores para una variable dependiente concreta, analizábamos donde residían esas diferencias mediante comparaciones planeadas.

Como excepción al empleo generalizado del ANOVA en los diferentes estudios de esta investigación, el examen de la actividad MPO tisular presentó una gran variabilidad que impidió la aplicación de pruebas estadísticas paramétricas como el ANOVA. Por ello, empleamos una prueba no paramétrica pertinente para el diseño experimental considerado, el test de Kruskal-Wallis.



## APÉNDICE



**SISTEMAS TAMPÓN Y REACTIVOS EMPLEADOS EN LA  
ELECTROFORESIS ISOENZIMÁTICA**

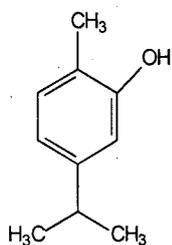
SISTEMA TAMPÓN	ELECTRODOS	GEL
TC II (Tris/citrato continuo)	Tris 166,40 g Ácido cítrico H <sub>2</sub> O 60 g pH=8 Agua destilada 2 L	Tris 5,54 g Ácido cítrico H <sub>2</sub> O 2,20 g pH=8 Agua destilada 2 L
PHI (Tris/versene borato)	Tris 50,80 g Ácido bórico 18,20 g EDTA 2,20 g pH=8 Agua destilada 2 L	Tris 5 g Ácido bórico 2,48 g EDTA 0,50 g pH=8 Agua destilad 2 L
ACPH (Fosfato/citrato)	Citrato de Na tribásico 108,22 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O 66,24 g pH=6,3 Agua destilada 2 L	Igual que el de electrodos diluido 1:40  pH=6,3

Tris-HCl: 12 g de Tris en 2 L de agua. Ajustar el pH a 8 con HCl.

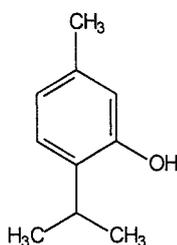
MTT: Dimetiltiazol.

PMS: Metasulfato de fenacina.

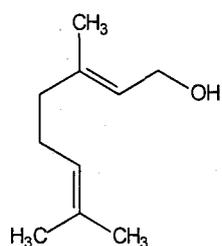
## ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS DERIVADOS ENSAYADOS



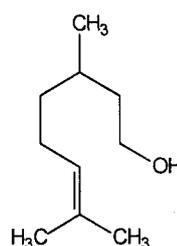
Carvacrol



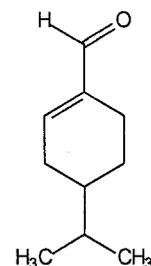
Timol



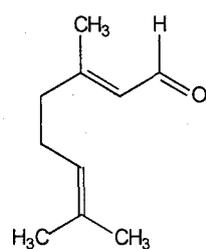
Geraniol



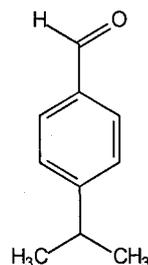
Citronelol



Perillaldehido



Citral, trans



Aldehido cumínico

# RESULTADOS



## 1. IDENTIFICACIÓN DE LARVAS MEDIANTE ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS

La lectura de las placas se basa en los *loci* enzimáticos, dándole el valor 100 al alelo más frecuente y en función de éste se valoran los demás, por encima o por debajo de 100, dependiendo de la altura que alcance la banda electroforética en cada caso. En el caso del *locus Mdh* todas las bandas tienen el valor 100 (84 L<sub>3</sub>), lo que confirma que se trata en todos los casos de larvas de *A. simplex* s.s. o de *A. pegreffii*. Los *loci* enzimáticos diagnósticos de las especies del complejo isomórfico *A. simplex* son los que nos determinan la especie, siendo los valores más frecuentes para *A. simplex* s.s. *Adk-2* = 105, *Pep C-1* = 90 (Foto 11) y *Sod 1* = 92, mientras que para *A. pegreffii* es 100 en los tres *loci*. Los otros *loci* enzimáticos (*6-Pgdh*, *Aat-2*, *Mpi* y *Gpi*) nos ayudan en la interpretación pero no son determinantes como las anteriores.

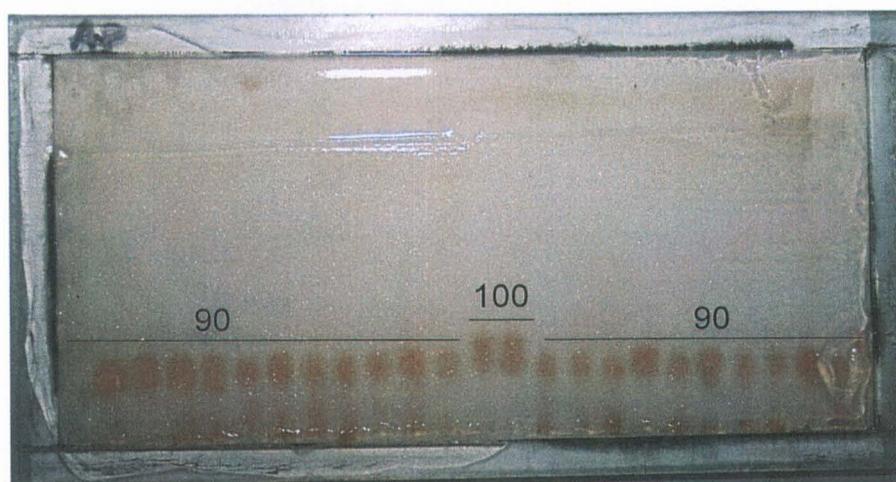


Foto 11. Resultado de la electroforesis para la peptidasa (leu-ala), *locus Pep C-1*.

En la Tabla 7 se puede observar como todas las larvas L<sub>3</sub> del complejo *A. simplex* identificadas mediante electroforesis de isoenzimas pertenecen a las especies *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*. De las 84 larvas de *A. simplex* s.l. analizadas electroforéticamente, 61 pertenecen a la especie *A. simplex* s.s. (72,62 %), mientras que las restantes 23 son de la especie *A. pegreffii* (27,38 %).

**Tabla 7.** Resultados de la identificación de larvas mediante electroforesis multiloci en geles de almidón.

Nº L <sub>3</sub>	<i>A. simplex</i> s.s.	<i>A. pegreffii</i>
84	61 72,62 %	23 27,38 %

## 2. ANÁLISIS DE LOS ACEITES ESENCIALES Y DE SUS PRINCIPALES COMPONENTES

### 2.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROSCOPIA DE MASAS

Las proporciones relativas de los componentes mayoritarios de los aceites esenciales objeto de nuestra investigación, obtenida por cromatografía de gases con espectrometría de masas (cromatogramas en Apéndice de Resultados), es la siguiente para cada aceite esencial.

#### -Comino:

Aldehído cumínico	28,34 %
p-menta-1,3-dien-7-al	23,64 %
γ-terpineno	18,75 %
p-cimeno	10,49 %
β-pireno	9,90 %
Alcohol cumínico	1,05 %

#### -Palmarrosa:

Geraniol	72,01 %
Acetato de geranilo	10,34 %
Linalol	6,33 %
Cariofileno	2,51 %
Farnesol	1,55 %

Caproato de geranilo	1,30 %
Geranial	0,61 %
-Lemongrass:	
Geranial*	44,09 %
Neral*	37,01 %
Acetato de geranilo	5,14 %
Geraniol	4,21 %
Dihidroneral	1,34 %
Dihidrogeranial	1,30 %
Nerol	0,32 %
-Geranio Egipto:	
Citronelol	33,04 %
Geraniol	13,68 %
10-epi- $\gamma$ -endesmol	8,42 %
Formiato de citronelilo	8,29 %
Isomentona	5,37 %
Linalol	4,82 %
Formiato de geranilo	2,40 %
Mentona	2,22 %
Óxido de rosa	1,02 %
-Litsea:	
Geranial*	37,83 %
Neral*	34,78 %
Limoneno	11,63 %
Linalol	1,38 %
Eucaliptol	1,20 %
Metil heptenona	1,06 %
Geraniol	0,67 %
Nerol	0,34 %

-Orégano:

Carvacrol	54,43 %
$\gamma$ -terpineno	11,38 %
p-cimeno	10,88 %
Cariofileno	6,75 %
Mirceno	2,85 %
$\alpha$ -tuyeno	2,21 %
Linalol	1,88 %
$\alpha$ -terpineno	1,01 %
$\alpha$ -pineno	0,65 %
Timol	0,39 %

-Citronela de Java:

Citronelal	38,65 %
Geraniol	17,72 %
Citronelol	17 %
Elemol	4,78 %
Acetato de citronelilo	3,36 %
Limoneno	2,42 %
Germacreno	2,13 %
$\beta$ -elemeno	2,06 %
Acetato de geranilo	2 %

\*El geraniol y el neral constituyen, ambos, el citral.

En la Tabla 8 quedan recogidos los porcentajes en que están presentes los derivados monoterpénicos objeto de nuestro estudio en los aceites esenciales de las plantas aromáticas empleadas en nuestras experiencias.

Tabla 8. Porcentaje de los derivados monoterpénicos seleccionados en cada aceite esencial.

ACEITES ESENCIALES	DERIVADOS MONOTERPÉNICOS					
	%					
	Carvacrol	Timol	Geraniol	Citronelol	Citral	Aldehído cumínico
COMINO						28.34
PALMARROSA			72.01			
LEMONGRASS			4.21		81.10	
GERANIO EGIPTO			13.68	33.04		
LITSEA			0.67		72.61	
ORÉGANO	54.43	0.39				
CITRONELA DE JAVA			17.72	17		

La pureza de los principales componentes de los aceites esenciales de plantas aromáticas empleados en nuestros ensayos, establecida mediante cromatografía de gases con espectrometría de masas, ha resultado ser la siguiente para cada uno de los derivados monoterpénicos.

-Fenólicos:

Carvacrol 100 %

Timol 99 %

-Alcohólicos:

Geraniol 98 %

Citronelol 97 %

-Aldehídicos:

Citral 97 %

Aldehído cumínico 99 %

Perillaldehído 94 %

## 2.2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

En cuanto a la capacidad captadora de radicales libres, sólo en dos de los productos ensayados (carvacrol y timol) su IC<sub>50</sub> fue inferior a 1000 µg/ml (Tabla 9). En cualquier caso, todos los derivados monoterpénicos mostraron valores muy superiores a los del patrón (ácido ascórbico), el cual presentó una IC<sub>50</sub> = 2,70 µg/ml.

**Tabla 9.** Actividad antioxidante *in vitro* de los componentes principales de los aceites esenciales.

COMPONENTES	IC <sub>50</sub> µg/mL	r
CARVACROL	649,50 ± 12,49	0,989
TIMOL	686,50 ± 12,49	0,989
GERANIOL	>1000	0,995
CITRONELOL	>1000	0,987
CITRAL	>1000	0,977
ALDEHÍDO CUMÍNICO	>1000	0,989
PERILLALDEHÍDO	>1000	0,982
CONTROL (Ácido ascórbico)	2,34 ± 0,03	0,992

r = coeficiente de correlación

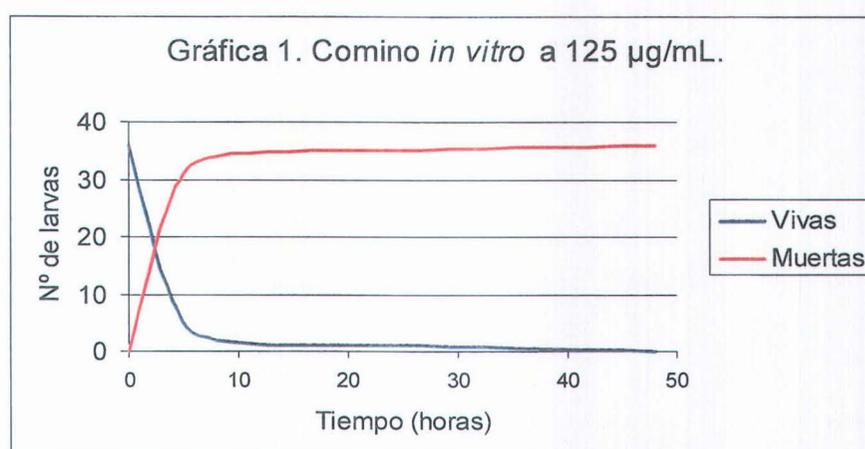
### 3. ENSAYOS *IN VITRO*

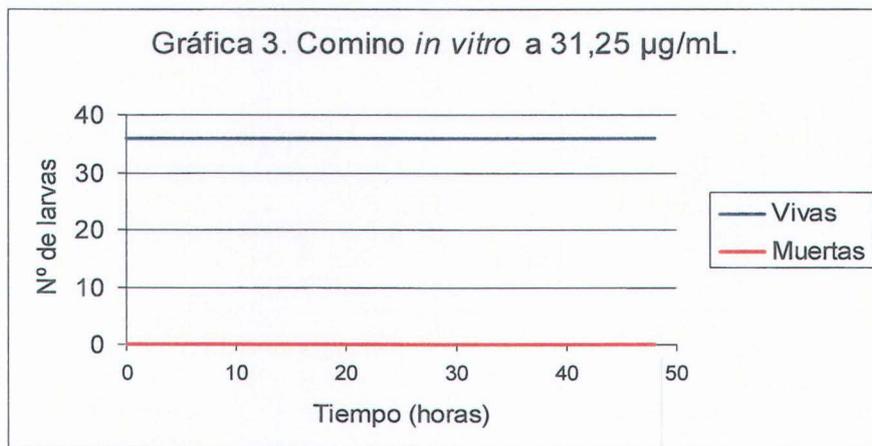
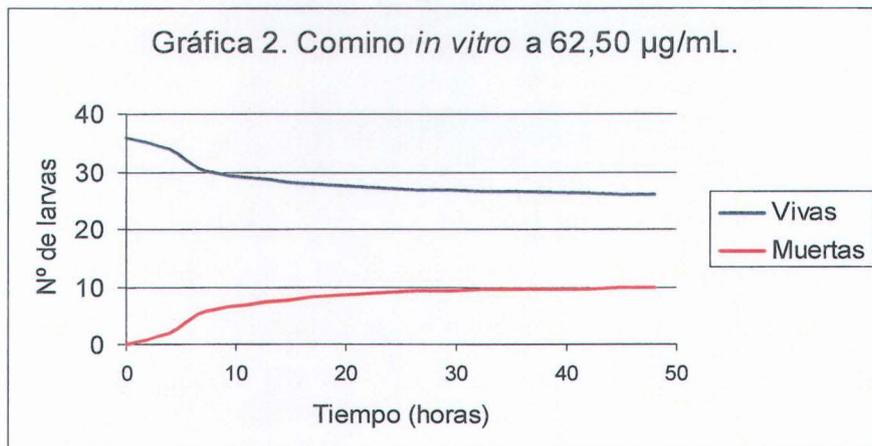
#### 3.1. ACEITES ESENCIALES

El aceite esencial de comino (Tabla 10) alcanza un 75 % de eficacia larvicida a las 4 horas del inicio de la experiencia ( $SM_{4h} = 25\%$ ) a la mayor concentración (125  $\mu\text{g/mL}$ ), siendo máxima a las 48 horas, con una  $S_{50}$  de 2 horas y 27 minutos (Gráfica 1). A la concentración intermedia (62,50  $\mu\text{g/mL}$ ), el número de larvas vivas al final del ensayo es de 26 ( $S_{\text{máx}} = 26$ ), mientras que a la menor (31,25  $\mu\text{g/mL}$ ) no se observa efecto larvicida alguno.

**Tabla 10.** Actividad larvicida *in vitro* del aceite esencial de comino frente a *A. simplex* s.l..

COMINO	N° L <sub>3</sub>	SUPERVIVENCIA MEDIA				S <sub>50</sub>	S <sub>máx</sub>
		4 h	8 h	24 h	48 h		
125 $\mu\text{g/ml}$	36	25 %	5,60 %	2,80 %	0	2 h 27 min	0
62,50 $\mu\text{g/ml}$	36	94,40 %	83,30 %	75 %	72,20 %	-	26
31,25 $\mu\text{g/ml}$	36	100 %	100 %	100 %	100 %	-	36

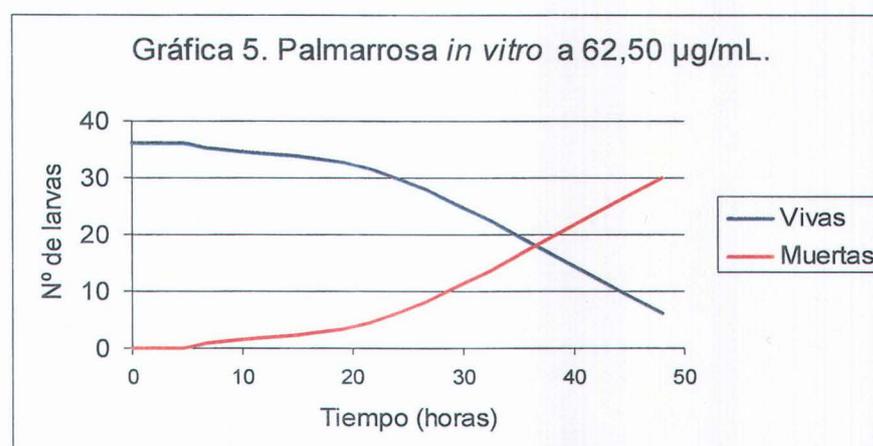
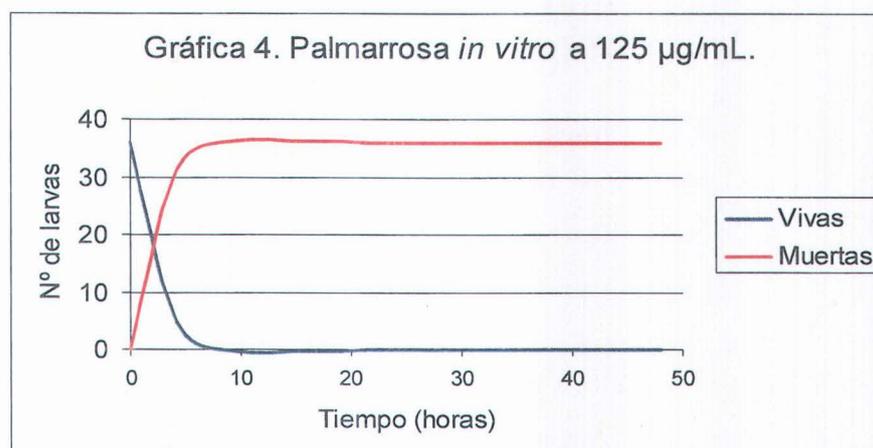


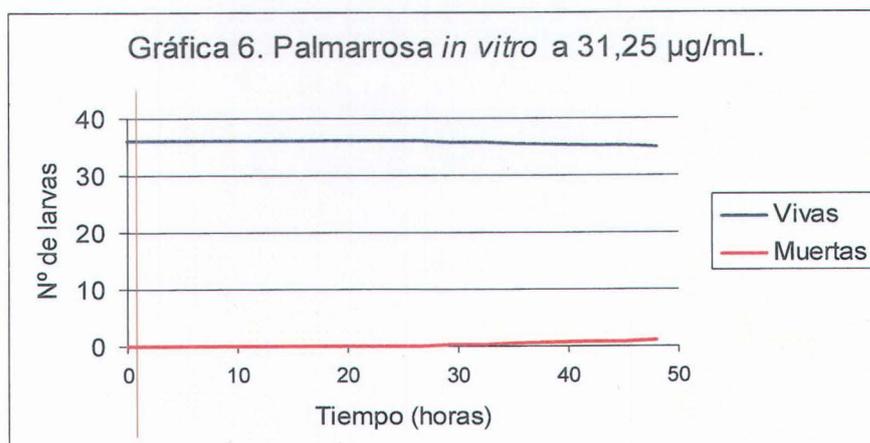


El aceite esencial de palmarrosa alcanza un 100 % de letalidad a las 8 horas ( $SM_{8h} = 0$ ) y la mitad de las larvas están muertas a las 2 horas y 10 minutos (Gráfica 4) a 125 µg/mL de concentración (Tabla 11). A 62,50 µg/mL la  $S_{50}$  sube hasta 36 horas y 10 minutos (Gráfica 5) y al final del experimento hay una  $S_{máx}$  de 5 L<sub>3</sub> (Tabla 9). La tercera concentración ensayada (31,25 µg/mL) es prácticamente ineficaz ( $SM_{48h} = 97,20\%$ ).

Tabla 11. Actividad larvica *in vitro* del aceite esencial de palmarrosa frente a *A. simplex* s.l..

PALMARROSA	N° L <sub>3</sub>	SUPERVIVENCIA MEDIA				S <sub>50</sub>	S <sub>máx</sub>
		4 h	8 h	24 h	48 h		
125 µg/ml	36	16,70 %	0	0	0	2 h 10 min	0
62,50 µg/ml	36	100 %	97,20 %	83,30 %	16,70 %	36 h 10 min	5
31,25 µg/ml	36	100 %	100 %	100 %	97,20 %	-	35

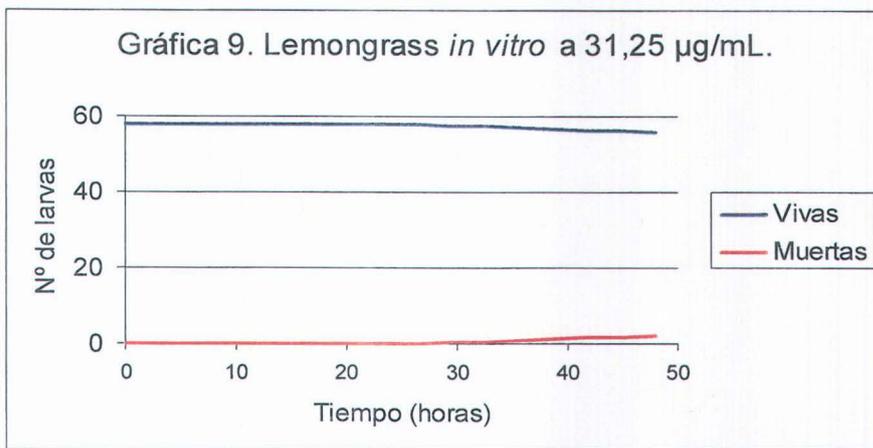
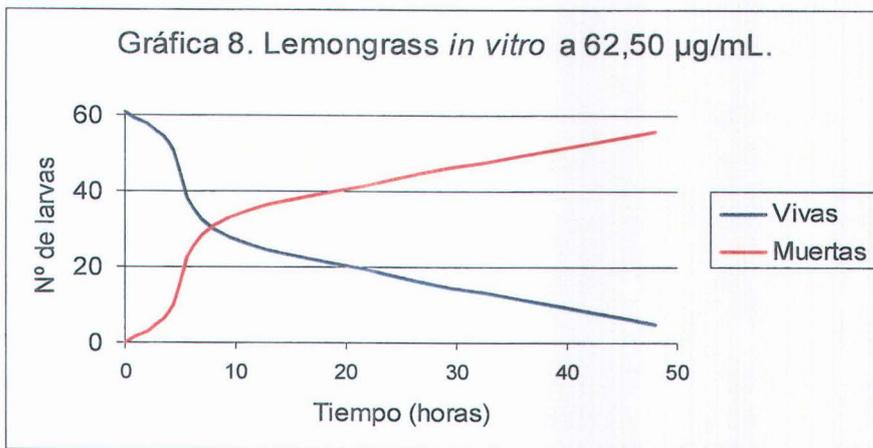
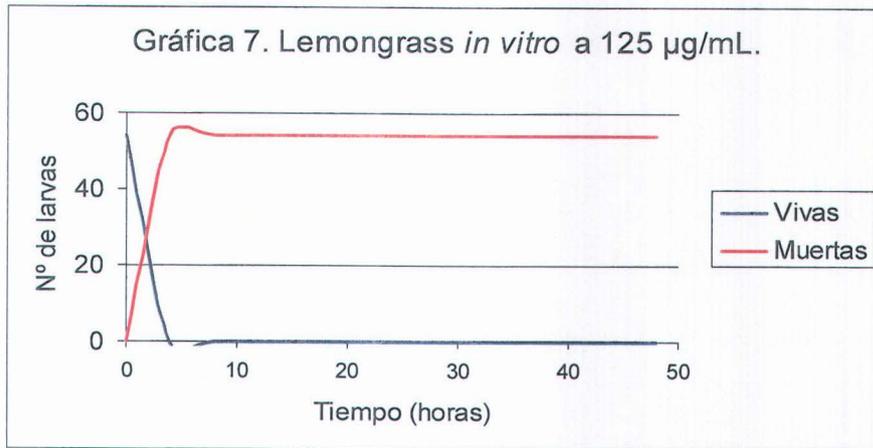




En el caso del lemongrass, la eficacia es máxima desde la primera lectura realizada a las 4 horas ( $SM_{4h} = 0$ ) a la mayor concentración de aceite esencial (125 µg/mL), mientras que a la menor (31,25 µg/mL) no presenta efecto larvica, con un 96,60 % de larvas vivas al final del ensayo (Tabla 12). Para la intermedia (62,50 µg/mL), la  $S_{50}$  es de 7 horas y 47 minutos (Gráfica 8) y la  $S_{m\acute{a}x}$  es de 5 L<sub>3</sub>.

Tabla 12. Actividad larvica *in vitro* del aceite esencial de lemongrass frente a *A. simplex* s.l..

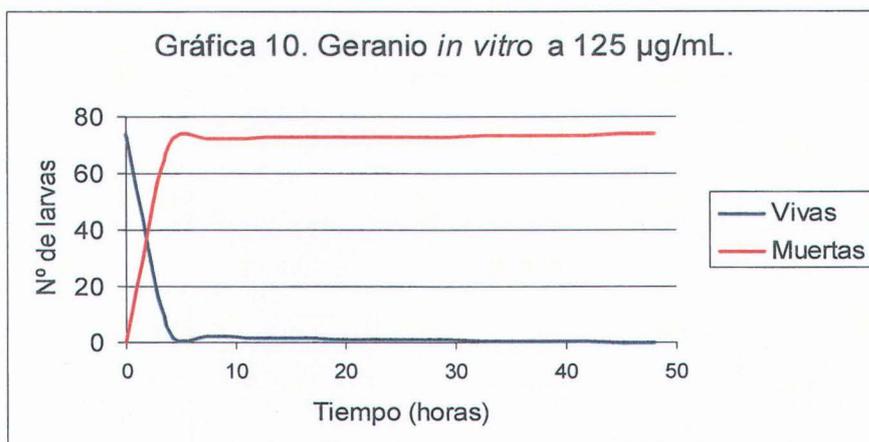
LEMONGRASS	Nº L <sub>3</sub>	SUPERVIVENCIA MEDIA				S <sub>50</sub>	S <sub>máx</sub>
		4 h	8 h	24 h	48 h		
125 µg/ml	54	0	0	0	0	-	0
62,50 µg/ml	61	86,90 %	49,20 %	29,50 %	8,20 %	7 h 47 min	5
31,25 µg/ml	58	100 %	100 %	100 %	96,60 %	-	56

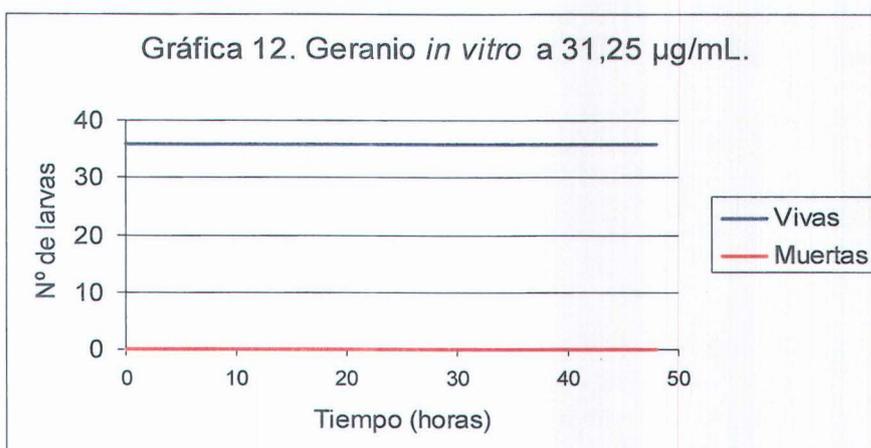
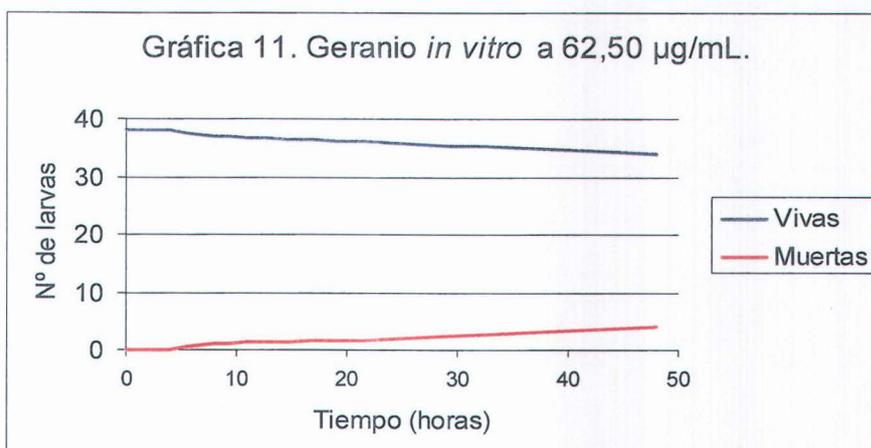


Para el geranio, la máxima letalidad a la concentración de 125 µg/mL de aceite esencial se consigue entre las 24 y 48 horas (Tabla 13). El momento en el cual la mitad de las larvas están muertas es a 1 hora y 53 minutos desde el comienzo del ensayo (Gráfica 10). Las dos concentraciones restantes de geranio, 62,50 y 31,25 µg/mL, son prácticamente inactivas, con una SM<sub>48 h</sub> del 89,50 % y del 100 %, respectivamente.

**Tabla 13.** Actividad larvicida *in vitro* del aceite esencial de geranio frente a *A. simplex* s.l..

GERANIO	Nº L <sub>3</sub>	SUPERVIVENCIA MEDIA				S <sub>50</sub>	S <sub>máx</sub>
		4 h	8 h	24 h	48 h		
125 µg/ml	74	5,40 %	2,70 %	1,40 %	0	1 h 53 min	0
62,50 µg/ml	38	100 %	97,40 %	94,70 %	89,50 %	-	34
31,25 µg/ml	36	100 %	100 %	100 %	100 %	-	36

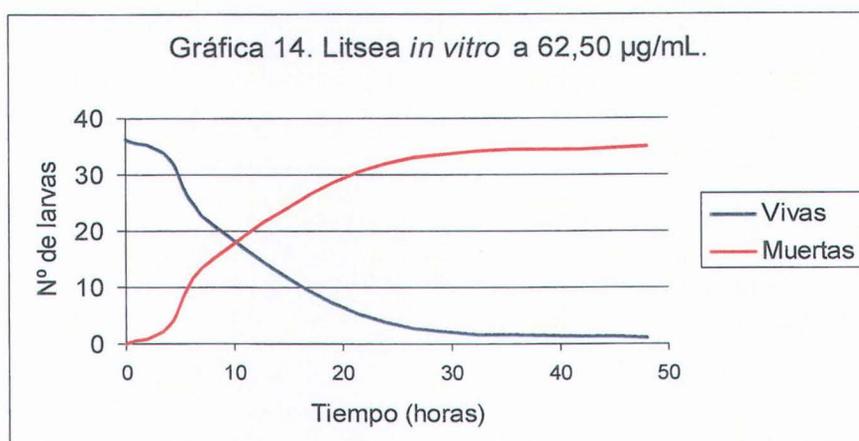
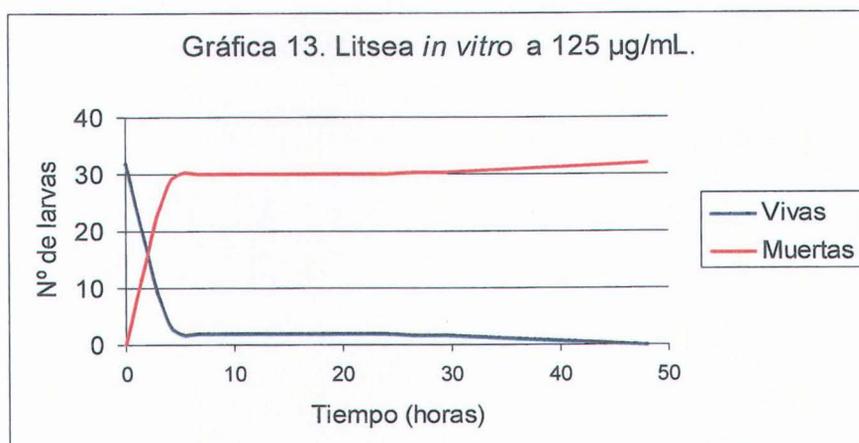


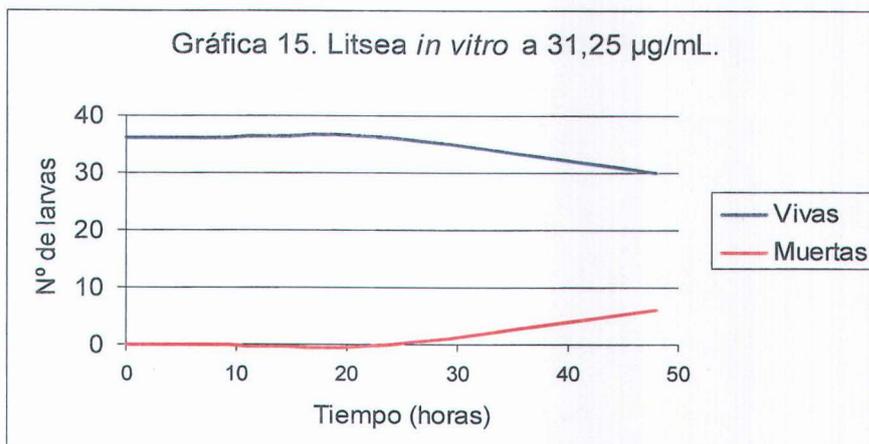


En el ensayo *in vitro* del aceite esencial de litsea frente a larvas de *A. simplex* s.l., se obtiene una  $SM_{4\text{ h}} = 12,50\%$  a la mayor concentración ( $125\ \mu\text{g/mL}$ ), dato que desciende a la mitad en las dos siguientes lecturas hasta llegar a un 100 % de letalidad a las 48 horas ( $SM_{48\text{ h}} = 0$ ) (Tabla 14). A  $62,50\ \mu\text{g/mL}$  la  $SM_{4\text{ h}}$  es un 91,70 % y la  $SM_{48\text{ h}}$  un 2,80 %, con una  $S_{50}$  de 10 horas y 7 minutos (Gráfica 14). Para la menor concentración, se alcanza un valor de  $SM_{48\text{ h}} = 83,30\%$ , al final del ensayo.

Tabla 14. Actividad larvica *in vitro* del aceite esencial de litsea frente a *A. simplex* s.l..

LITSEA	N° L <sub>3</sub>	SUPERVIVENCIA MEDIA				S <sub>50</sub>	S <sub>máx</sub>
		4 h	8 h	24 h	48 h		
125 µg/ml	32	12,50 %	6,25 %	6,25 %	0	2 h 11 min	0
62,50 µg/ml	36	91,70 %	58,30 %	11,10 %	2,80 %	10 h 7 min	1
31,25 µg/ml	36	100 %	100 %	100 %	83,30 %	-	30

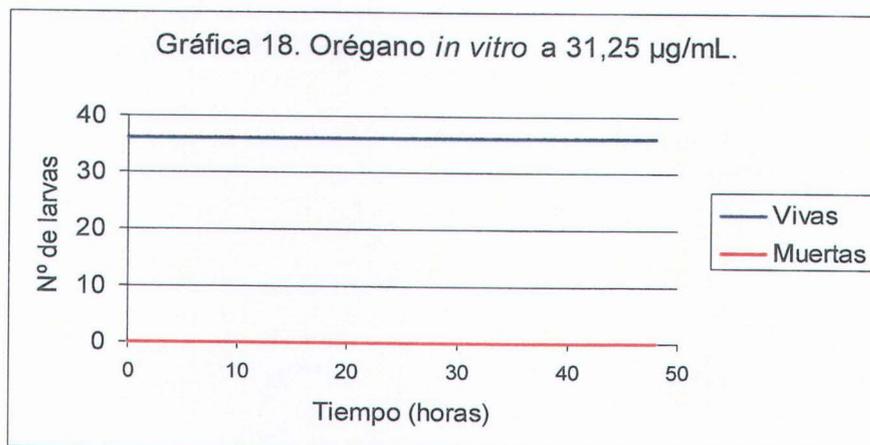
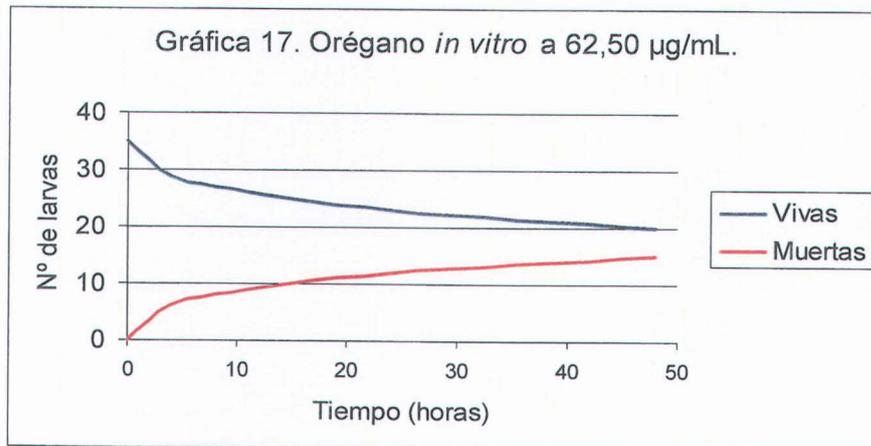
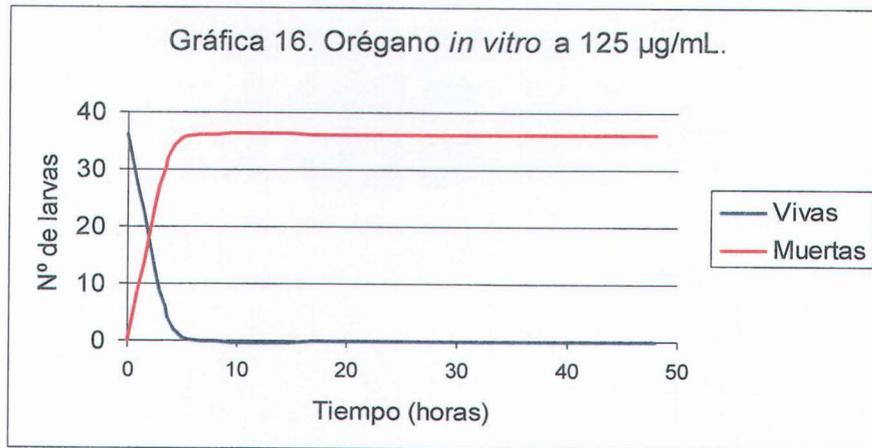




El aceite esencial de orégano resulta inactivo a la concentración de 31,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , llegando todas las larvas vivas al final de la experiencia (Tabla 15), mientras que a la máxima (125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) la letalidad es muy alta a las 4 horas ( $SM_{4\text{ h}} = 8,30\%$ ), y total a partir de las 8 horas ( $SM_{8\text{ h}} = 0$ ), con una  $S_{50}$  de 2 horas (Gráfica 16). Para la intermedia (62,50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) el número de  $L_3$  vivas al final es de 20 ( $SM_{48\text{ h}} = 57,10\%$ ).

Tabla 15. Actividad larvicida *in vitro* del aceite esencial de orégano frente a *A. simplex* s.l..

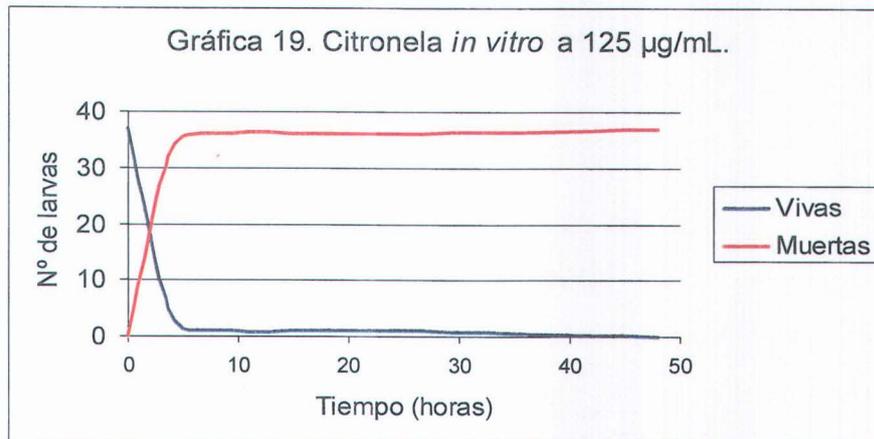
ORÉGANO	Nº $L_3$	SUPERVIVENCIA MEDIA				$S_{50}$	$S_{\text{máx}}$
		4 h	8 h	24 h	48 h		
125 $\mu\text{g}/\text{ml}$	36	8,30 %	0	0	0	2 h	0
62,50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	35	82,90 %	77,10 %	65,70 %	57,10 %	-	20
31,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	36	100 %	100 %	100 %	100 %	-	36

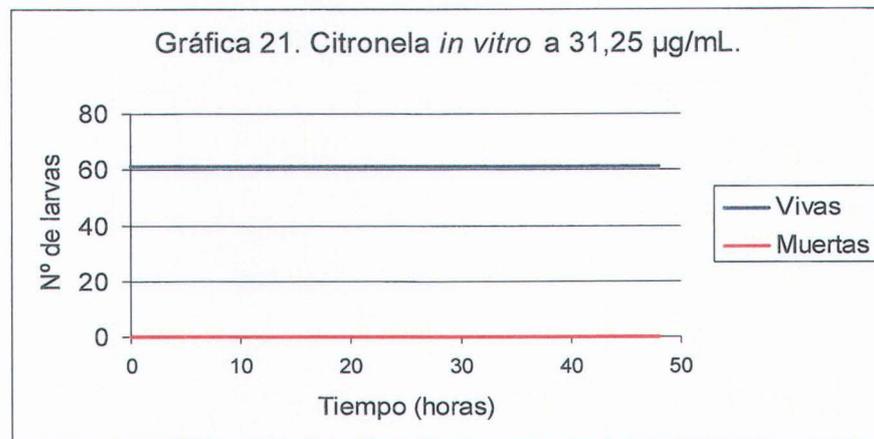
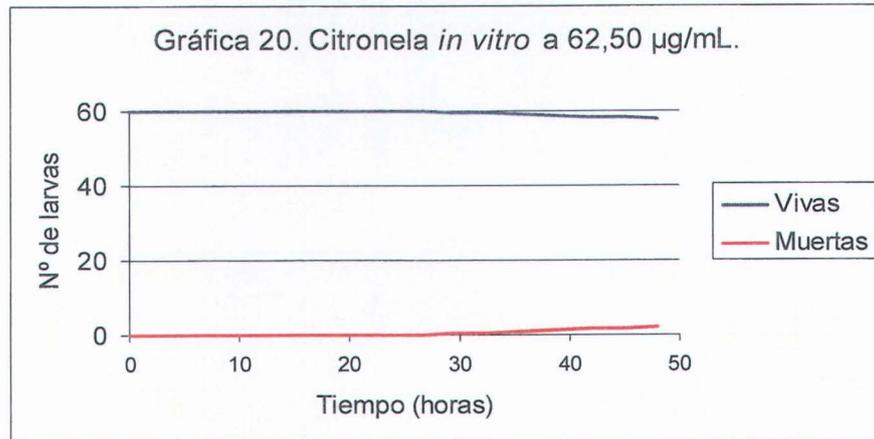


En el caso de la citronela de Java (Tabla 16), sólo resultó activa la concentración máxima (125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) con un 90 % de letalidad desde las 4 horas ( $\text{SM}_{4\text{h}} = 10,80\%$ ), llegando al 100 % a las 48 horas ( $\text{SM}_{48\text{h}} = 0$ ), con una  $\text{S}_{50}$  de 2 horas (Gráfica 19).

**Tabla 16.** Actividad larvicida *in vitro* del aceite esencial de citronela de Java frente a *A. simplex* s.l..

CITRONELA	N° L <sub>3</sub>	SUPERVIVENCIA MEDIA				S <sub>50</sub>	S <sub>máx</sub>
		4 h	8 h	24 h	48 h		
125 $\mu\text{g}/\text{ml}$	37	10,80 %	2,70 %	2,70 %	0	2 h	0
62,50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	60	100 %	100 %	100 %	96,70 %	-	58
31,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	61	100 %	100 %	100 %	100 %	-	61



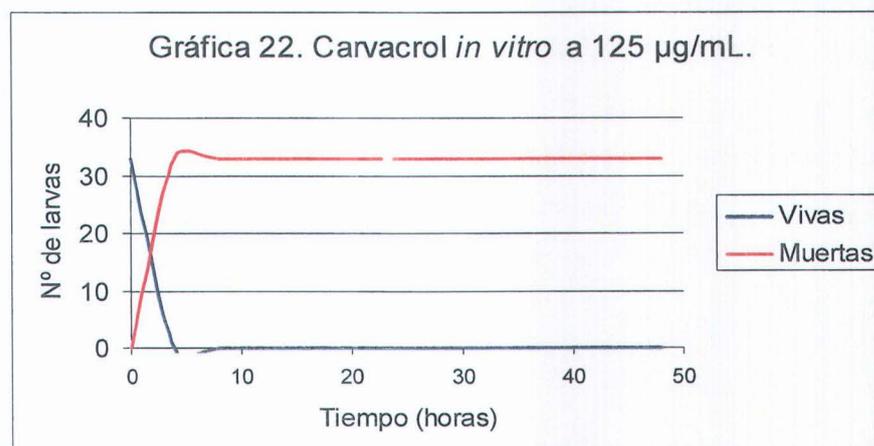


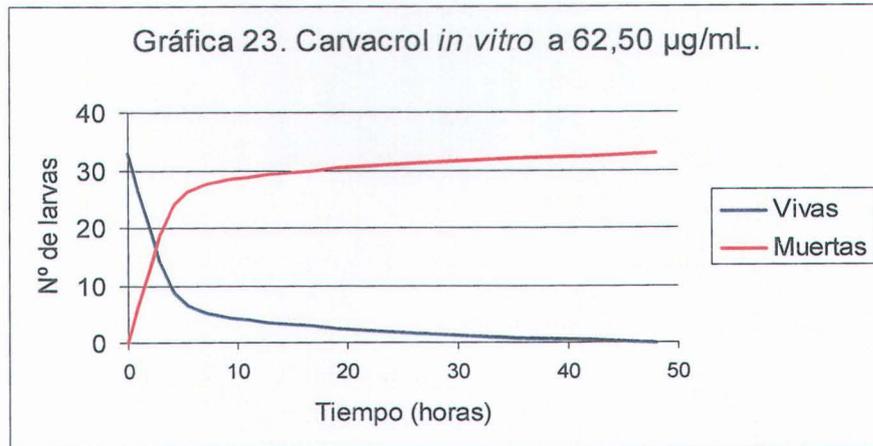
## 3.2. COMPONENTES DE LOS ACEITES ESENCIALES

El carvacrol (Tabla 17), a la concentración de 125  $\mu\text{g/mL}$  alcanza un 100 % de eficacia a las 4 horas del comienzo del ensayo, con una  $SM = 0$  en todas las lecturas (4, 8, 24 y 48 horas). A 62,50  $\mu\text{g/mL}$ , casi un tercio de las larvas están vivas en la primera lectura ( $SM_{4\text{ h}} = 30,30\%$ ), disminuyendo en las dos siguientes hasta llegar a 0 a las 48 horas, momento en que manifiesta la máxima letalidad. La  $S_{50}$  en este caso es de 2 horas y 30 minutos (Gráfica 23). Sin embargo, a 31,25  $\mu\text{g/mL}$ , menor de las concentraciones usadas, no se observa efecto alguno sobre la viabilidad de las larvas de *A. simplex* s.l., siendo la  $S_{\text{máx}}$  de 36  $L_3$  (100 %).

Tabla 17. Actividad larvicida *in vitro* del carvacrol frente a *A. simplex* s.l..

CARVACROL	N° $L_3$	SUPERVIVENCIA MEDIA				$S_{50}$	$S_{\text{máx}}$
		4 h	8 h	24 h	48 h		
125 $\mu\text{g/ml}$	33	0	0	0	0	-	0
62,50 $\mu\text{g/ml}$	33	30,30 %	15,10 %	6 %	0	2 h 30 min	0
31,25 $\mu\text{g/ml}$	36	100 %	100 %	100 %	100 %	-	36

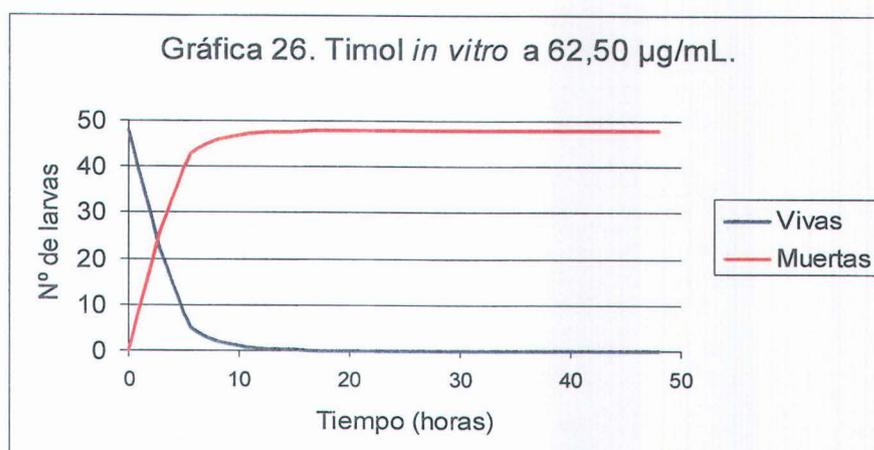
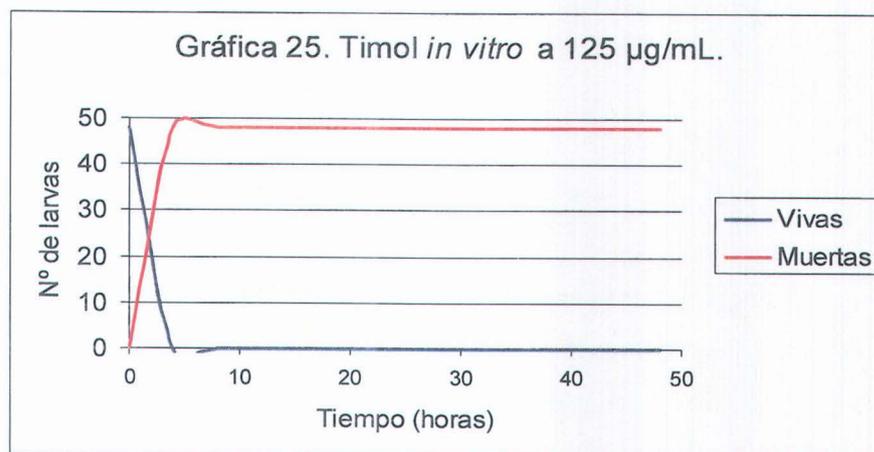


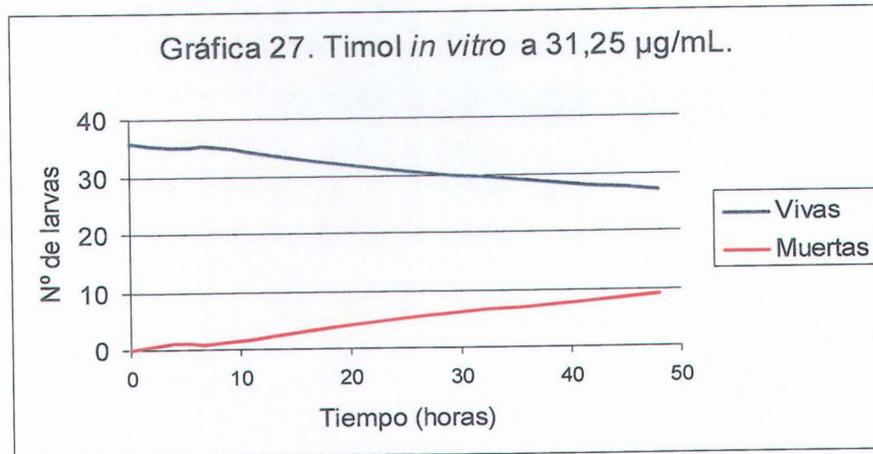


El timol, derivado terpenfenólico al igual que el carvacrol, presenta una letalidad máxima a la mayor de las concentraciones (125 µg/mL) tras las 4 horas del inicio de las experiencias ( $SM_{4h} = 0$ ) (Tabla 18). Para 62,50 µg/mL, consigue el mismo grado de eficacia a las 24 horas, siendo 2 horas y 45 minutos el tiempo necesario para llegar a un 50 % de supervivencia (Gráfica 26). Por último, a la menor concentración, se obtiene un 75 % de L<sub>3</sub> vivas al final del ensayo ( $SM_{48h} = 75\%$ ), con una  $S_{máx} = 27$ .

Tabla 18. Actividad larvicida *in vitro* del timol frente a *A. simplex* s.l..

TIMOL	N° L <sub>3</sub>	SUPERVIVENCIA MEDIA				S <sub>50</sub>	S <sub>máx</sub>
		4 h	8 h	24 h	48 h		
125 µg/ml	36	0	0	0	0	-	0
62,50 µg/ml	48	31,25 %	4,16 %	0	0	2 h 45 min	0
31,25 µg/ml	36	97,22 %	97,22 %	88,57 %	75 %	-	27

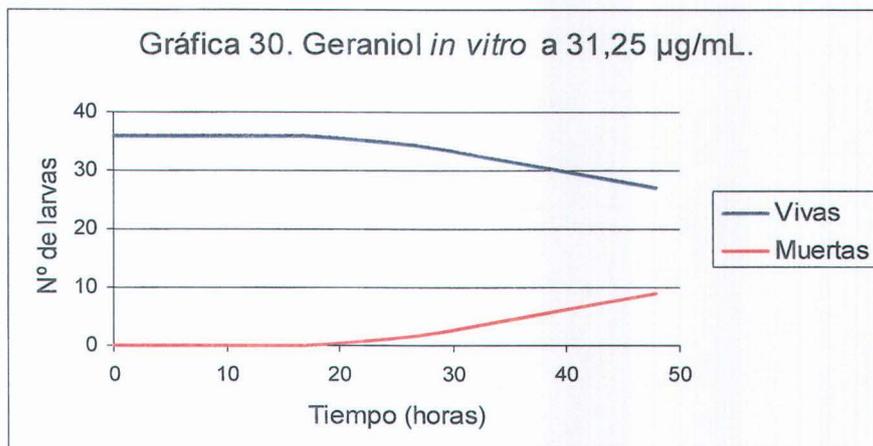
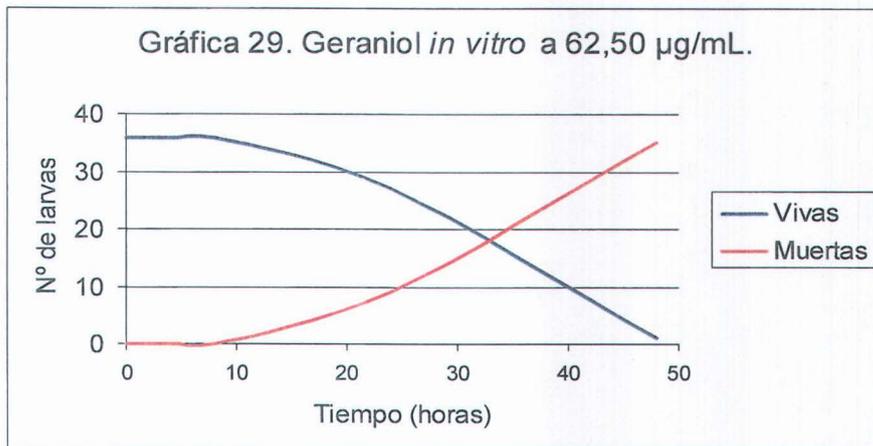
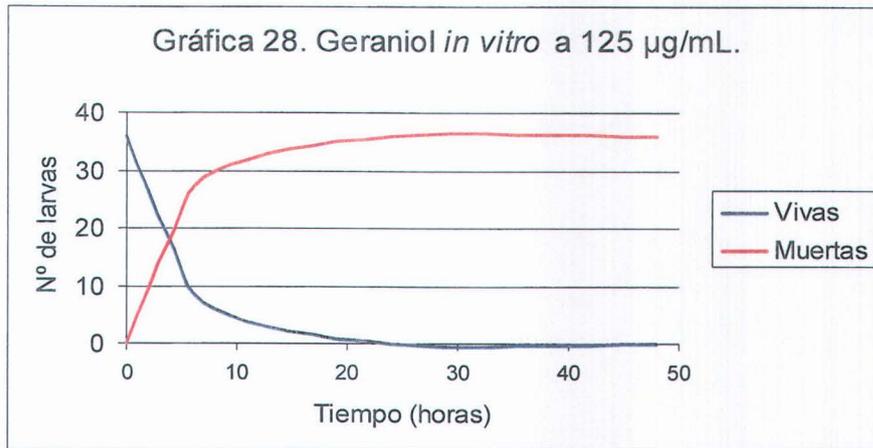




En el caso del geraniol, derivado monoterpénico alcohólico, la actividad máxima se observa transcurridas 24 horas del inicio del ensayo con la mayor de las concentraciones ensayadas ( $SM_{24\text{ h}} = 0\%$ ), siendo la letalidad a las 4 horas de un 50 % ( $SM_{4\text{ h}} = 50\%$ ), por lo que la  $S_{50}$  es de 4 horas (Gráfica 28). En la concentración intermedia, a las 24 horas del comienzo un 75 % de larvas permanecen vivas, y la  $S_{50}$  (Gráfica 29) es de 33 horas, llegando 1 L<sub>3</sub> viva a las 48 horas. A 31,25 µg/mL de concentración, ( $SM_{48\text{ h}} = 75\%$ ), más de dos tercios de las larvas siguen vivas al final de la experiencia ( $S_{\text{máx}} = 27$ ) (Tabla 19).

**Tabla 19.** Actividad larvicida *in vitro* del geraniol frente a *A. simplex* s.l..

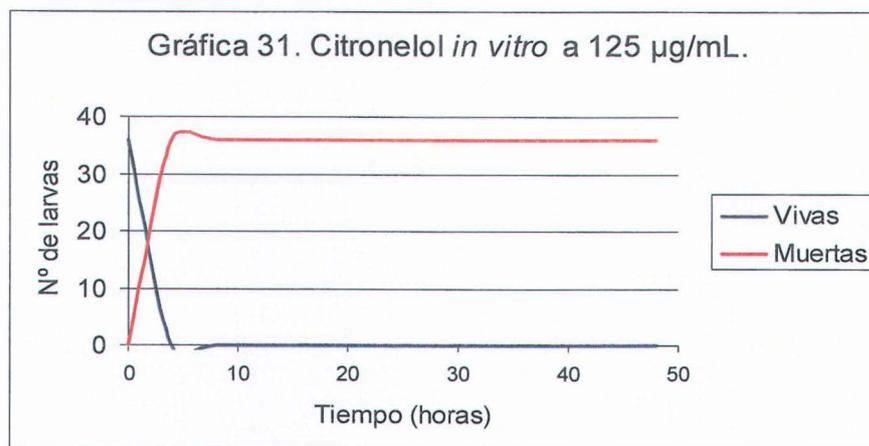
GERANIOL	Nº L <sub>3</sub>	SUPERVIVENCIA MEDIA				S <sub>50</sub>	S <sub>máx</sub>
		4 h	8 h	24 h	48 h		
125 µg/ml	36	50 %	16,60 %	0	0	4h	0
62,50 µg/ml	36	100 %	100 %	75 %	2,70 %	33 h	1
31,25 µg/ml	36	100 %	100 %	97,20 %	75 %	-	27

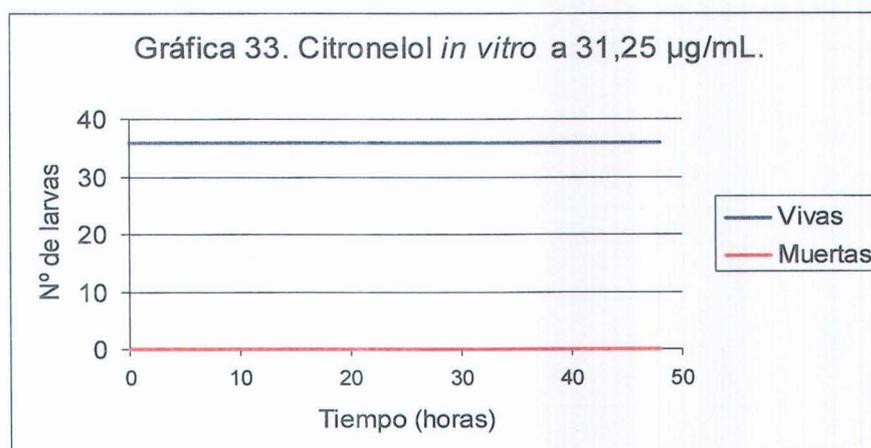
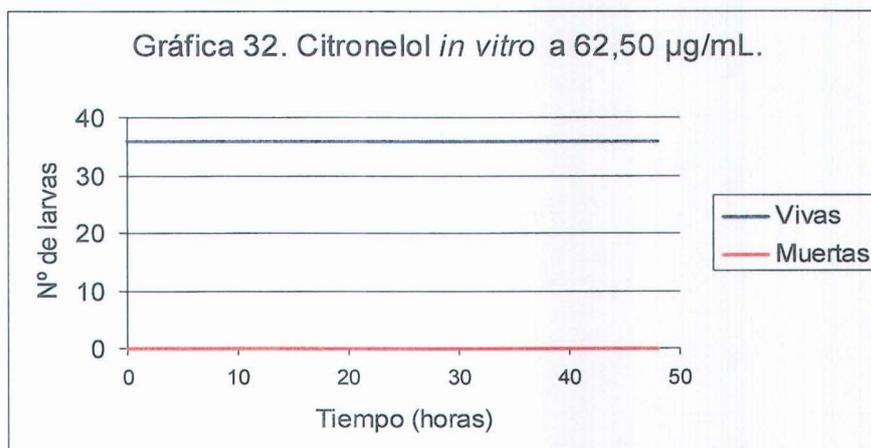


El citronelol, a la máxima concentración ensayada (125 µg/mL) logra un efecto larvica máximo (SM = 0) ya en la primera lectura de las pruebas, realizada a las 4 horas del inicio de la experiencia. A la mitad de concentración (62,50 µg/mL), no tiene ningún efecto sobre la supervivencia de las larvas de *A. simplex* s.l., ya que todas se encuentran vivas a las 48 horas (S<sub>máx</sub> = 36), al igual que cuando la concentración ensayada es de 31,25 µg/mL de producto (Tabla 20).

**Tabla 20.** Actividad larvica *in vitro* del citronelol frente a *A. simplex* s.l..

CITRONELOL	N° L <sub>3</sub>	SUPERVIVENCIA MEDIA				S <sub>50</sub>	S <sub>máx</sub>
		4 h	8 h	24 h	48 h		
125 µg/ml	36	0	0	0	0	-	0
62,50 µg/ml	36	100 %	100 %	100 %	100 %	-	36
31,25 µg/ml	36	100 %	100 %	100 %	100 %	-	36

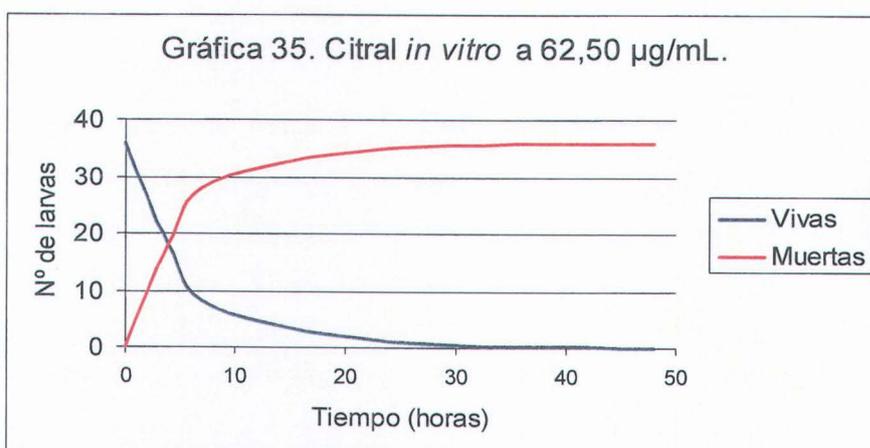
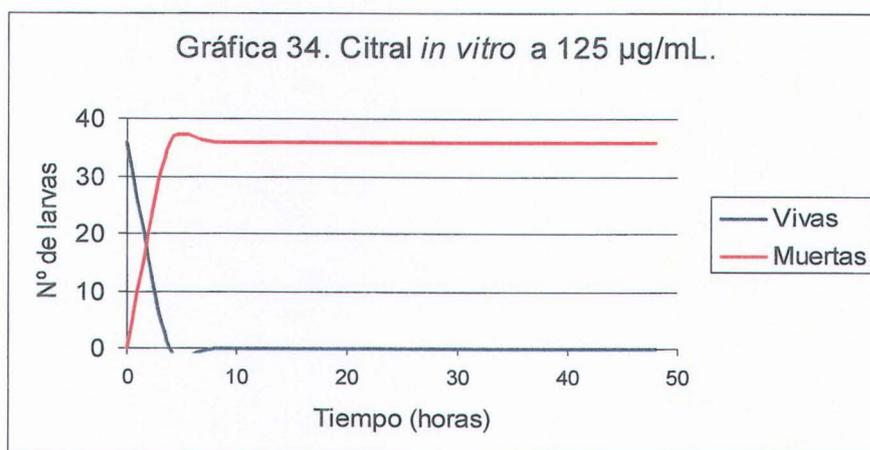


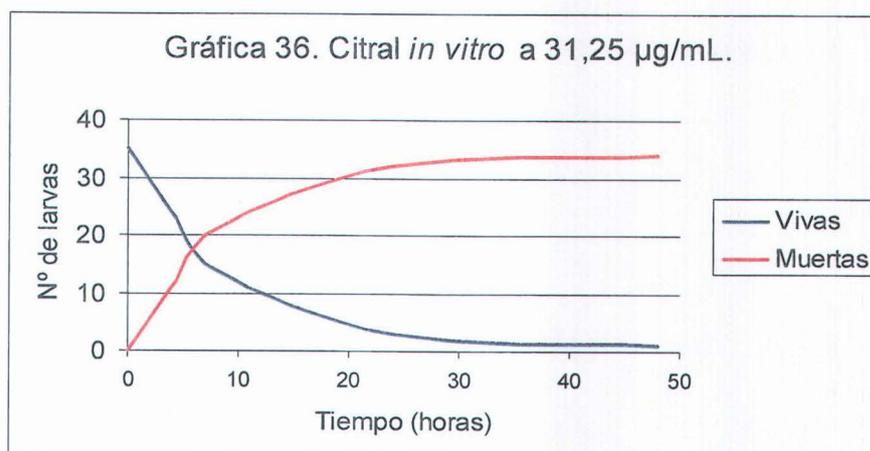


En cuanto a los derivados aldehídicos, el citral muestra un 100 % de actividad larvicida a la máxima concentración (125  $\mu\text{g/mL}$ ) ya desde la primera lectura del ensayo (Tabla 21), mientras que a la siguiente concentración (62,50  $\mu\text{g/mL}$ ), el efecto larvicida se reduce a la mitad a las 4 horas ( $SM_{4\text{ h}} = 50\%$ ), con una  $S_{50}$  de 4 horas (Gráfica 35), llegando al final de la experiencia con todas las larvas muertas ( $S_{\text{máx}} = 0$ ). Con 31,25  $\mu\text{g/mL}$  de compuesto, los resultados recogidos en la Tabla 19 muestran como a las 8 horas del inicio, menos de la mitad de las  $L_3$  están vivas ( $SM_{8\text{ h}} = 40\%$ ), observando una única larva viva a la conclusión del ensayo, siendo a las 5 horas y 30 minutos cuando la mitad de ellas están vivas (Gráfica 36).

**Tabla 21.** Actividad larvicida *in vitro* del citral frente a *A. simplex* s.l..

CITRAL	N° L <sub>3</sub>	SUPERVIVENCIA MEDIA				S <sub>50</sub>	S <sub>máx</sub>
		4 h	8 h	24 h	48 h		
125 µg/ml	36	0	0	0	0	-	0
62,50 µg/ml	36	50 %	19,40 %	2,70 %	0	4 h	0
31,25 µg/ml	35	68,50 %	40 %	8,50 %	2,80 %	5 h 30 min	1

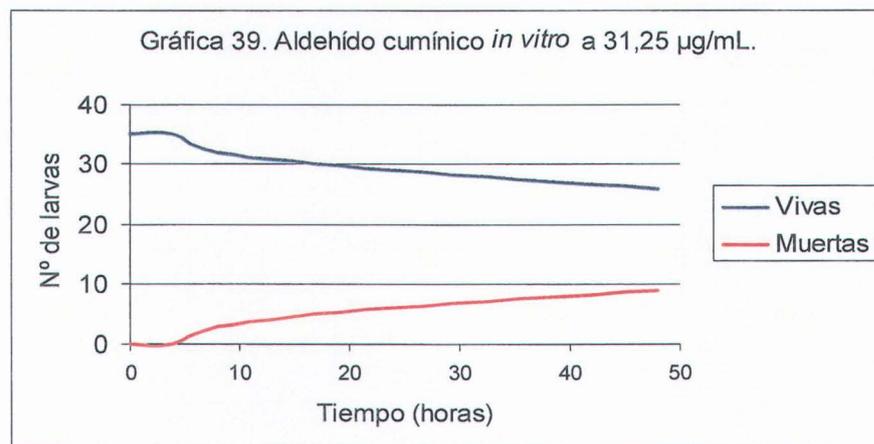
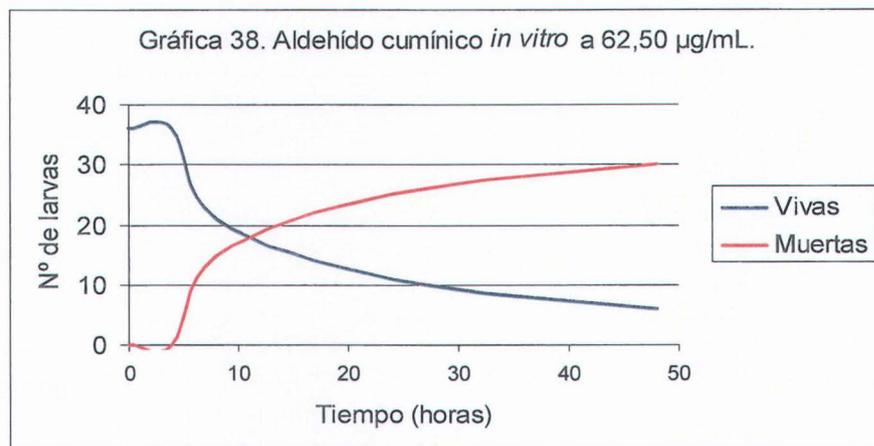
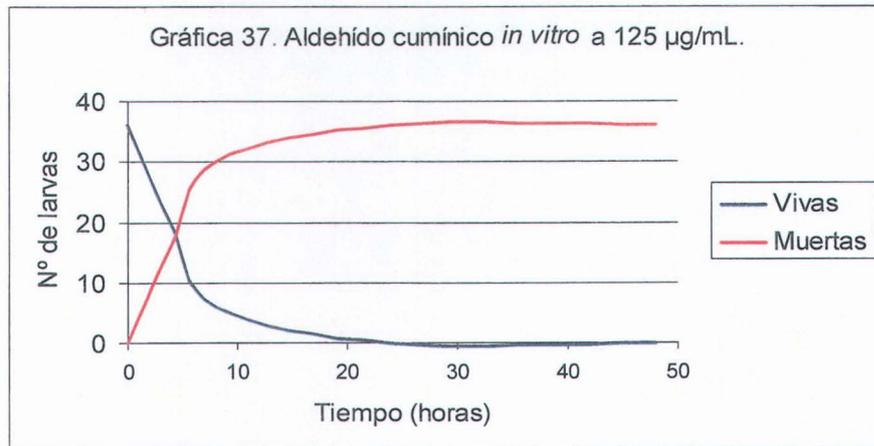




Para el aldehído cumínico (derivado aldehídico), en el caso de la concentración más alta (Tabla 22), todas las larvas de *A. simplex* s.l. aparecen muertas en la lectura de las 24 horas ( $SM_{24\text{ h}} = 0$ ), y la  $S_{50}$  se da a las 4 horas y 15 minutos (Gráfica 16). A la siguiente dilución de producto (62,50 µg/mL) la mitad de los anisákidos están vivos a las 11 horas de iniciado el ensayo (Gráfica 38), y seis  $L_3$  sobreviven al final del mismo ( $S_{\text{máx}} = 6$ ). En cuanto a la concentración de 31,25 µg/mL se obtiene un efecto larvicida que apenas sobrepasa del 25 % de larvas muertas a las 48 horas de lectura ( $SM_{48\text{ h}} = 74,20\%$ ), ya que 26 de ellas sobreviven al final del experimento.

Tabla 22. Actividad larvicida *in vitro* del aldehído cumínico frente a *A. simplex* s.l..

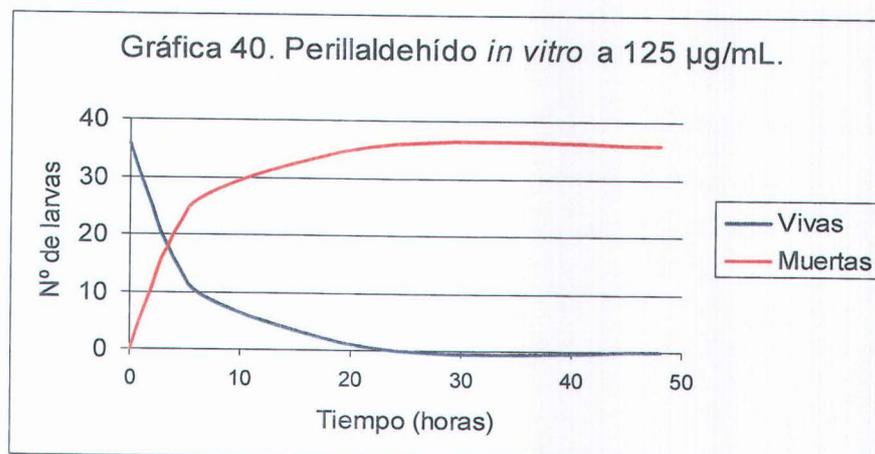
ALDEHÍDO CUMÍNICO	Nº $L_3$	SUPERVIVENCIA MEDIA				$S_{50}$	$S_{\text{máx}}$
		4 h	8 h	24 h	48 h		
125 µg/ml	36	55,50 %	16,60 %	0	0	4h 15 min	0
62,50 µg/ml	36	100 %	58,30 %	30,50 %	16,60 %	11h	6
31,25 µg/ml	36	100 %	91,40 %	82,80 %	74,20 %	-	26

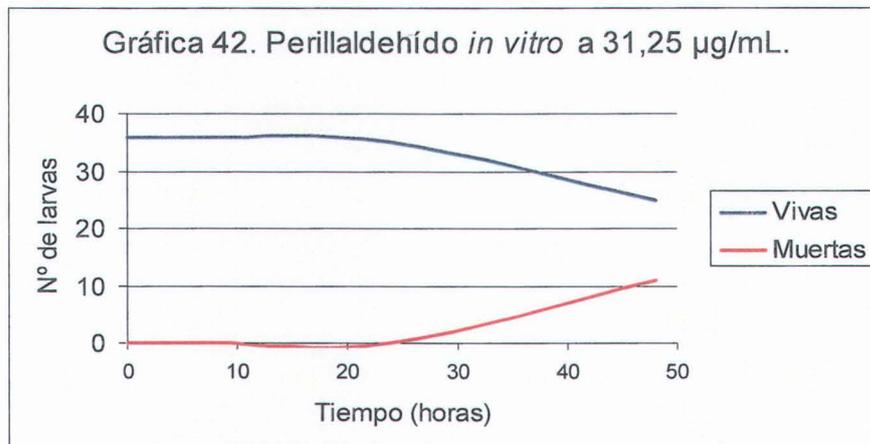
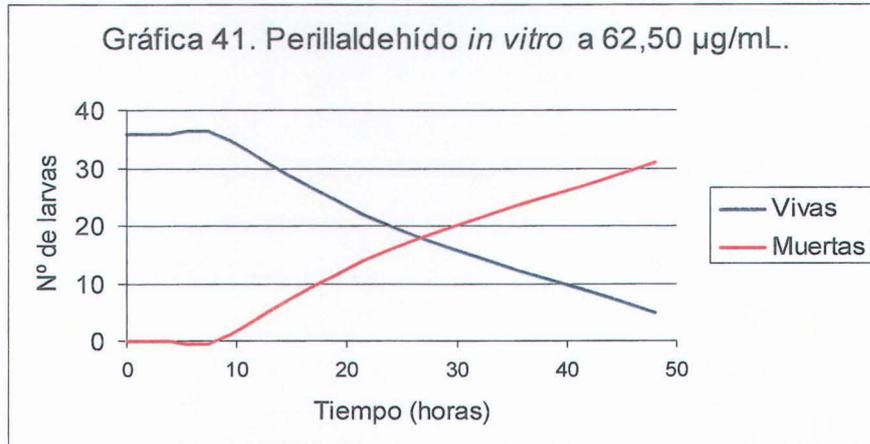


Con respecto al perillaldehído (Tabla 23), compuesto de referencia en nuestro estudio, a 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de concentración, más de la mitad de las larvas están muertas a las 4 horas ( $SM_{4\text{ h}} = 44,40\%$ ) y la totalidad de ellas a las 24 horas; la  $S_{50}$  es de 3 horas y 30 minutos (Gráfica 40). Para la concentración de 62,50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  no se observa efecto alguno sobre la supervivencia de las  $L_3$  transcurridas 24 horas ( $SM_{24\text{ h}} = 55,50\%$ ), pero sin llegar al 100 % de letalidad ya que al final sobreviven cinco de ellas ( $S_{\text{máx}} = 5$ ), con una  $S_{50}$  de 26 horas y 45 minutos (Gráfica 41). En el caso de la menor de las concentraciones probadas, la supervivencia es inferior al 70 % al término de la experiencia ( $SM_{48\text{ h}} = 69,40\%$ ), con un valor de  $S_{\text{máx}} = 25$ .

Tabla 23. Actividad larvicida *in vitro* del aldehído cumínico frente a *A. simplex* s.l..

PERILLALDEHIDO	N° $L_3$	SUPERVIVENCIA MEDIA				$S_{50}$	$S_{\text{máx}}$
		4 h	8 h	24 h	48 h		
125 $\mu\text{g}/\text{ml}$	36	44,40 %	22,20 %	0	0	3 h 30 min	0
62,50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	36	100 %	100 %	55,50 %	13,80 %	26 h 45 min	5
31,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	35	100 %	100 %	97,20 %	69,40 %	-	25





En cuanto a los controles usados en nuestros experimentos, tanto el de solución de NaCl al 0,9 % (control n°1), como el de etanol al 1 % (control n°2), los resultados muestran que en ambos el 100 % de las larvas de *A. simplex* s.l. sobreviven durante el transcurso de los ensayos *in vitro*.

#### 4. ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LAS LARVAS DE *Anisakis simplex* s.l. DE LOS ENSAYOS *IN VITRO*

Mediante técnicas habituales en histología se han realizado cortes de 3  $\mu\text{m}$  de grosor; las tinciones empleadas han sido hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson (García del Moral, 1993).

El carvacrol, a la concentración de 125  $\mu\text{g/mL}$ , actúa sobre las larvas de *A. simplex* s.l. alterando la cutícula del parásito, con proyecciones de la misma hacia el exterior; la célula excretora resulta lisada, sobre todo a la altura del esófago así como el intestino proximal; por último, el intestino sufre ruptura de la pared luminal (Fotos 12 y 13). A la mitad de concentración (62,50  $\mu\text{g/mL}$ ) los daños se reducen a los localizados en intestino (Foto 14). No se ha podido proceder a la realización del estudio histológico en el caso de la concentración de 31,25  $\mu\text{g/mL}$  ya que todas las  $L_3$  llegan vivas al final del experiencia.

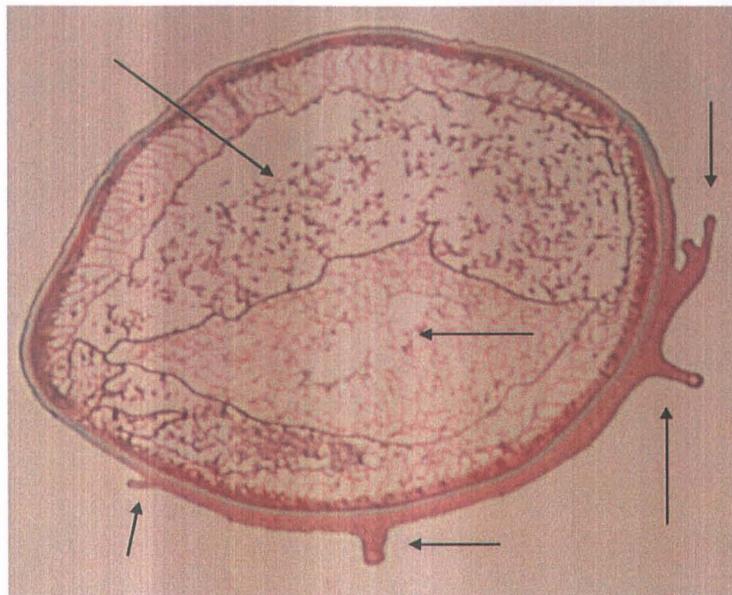
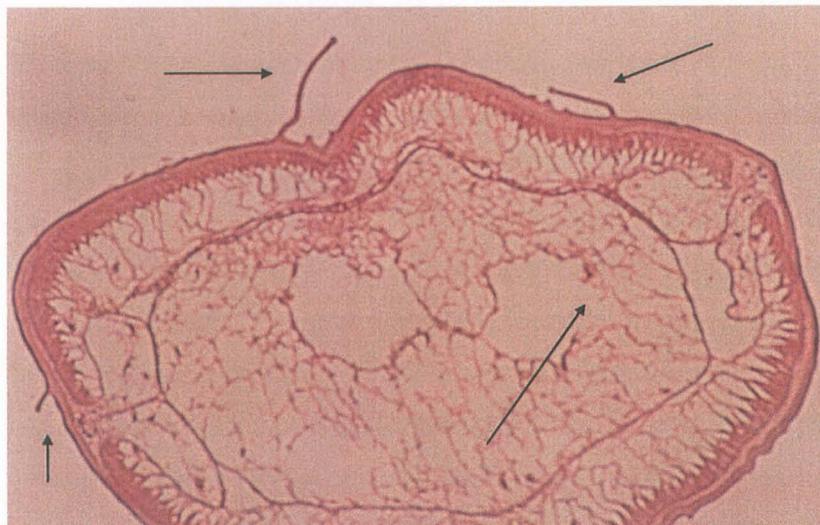
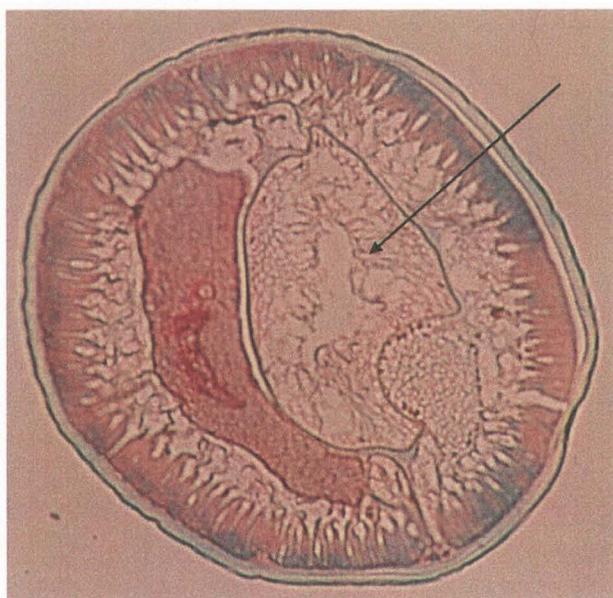


Foto 12. Intestino proximal de  $L_3$  de *A. simplex* s.l.. Daños producidos por carvacrol (125  $\mu\text{g/mL}$ ) en cutícula, célula excretora e intestino.

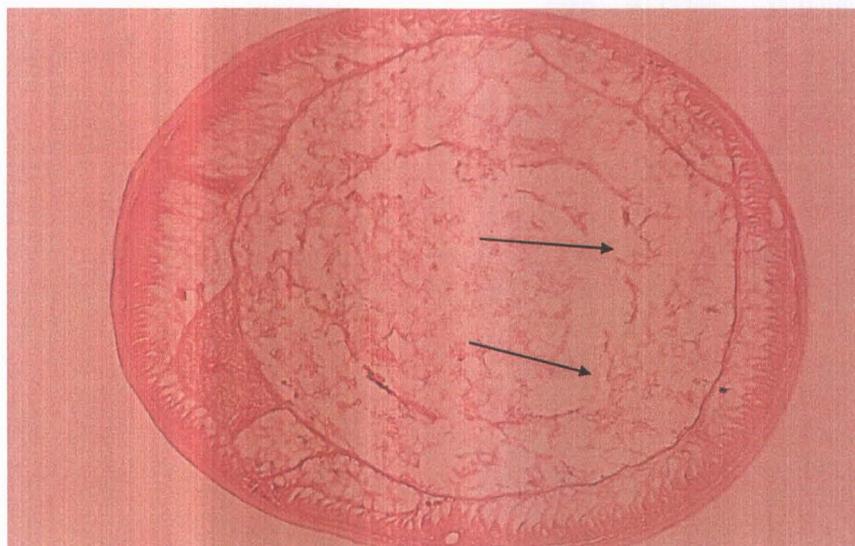


**Foto 13.** Intestino medio. Alteraciones de la cutícula e intestino (carvacrol a 125 µg/mL).

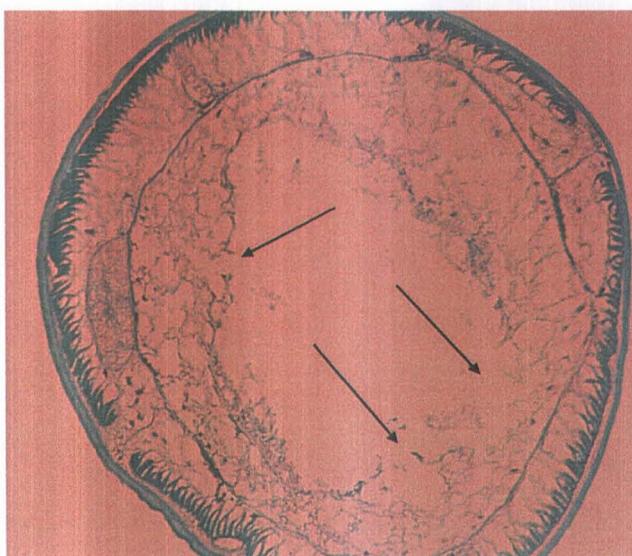


**Foto 14.** Zona de transición ventrículo-intestino. Lesiones intestinales (carvacrol a 62,50 µg/mL). Tinción tricrómica de Masson.

El timol (derivado fenólico), a las concentraciones de 125 y 62,50  $\mu\text{g/mL}$ , produce un alteración en el intestino del parásito, con dilatación de su luz, la lisis de la cara luminal y aparición de material celular en la luz intestinal (Fotos 15 y 16). Otras estructuras no aparecen dañadas.

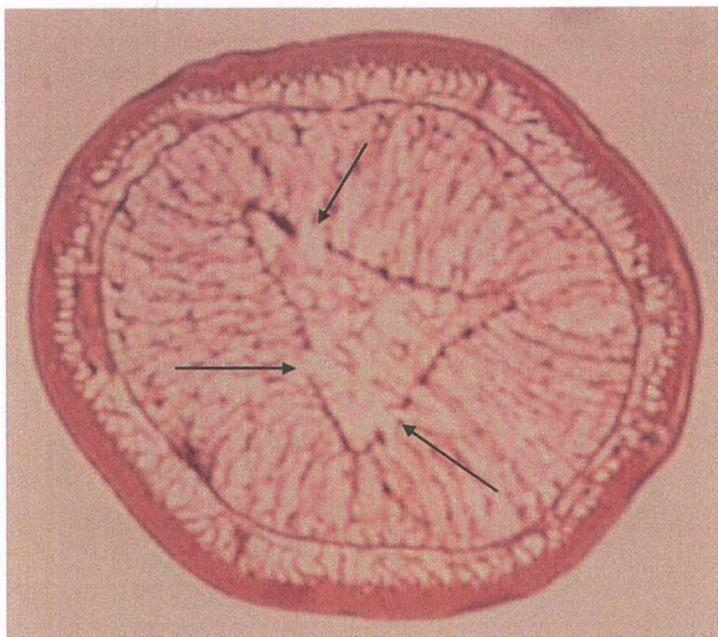


**Foto 15.** Intestino proximal. Daños intestinales (timol a 62,50  $\mu\text{g/mL}$ ).



**Foto 16.** Intestino proximal. Leiones intestinales (timol a 62,50  $\mu\text{g/mL}$ ).Tricrómica de Masson.

La acción del geraniol sobre el parásito se localiza a lo largo del intestino (desde la zona de transición ventrículo-intestino) provocando una mayor apertura de su luz, alteración y rotura de su cara luminal, y presencia de material celular en el lumen (Foto 17). Estos daños son apreciables en todos los cortes realizados y a las tres concentraciones probadas, no obstante a 62,50  $\mu\text{g/mL}$  son más leves y fundamentalmente se localizan en la parte posterior del intestino de la larva (Foto 18). A la mínima concentración de geraniol (31,25  $\mu\text{g/mL}$ ) se observa la cutícula del nematodo seriamente afectada, proyectándose en forma de cuernos hacia el exterior (Foto 19). No se observan daños en el esófago en ningún corte.



**Foto 17.** Intestino proximal. Daños intestinales (geraniol a 125  $\mu\text{g/mL}$ ).

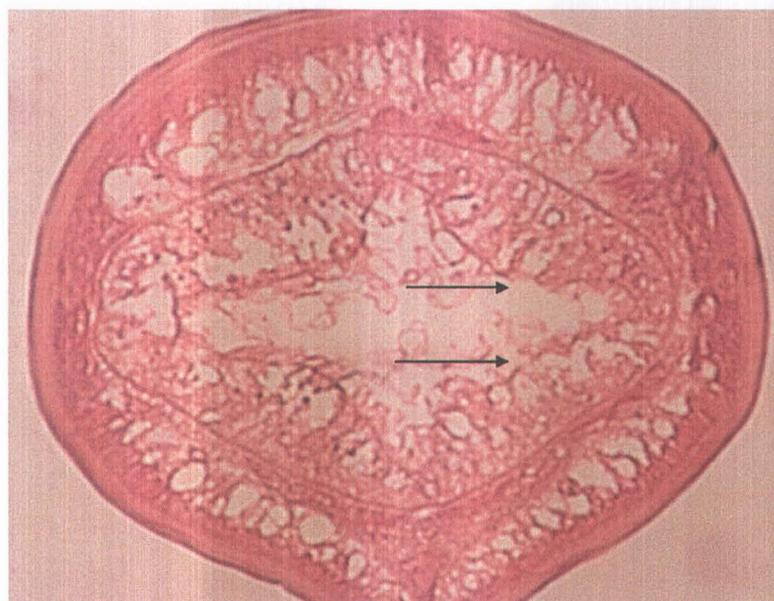


Foto 18. Intestino distal. Lesiones intestinales (geraniol a 62,50  $\mu\text{g/mL}$ ).

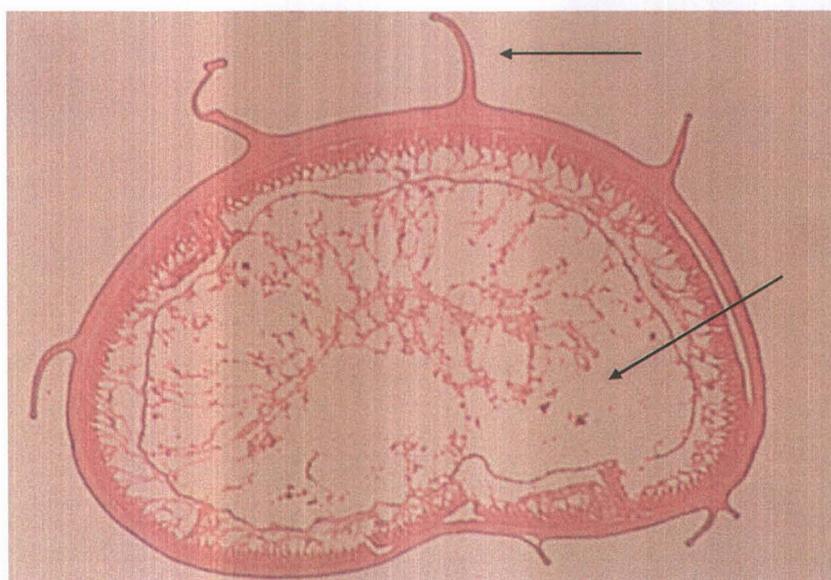
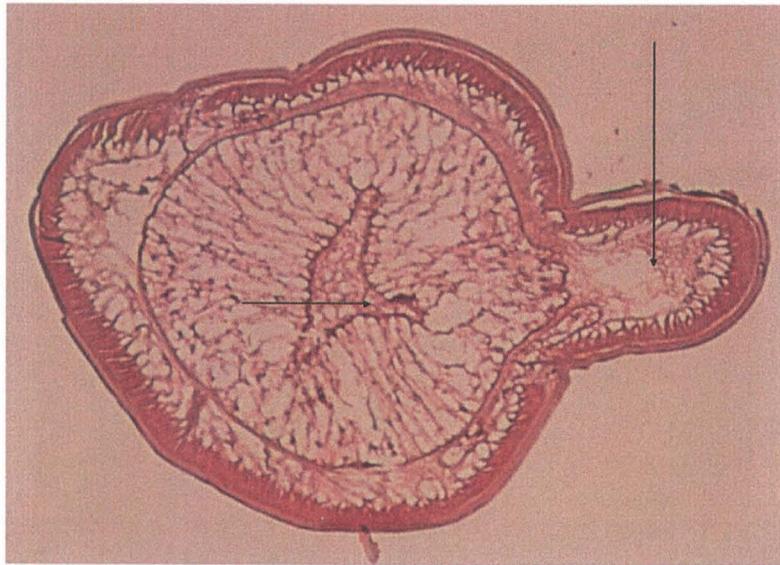


Foto 19. Intestino medio. Daños intestinales y cuticulares (geraniol a 31,25  $\mu\text{g/mL}$ ).

En el caso del citronelol, cuya eficacia se circunscribió a la concentración de (125 µg/mL), se observa como el efecto del compuesto tiene lugar en el intestino del parásito, con lisis de su cara luminal, llegando a romper la cara opuesta del intestino, encontrándose afectada la capa muscular del parásito; se observa la formación de una especie de pompa bajo la cutícula externa, con la consiguiente deformación de la misma (Foto 20).



**Foto 20.** Intestino medio. Lesiones intestinales y musculares (citronelol a 125 µg/mL).

El citral, produce *in vitro* la alteración y lisis de la pared interna del esófago, también produce daños a todo lo largo del intestino de las larvas, apareciendo material celular en la luz del mismo. Igualmente se observan rugosidades en distintas zonas de la cutícula. Estas lesiones y alteraciones son más patentes a la máxima concentración de compuesto (125 µg/mL), y son menos marcadas a medida que disminuye la concentración (Fotos 21 y 22). La célula excretora no se ve afectada.

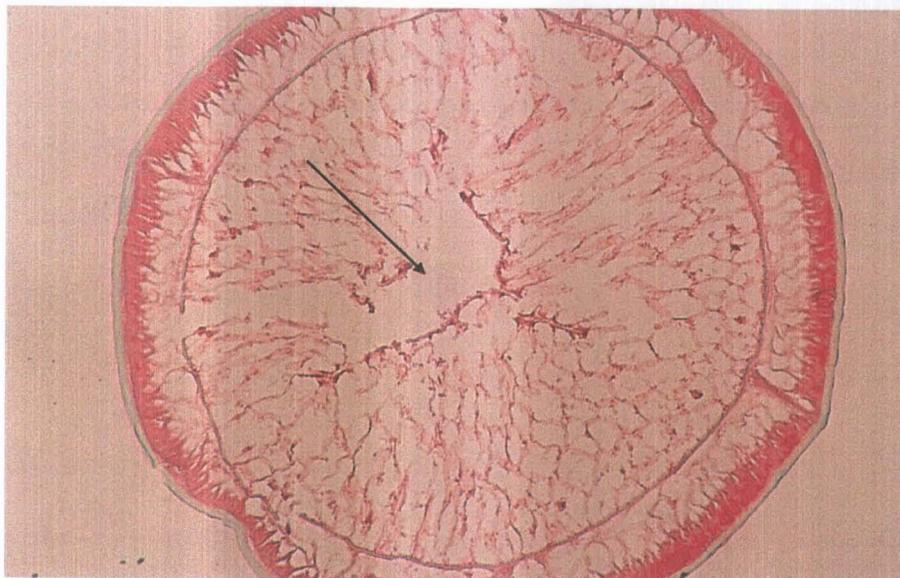


Foto 21. Intestino medio. Daños intestinales (citral 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Tinción tricrómica de Masson.

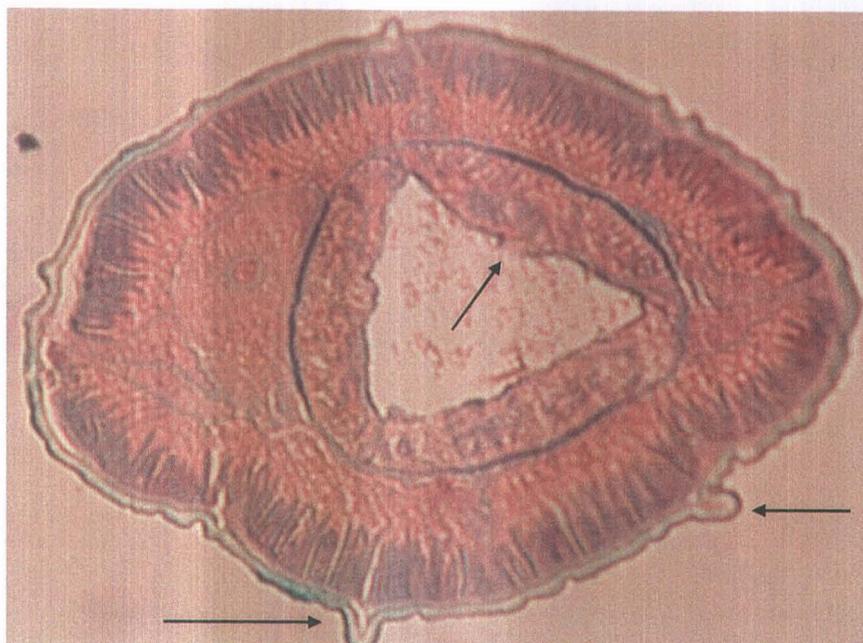
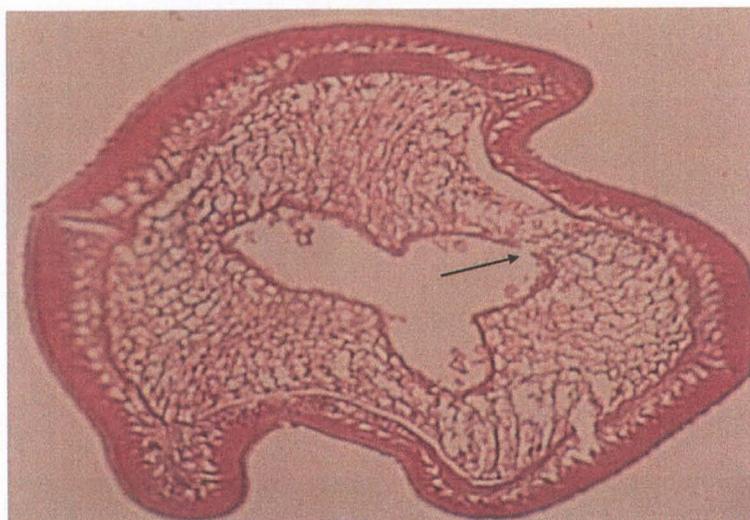
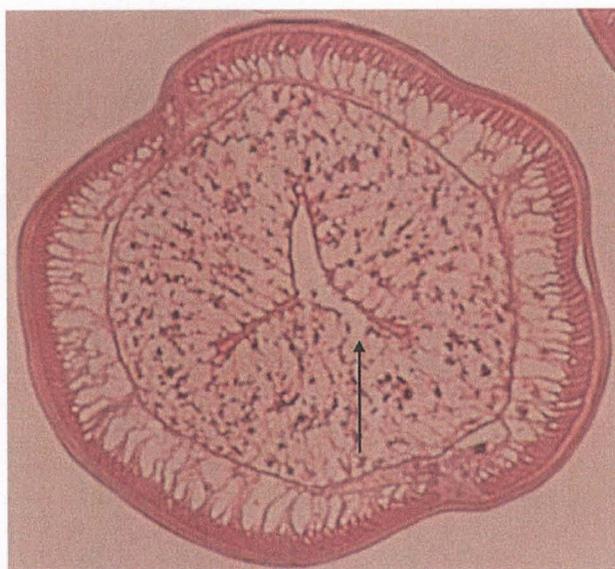


Foto 22. Ventrículo. Lesiones esofágicas y cuticulares (citral a 62,50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Tricrómica de Masson.

Las lesiones producidas por el aldehído cumínico *in vitro* (125 µg/mL) se localizan en el intestino de las L<sub>3</sub> de *A. simplex* s.l., dañando su cara luminal (Foto 23). Estos daños disminuyen notablemente a la concentración de 62,50 µg/mL (Foto 24), y desaparecen completamente a la menor de las ensayadas (31,25 µg/mL).



**Foto 23.** Intestino medio. Alteraciones intestinales (aldehído cumínico 125 µg/mL).



**Foto 24.** Intestino medio. Levisimas lesiones intestinales (aldehído cumínico a 62,50 µg/mL).

El perillaldehído (compuesto de referencia), provoca en las larvas estudiadas *in vitro* la ruptura de las células intestinales del parásito en la cara luminal (125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Fotos 25 y 26). El esófago (preventricular y ventrículo) aparece intacto. Estos daños son menos patentes a 62,50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , no observándose en el caso de la menor concentración ensayada (31,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

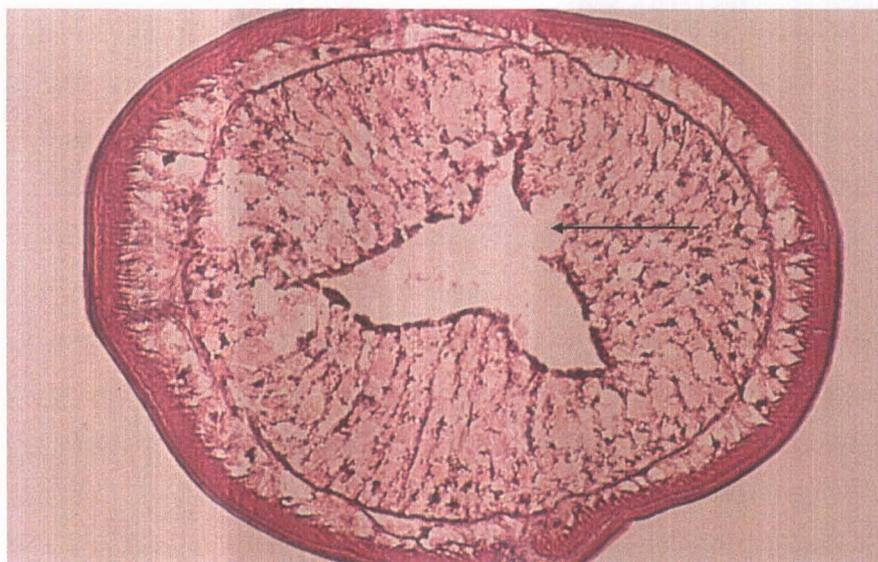


Foto 25. Intestino medio. Daños intestinales (perillaldehído a 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

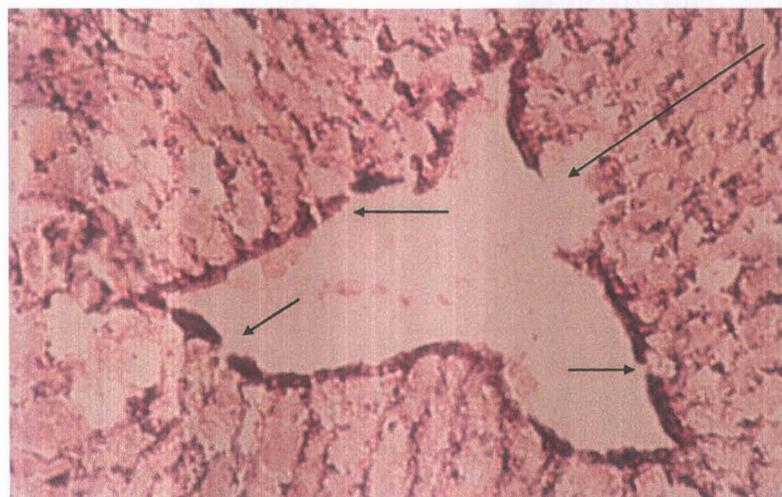


Foto 26. Mismo corte de la Foto 25 visto a mayor aumento.

## 5. ENSAYOS *IN VIVO* DE LOS COMPONENTES DE LOS ACEITES ESENCIALES

El primero de los derivados fenólicos probado *in vivo* es el carvacrol. En el Modelo A (infestación y tratamiento conjuntos), más de una cuarta parte de los animales de experimentación sufre hemorragias (28,57 %), localizadas siempre en estómago, y solamente una larva aparece en la cavidad abdominal. La mayor proporción de las L<sub>3</sub> vivas se encuentran en: estómago (49, cinco de ellas fijadas o atravesando la pared gástrica), e intestino delgado (17). El número de larvas muertas se reduce a once, todas en estómago. El porcentaje de nematodos no recuperado al final del experimento es del 2,38 % (Tabla 24).

En lo que respecta al modelo B (tratamiento a las 2 horas de la infestación y sacrificio a las 4 horas), el 71,43 % de las ratas presenta hemorragias, con un porcentaje de anisákidos recuperados en cavidad corporal del 9,64 %. El número de larvas muertas en este ensayo *in vivo* es una, en estómago; las L<sub>3</sub> vivas se distribuyen por distintas partes del tubo digestivo (41 en estómago, 16 en intestino delgado, 10 en ciego) y tres de ellas fueron recogidas en las heces de la jaula.

En el Modelo C el porcentaje de hemorragias en ratas es del 57,14 %, con un aumento de las larvas halladas en cavidad (19,28 %). En estómago se encontraron ocho L<sub>3</sub> vivas, una de ellas fija a la pared gástrica. En este caso, una gran parte de los parásitos se recupera en las heces de la jaula (24,21 %) y siempre vivos. Sólo el 2,40 % de *Anisakis* aparecen muertos en este modelo. De las 83 larvas empleadas en esta experiencia, 18 no se recuperan al final de la misma (21,69 %).

Tabla 24. Estudio *in vivo* del carvacrol (9,50 mg/0,5 mL) frente a *A. simplex* s.l..

CARVACROL	MODELO A		MODELO B		MODELO C	
Nº de ratas	14		14		14	
Nº de L <sub>3</sub>	84		83		83	
<b>Hemorragias (% ratas)</b>	28,57		71,43		57,14	
Estómago (nº ratas)	4		10		7	
Ciego (nº ratas)	0		0		1	
Resto intestino (nº ratas)	0		1*		1**	
	% L <sub>3</sub>	Nº de L <sub>3</sub>	% L <sub>3</sub>	Nº de L <sub>3</sub>	% L <sub>3</sub>	Nº de L <sub>3</sub>
<b>Cavidad</b>	1,19	1	9,64	8	19,28	16
<b>Estómago</b>						
Muertas	13,10	11	1,20	1	0	0
Vivas	58,33	49	49,40	41	9,64	8
Fijas (L <sub>3</sub> fijas/L <sub>3</sub> vivas)	-	5/49	-	10/41	-	1/8
<b>Intestino delgado</b>						
Muertas	0	0	0	0	0	0
Vivas	20,24	17	19,28	16	8,43	7
Fijas (L <sub>3</sub> fijas/L <sub>3</sub> vivas)	-	0/17	-	0/16	-	0/7
<b>Intestino grueso</b>						
Muertas	0	0	0	0	1,20	1
Vivas	0	0	0	0	2,41	2
Fijas (L <sub>3</sub> fijas/L <sub>3</sub> vivas)	-	0	-	0	-	0/2
<b>Ciego</b>						
Muertas	0	0	0	0	1,20	1
Vivas	4,76	4	12,05	10	12,05	10
Fijas (L <sub>3</sub> fijas/L <sub>3</sub> vivas)	-	0/4	-	0/10	-	0/10
<b>Heces</b>						
Muertas	0	0	0	0	0	0
Vivas	0	0	3,61	3	24,21	20
<b>No recuperadas</b>	2,38	2	4,82	4	21,69	18

\*Hemorragia en el intestino delgado.

\*\*Hemorragia en el intestino grueso (cólon).

El Modelo A de ensayos *in vivo* con el timol (derivado fenólico), muestra como ninguno de los animales de experimentación sufre hemorragias, no recuperándose ninguna larva en cavidad, una vez sacrificados los animales. El 53,57 % de ellas aparecen muertas en estómago, y el 32,14 % vivas, de las cuales una está fijada a la pared del mismo. El resto de L<sub>3</sub> se localizaron diez vivas en intestino delgado y dos no se recuperaron.

Cuando se aplicó el Modelo B con el timol, el porcentaje de ratas con hemorragias fue 46,67 %, todas gástricas; dos larvas de *A. simplex* s.l. aparecen muertas, ambas en estómago, mientras que las 84 restantes se recuperaron vivas a todo lo largo del tracto gastrointestinal y en cavidad (7,95 % del total). El 59,10 % del total las encontramos vivas en estómago, con un importante número de ellas intentando atravesar su pared (20 de 52). Las larvas no recuperadas fueron dos.

En el tercer y último ensayo con timol *in vivo* (Modelo C), 17 L<sub>3</sub> de 69 empleadas las encontramos muertas, ocho en estómago, una en intestino grueso y 8 más en ciego. De las once que se recuperan vivas en estómago, tres están fijas a su pared. El 34,78 % se encontraban en cavidad abdominal, un 7,25 % no se encontró y un 5,80 % en las heces. En esta prueba, más de la mitad de las ratas (53,85 %) presentó hemorragias, en su mayoría gástricas, salvo una en colon y otra en ciego. (Tabla 25).

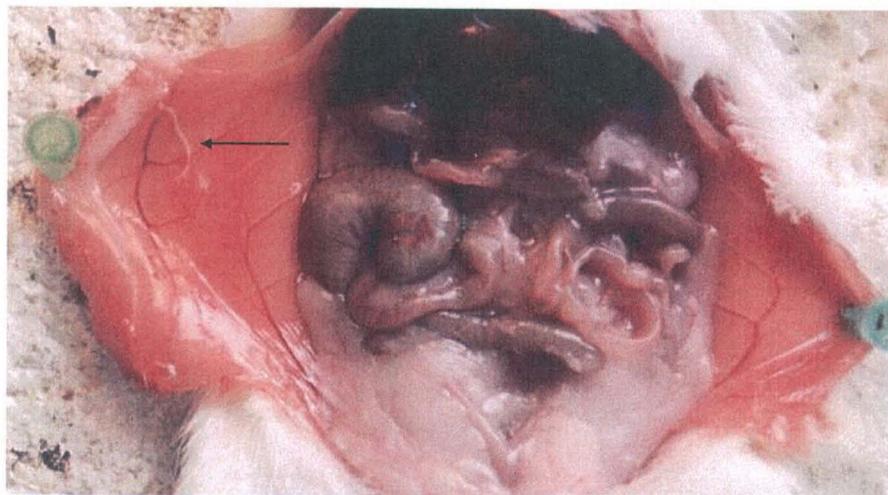


Foto 27. L<sub>3</sub> viva en cavidad abdominal penetrando en la musculatura ventral del animal.

Tabla 25. Estudio *in vivo* del timol (17,30 mg/0,5 mL) frente a *A. simplex* s.l..

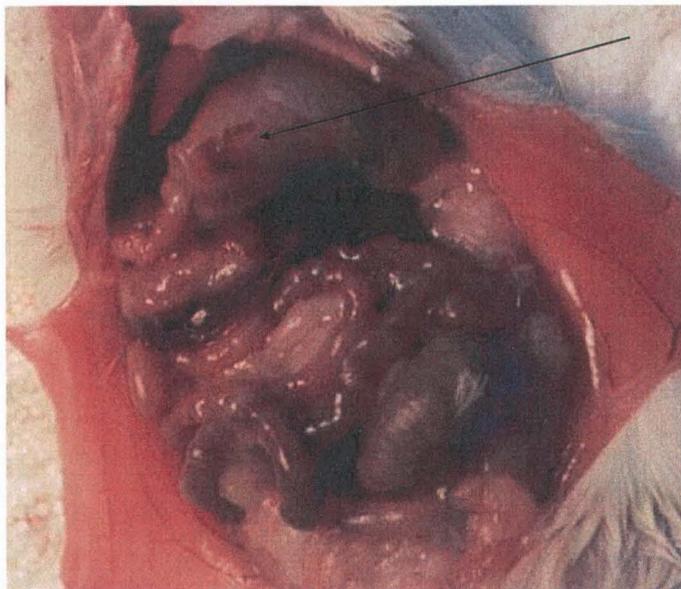
TIMOL	MODELO A		MODELO B		MODELO C	
N° de ratas	14		15		13	
N° de L <sub>3</sub>	84		88		69	
Hemorragias (% ratas)	0		46,67		53,85	
Estómago (n° ratas)	0		7		7	
Ciego (n° ratas)	0		0		1	
Resto intestino (n° ratas)	0		0		1*	
	% L <sub>3</sub>	N° de L <sub>3</sub>	% L <sub>3</sub>	N° de L <sub>3</sub>	% L <sub>3</sub>	N° de L <sub>3</sub>
<b>Cavidad</b>	0	0	7,95	7	34,78	24
<b>Estómago</b>						
Muertas	53,57	45	2,73	2	11,59	8
Vivas	32,14	27	59,10	52	15,94	11
Fijas (L <sub>3</sub> fijas/L <sub>3</sub> vivas)	-	1/27	-	20/52	-	3/11
<b>Intestino delgado</b>						
Muertas	0	0	0	0	0	0
Vivas	11,90	10	18,18	16	4,35	3
Fijas (L <sub>3</sub> fijas/L <sub>3</sub> vivas)	-	0/10	-	0/16	-	0/3
<b>Intestino grueso</b>						
Muertas	0	0	0	0	1,45	1
Vivas	0	0	0	0	0	0
Fijas (L <sub>3</sub> fijas/L <sub>3</sub> vivas)	-	0	-	0	-	0
<b>Ciego</b>						
Muertas	0	0	0	0	11,59	8
Vivas	0	0	10,23	9	7,25	5
Fijas (L <sub>3</sub> fijas/L <sub>3</sub> vivas)	-	0	-	0/9	-	0/5
<b>Heces</b>						
Muertas	0	0	0	0	0	0
Vivas	0	0	0	0	5,80	4
<b>No recuperadas</b>	2,38	2	2,73	2	7,25	5

\*Hemorragia en el intestino grueso (c6lon).

En el ensayo *in vivo* del geraniol (Modelo A), se ha observado que ninguno de los animales de experimentación ha sufrido hemorragias. Todas las larvas recogidas del estómago aparecen muertas (92,77 % del total de larvas administradas). De las restantes larvas de *A. simplex* s.l., cuatro se han hallado en intestino delgado, dos vivas y dos muertas, y dos no se han recuperado.

En el Modelo B *in vivo* el número de L<sub>3</sub> muertas fue nueve, todas en estómago. De las restantes larvas vivas, 33 se encontraron en estómago (seis de ellas fijadas), mientras que en intestino delgado se localizaron trece, de las cuales una estaba fijada. Todas las hemorragias observadas son gástricas (Tabla 26).

El Modelo C del geraniol presentó un 35,71 % de los animales de experimentación con hemorragias en estómago, ciego e intestino grueso. En cavidad se ha encontrado un 3,57% de L<sub>3</sub>; igual porcentaje de vivas hay en estómago, junto con un 34,52 % de muertas. Aparecen igualmente larvas en intestino delgado (siete vivas), intestino grueso (una muerta y cuatro vivas), ciego (trece vivas) y heces (una muerta y catorce vivas). De todas las larvas vivas, ninguna se encuentra fijada o atravesando las paredes gastrointestinales. En este caso, el número de nematodos que no logramos recuperar es nueve (10,71 %).



**Foto 28.** Hemorragia gástrica producida por larva L<sub>3</sub> de *A. simplex* s.l.

Tabla 26. Estudio *in vivo* del geraniol (46,90 mg/0,5 mL) frente a *A. simplex* s.l..

GERANIOL	MODELO A		MODELO B		MODELO C	
Nº de ratas	14		13		14	
Nº de L <sub>3</sub>	83		76		84	
Hemorragias (% ratas)	0		46,15		35,71	
Estómago (nº ratas)	0		6		3	
Ciego (nº ratas)	0		0		2	
Resto intestino (nº ratas)	0		0		1*	
	% L <sub>3</sub>	Nº de L <sub>3</sub>	% L <sub>3</sub>	Nº de L <sub>3</sub>	% L <sub>3</sub>	Nº de L <sub>3</sub>
<b>Cavidad</b>	0	0	2,63	2	3,57	3
<b>Estómago</b>						
Muertas	92,77	77	11,84	9	34,52	29
Vivas	0	0	43,42	33	3,57	3
Fijas (L <sub>3</sub> fijas/L <sub>3</sub> vivas)	-	0	-	6/33	-	0/3
<b>Intestino delgado</b>						
Muertas	2,41	2	0	0	0	0
Vivas	2,41	2	17,11	13	8,33	7
Fijas (L <sub>3</sub> fijas/L <sub>3</sub> vivas)	-	0/2	-	1/13	-	0/7
<b>Intestino grueso</b>						
Muertas	0	0	0	0	1,19	1
Vivas	0	0	0	0	4,76	4
Fijas (L <sub>3</sub> fijas/L <sub>3</sub> vivas)	-	0	-	0	-	0/4
<b>Ciego</b>						
Muertas	0	0	0	0	0	0
Vivas	0	0	11,84	9	15,48	13
Fijas (L <sub>3</sub> fijas/L <sub>3</sub> vivas)	-	0	-	0/9	-	0/13
<b>Heces</b>						
Muertas	0	0	0	0	1,19	1
Vivas	0	0	5,26	4	16,67	14
<b>No recuperadas</b>	2,41	2	7,89	6	10,71	9

\*Hemorragia en el intestino grueso (cólon).

En el Modelo A con citronelol, derivado alcohólico, el porcentaje de anisákidos que observamos muertos es el 67,53 % del total, hallados todos en estómago (Tabla 27). Se recuperaron el 100 % de larvas empleadas (77), con la siguiente distribución: 16 vivas en estómago, y nueve vivas en el intestino delgado (una fija a la pared). No se observaron hemorragias.

En el Modelo B el 38,46 % de las ratas presenta hemorragias gástricas, siendo el porcentaje de larvas muertas del 6,76 %. El resto, salvo tres no recuperadas, se encontraron vivas en cavidad (16,22 %), estómago (45,95 %), intestino delgado (21,62 %) y ciego (5,41 %); tres de las 34 que se hallaron vivas en estómago estaban fijadas a la pared.

En el tercer modelo experimental se encontraron larvas en distintas localizaciones, siendo el número de parásitos muertos de 37 de 90 administrados (Tabla 25). Se observaron tres larvas fijadas a las paredes intestinales, una al intestino grueso y dos al ciego, y doce ya en cavidad. El número de larvas no recuperadas fue de diez, mientras que el 53,33 % de las ratas padeció hemorragias en estómago, ciego y recto.



**Foto 29.** Fuerte hemorragia gástrica con 1 L<sub>3</sub> en su interior atravesándola tangencialmente.

Tabla 27. Estudio *in vivo* del citronelol (46,90 mg/0,5 mL) frente a *A. simplex* s.l..

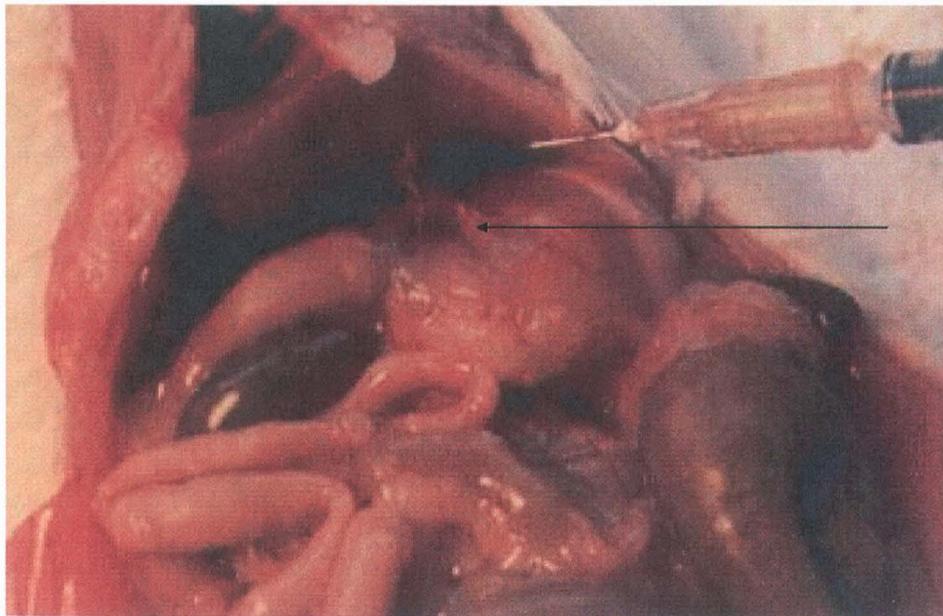
CITRONELOL	MODELO A		MODELO B		MODELO C	
	% L <sub>3</sub>	Nº de L <sub>3</sub>	% L <sub>3</sub>	Nº de L <sub>3</sub>	% L <sub>3</sub>	Nº de L <sub>3</sub>
Nº de ratas		13		13		15
Nº de L <sub>3</sub>		77		74		90
<b>Hemorragias (% ratas)</b>		0		38,46		53,33
Estómago (nº ratas)		0		5		4
Ciego (nº ratas)		0		0		3
Resto intestino (nº ratas)		0		0		1*
	% L <sub>3</sub>	Nº de L <sub>3</sub>	% L <sub>3</sub>	Nº de L <sub>3</sub>	% L <sub>3</sub>	Nº de L <sub>3</sub>
<b>Cavidad</b>	0	0	16,22	12	13,33	12
<b>Estómago</b>						
Muertas	67,53	52	6,76	5	38,89	35
Vivas	20,78	16	45,95	34	1,11	1
Fijas (L <sub>3</sub> fijas/L <sub>3</sub> vivas)	-	0/16	-	3/34	-	0/1
<b>Intestino delgado</b>						
Muertas	0	0	0	0	1,11	1
Vivas	11,69	9	21,62	16	2,22	2
Fijas (L <sub>3</sub> fijas/L <sub>3</sub> vivas)	-	1/9	-	0/16	-	0/2
<b>Intestino grueso</b>						
Muertas	0	0	0	0	0	0
Vivas	0	0	0	0	3,33	3
Fijas (L <sub>3</sub> fijas/L <sub>3</sub> vivas)	-	0	-	0	-	1/3
<b>Ciego</b>						
Muertas	0	0	0	0	1,11	1
Vivas	0	0	5,41	4	12,22	11
Fijas (L <sub>3</sub> fijas/L <sub>3</sub> vivas)	-	0	-	0/4	-	2/11
<b>Heces</b>						
Muertas	0	0	0	0	0	0
Vivas	0	0	0	0	15,56	14
<b>No recuperadas</b>	0	0	4,05	3	11,11	10

\*Hemorragia en el intestino grueso (recto).

Dentro del grupo de los derivados monoterpénicos aldehídicos, los resultados obtenidos con citral se expresan en la Tabla 28. Los ensayos realizados con el Modelo A muestran que 67 de las 78 L<sub>3</sub> administradas resultan muertas, en estómago (62) e intestino delgado (5). No se halla ninguna en cavidad abdominal. Tampoco se han observado hemorragias en ninguno de los animales. Del resto de larvas, cinco están vivas en estómago, intestino delgado y grueso, y seis no se recuperan.

En el siguiente modelo (B) las larvas muertas son el 37,77 % del total y sólo aparecen en estómago, donde también cuatro de las ocho larvas vivas están fijadas. El 61,54 % de las ratas presentaron hemorragias gástricas.

Con el Modelo C aumenta considerablemente el número de anisákidos en cavidad (17) y también el número de ratas que muestran hemorragias (10) en estómago y ciego. Las larvas muertas son el 33,75 % del total, la mayoría en estómago (30 %). Se han encontrado larvas vivas en el estómago (siete, de ellas seis fijas a la pared gástrica), intestino delgado (4), ciego (6) y heces (9), faltando por localizar diez (12,50 %).



**Foto 30.** Larva del nematodo saliendo del estómago por hemorragia gástrica.

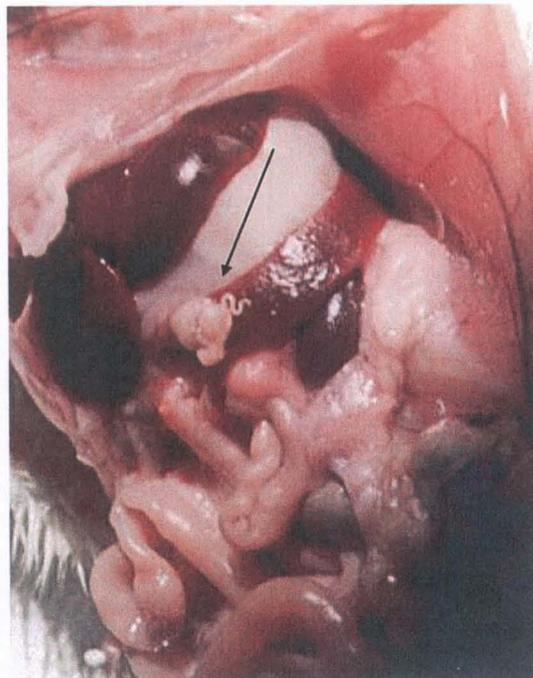
Tabla 28. Estudio *in vivo* del citral (46,90 mg/0,5 mL) frente a *A. simplex* s.l..

CITRAL	MODELO A		MODELO B		MODELO C	
	% L <sub>3</sub>	Nº de L <sub>3</sub>	% L <sub>3</sub>	Nº de L <sub>3</sub>	% L <sub>3</sub>	Nº de L <sub>3</sub>
Nº de ratas	13		13		14	
Nº de L <sub>3</sub>	78		77		80	
Hemorragias (% ratas)	0		61,54		71,42	
Estómago (nº ratas)	0		8		7	
Ciego (nº ratas)	0		0		3	
Resto intestino (nº ratas)	0		0		0	
	% L <sub>3</sub>	Nº de L <sub>3</sub>	% L <sub>3</sub>	Nº de L <sub>3</sub>	% L <sub>3</sub>	Nº de L <sub>3</sub>
<b>Cavidad</b>	0	0	5,19	4	21,25	17
<b>Estómago</b>						
Muertas	79,49	62	37,77	26	30	24
Vivas	2,56	2	10,39	8	8,75	7
Fijas (L <sub>3</sub> fijas/L <sub>3</sub> vivas)	-	0/2	-	4/8	-	6/7
<b>Intestino delgado</b>						
Muertas	6,41	5	0	0	1,25	1
Vivas	2,56	2	29,87	23	5	4
Fijas (L <sub>3</sub> fijas/L <sub>3</sub> vivas)	-	1/2	-	0/23	-	0/4
<b>Intestino grueso</b>						
Muertas	0	0	0	0	2,50	2
Vivas	1,28	1	0	0	0	0
Fijas (L <sub>3</sub> fijas/L <sub>3</sub> vivas)	-	0/1	-	0	-	0
<b>Ciego</b>						
Muertas	0	0	0	0	0	0
Vivas	0	0	6,49	5	7,50	6
Fijas (L <sub>3</sub> fijas/L <sub>3</sub> vivas)	-	0	-	0/5	-	0/6
<b>Heces</b>						
Muertas	0	0	0	0	0	0
Vivas	0	0	2,60	2	11,25	9
<b>No recuperadas</b>	7,69	6	11,69	9	12,50	10

En el estudio *in vivo* del aldehído cumínico (Modelo A), el porcentaje de larvas vivas al final del ensayo ha sido del 66,67 % (60,26 % en estómago y el resto en intestino delgado). Ninguna está fijada a la pared gástrica, y solamente una rata ha padecido hemorragia gástrica. El número de parásitos muertos ha sido 25, todos en estómago (32,05 % del total).

El porcentaje de larvas muertas desciende hasta el 4,88 % en el Modelo B (Tabla 29). Un 9,76 % de las L<sub>3</sub> de *A. simplex* s.l. no se hallaron. Seis de las catorce ratas del ensayo sufren hemorragias gástricas, y un 13,41 % de larvas están en cavidad. No se observaron anisákidos fijados a las paredes gastrointestinales. La mayoría de larvas se encontraron vivas en el intestino delgado (46,34 %).

En el Modelo C de infestación, no se encontraron larvas muertas; tampoco vivas fijadas a las paredes, si bien siete de ellas están en cavidad: estómago (3), intestino delgado (17), intestino grueso (1), ciego (30) y heces de jaula (21). Los animales con hemorragias en el tracto gastrointestinal son el 26,67 %, y el número de larvas que no se recuperaron fue de siete.



**Foto 31.** Larva en cavidad localizada en la grasa adyacente al páncreas

Tabla 29. Estudio *in vivo* del aldehído cumínico (26 mg/0,5 mL) frente a *A. simplex* s.l..

ALDEHÍDO CUMÍNICO	MODELO A		MODELO B		MODELO C	
	% L <sub>3</sub>	Nº de L <sub>3</sub>	% L <sub>3</sub>	Nº de L <sub>3</sub>	% L <sub>3</sub>	Nº de L <sub>3</sub>
Nº de ratas	13		14		15	
Nº de L <sub>3</sub>	78		82		86	
<b>Hemorragias</b> (% ratas)	7,69		42,86		26,67	
Estómago (nº ratas)	1		6		3	
Ciego (nº ratas)	0		0		1	
Resto intestino (nº ratas)	0		0		1	
	% L <sub>3</sub>	Nº de L <sub>3</sub>	% L <sub>3</sub>	Nº de L <sub>3</sub>	% L <sub>3</sub>	Nº de L <sub>3</sub>
<b>Cavidad</b>	0	0	13,41	11	8,14	7
<b>Estómago</b>						
Muertas	32,05	25	4,88	4	0	0
Vivas	60,26	47	21,95	18	3,49	3
Fijas (L <sub>3</sub> fijas/L <sub>3</sub> vivas)	-	0/47	-	0/18	-	0/3
<b>Intestino delgado</b>						
Muertas	0	0	0	0	0	0
Vivas	6,41	5	46,34	38	19,77	17
Fijas (L <sub>3</sub> fijas/L <sub>3</sub> vivas)	-	0/5	-	0/38	-	0/17
<b>Intestino grueso</b>						
Muertas	0	0	0	0	0	0
Vivas	0	0	0	0	1,16	1
Fijas (L <sub>3</sub> fijas/L <sub>3</sub> vivas)	-	0	-	0	-	0/1
<b>Ciego</b>						
Muertas	0	0	0	0	0	0
Vivas	0	0	3,66	3	34,88	30
Fijas (L <sub>3</sub> fijas/L <sub>3</sub> vivas)	-	0	-	0/3	-	0/30
<b>Heces</b>						
Muertas	0	0	0	0	0	0
Vivas	0	0	0	0	24,42	21
<b>No recuperadas</b>	1,28	1	9,76	8	8,14	7

En el Modelo A el último derivado aldehídico, perillaldehído (compuesto de referencia), ocasiona la muerte del 91,03 % de las larvas, todas en estómago. En este mismo ensayo, observamos que ninguna rata tiene hemorragias, recuperando todos los nematodos salvo uno (Tabla 30).

En el segundo ensayo (Modelo B), casi la mitad de las ratas (42,86 %) padecen hemorragias gástricas (6) e intestinales (1). Entre las larvas vivas, once L<sub>3</sub> se encontraron en cavidad, y en estómago 17, ocho de las cuales clavadas a la pared gástrica. Se han recogido 34 larvas muertas en estómago, 42,50 % del total.

Los datos obtenidos con el Modelo C, son parecidos al Modelo B, con excepción del número de L<sub>3</sub> fijadas, cambiando la localización de las larvas. Hay hemorragias en el 42,86 % de las ratas, diez larvas están en cavidad, el 42,68 % están muertas, y tres L<sub>3</sub> no se recuperan.

En el ensayo del control, sólo se aplicó el Modelo A, ya que los resultados son prácticamente extrapolables a los otros dos modelos (Tabla 31). Casi todos los animales de experimentación padecen o sufren hemorragia gástrica, que es múltiple en algunos casos. Todas las larvas recuperadas están vivas: 40 en estómago (12 fijadas), 17 en intestino delgado, una en intestino grueso y una en ciego. Las L<sub>3</sub> no recuperadas son nueve (10,96 % del total).

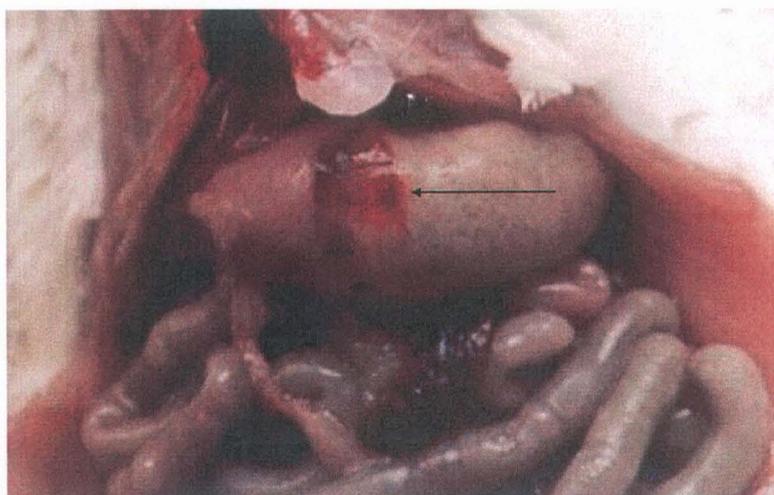


Foto 32. Múltiples hemorragias gástricas, con larvas fijadas en la cara interna.

## 6. ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LAS LARVAS DE *Anisakis simplex* s.l. DE LOS ENSAYOS *IN VIVO*

El comportamiento del carvacrol *in vivo* (9,50 mg/0,5 mL), en lo que a lesiones observadas de los parásitos se refiere, consiste, por una parte, en la alteración de la cutícula de las larvas, provocando excrescencias de la misma en forma de espinas (Foto 33). Por otra, en varios cortes histológicos se observa que los cordones laterales están más dilatados (Foto 34). En algunas tinciones encontramos que la luz intestinal está más expandida de lo normal e incluso con algún resto de material celular en la misma. En ningún caso se observa la cara luminal rota.

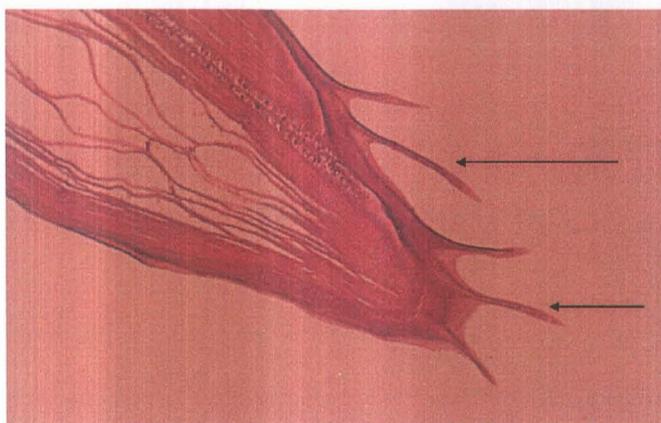


Foto 33. Intestino proximal. Daños cuticulares (carvacrol Modelo A).

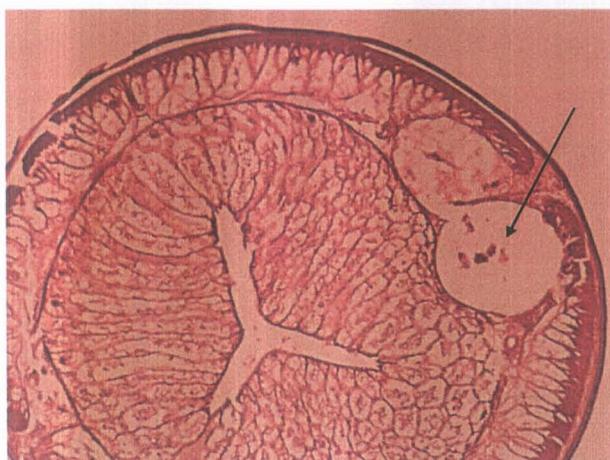
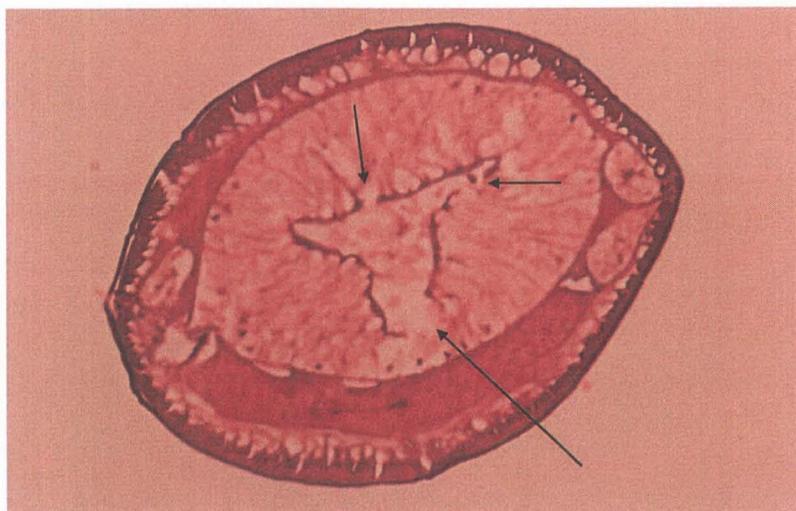


Foto 34. Intestino medio. Cordones laterales dilatados (carvacrol Modelo A).

El derivado fenólico timol actúa sobre la cara luminal del intestino de *Anisakis*, con destrucción de las células, pero sin alterar la cara opuesta del mismo (Foto 35). No se observan daños en otras zonas del parásito; así, cutícula, esófago, ventrículo y célula excretora aparecen intactos. Este efecto del timol *in vivo* se da en los tres modelos de ensayo practicados, con más frecuencia en la zona intestinal próxima al ventrículo que en la distal.



**Foto 35.** Intestino proximal. Lesiones intestinales (timol Modelo A).

El geraniol (46,90 mg/0,5 mL) provoca la lisis de la cara luminal del intestino, y el consecuente perjuicio para el material celular intestinal, llegando a aparecer en la luz del mismo. Además, se observan rugosidades en la cutícula, así como proyecciones (Foto 37) e incluso abombamiento de la misma desde la musculatura del nematodo (Foto 36). La célula excretora -en términos generales- no aparece afectada por el geraniol (Foto 38).

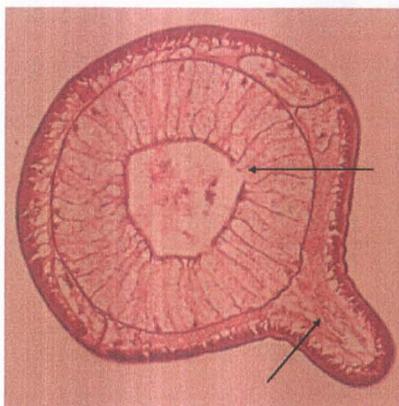


Foto 36. Intestino medio. Abombamiento cuticular y daños intestinales (geraniol Modelo A).

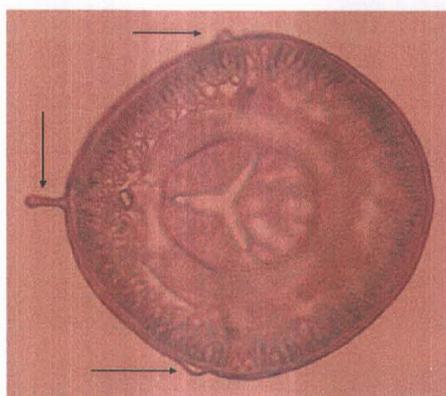


Foto 37. Esófago (anillo nervioso). Alteraciones cuticulares (geraniol Modelo C).

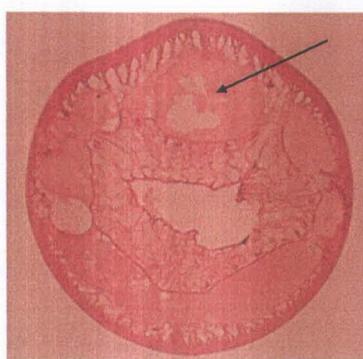
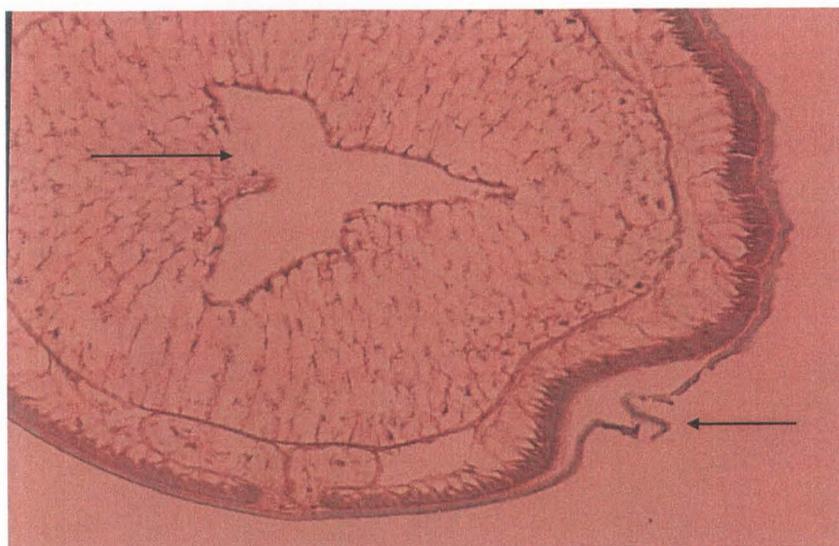


Foto 38. Zona de transición ventrículo-intestino. Corte con glándula esofágica dorsal dañada (geraniol Modelo C).

En las larvas, la localización de las lesiones por acción del citronelol se asemejan a las descritas para el geraniol. En general, en todos los cortes histológicos hay una mayor apertura de la luz intestinal y alteración de pared, llegando en ocasiones a romperla. También se observa la presencia de rugosidades y deformaciones en la cutícula del parásito (Foto 39).



**Foto 39.** Intestino medio. Daños intestinales y cuticulares (citronelol Modelo A). Tricrómica de Masson.

En el caso del citral, las alteraciones de la cutícula de las larvas no son tan patentes como en los demás casos descritos hasta ahora (Foto 40). Es en el tracto intestinal donde se observan la mayoría de los daños, tales como alteraciones y rotura en la superficie luminal del mismo y aparición de material en el lumen (Foto 41).

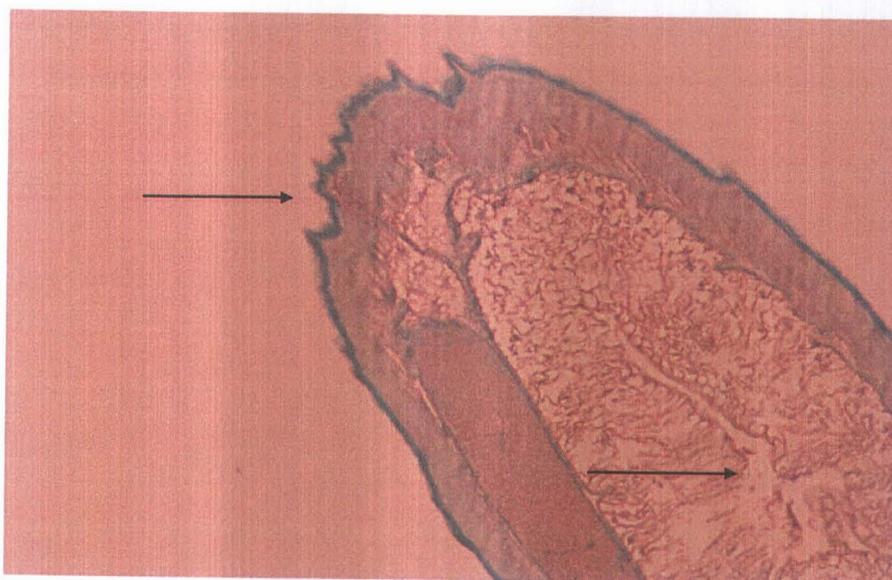


Foto 40. Intestino proximal. Rugosidades en cutícula y lesiones intestinales (citrato Modelo C). Tricrómica de Masson.

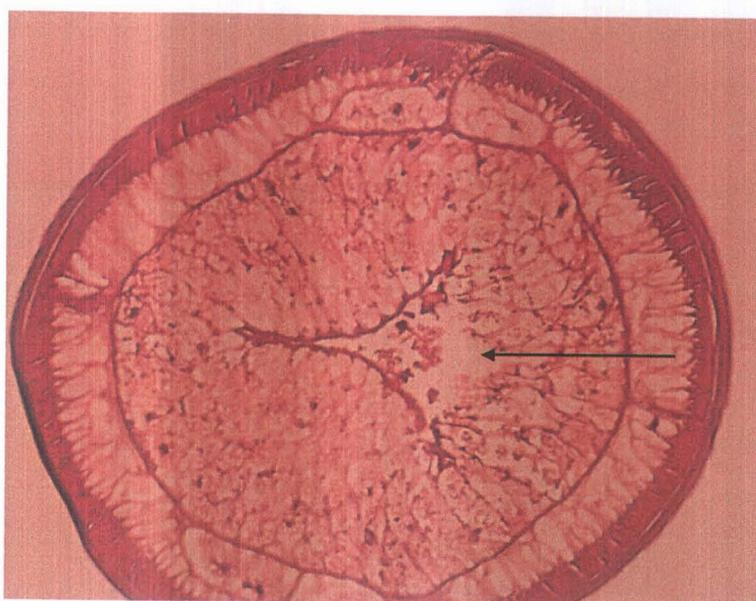
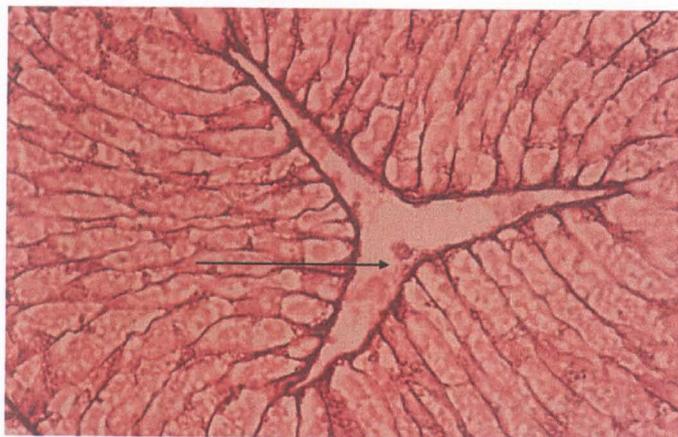


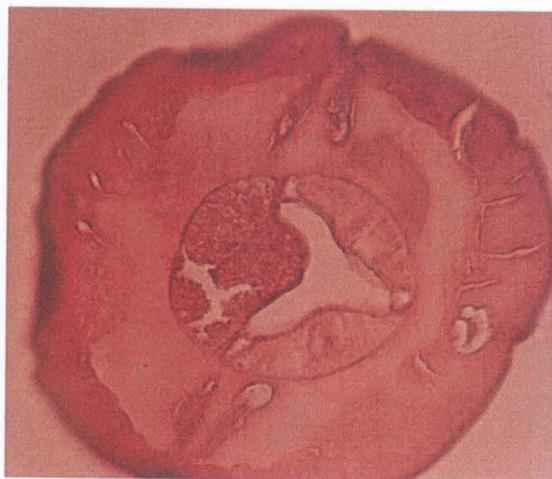
Foto 41. Intestino medio. Daños intestinales (citrato Modelo A).

El segundo derivado aldehídico estudiado, el aldehído cumínico, aparentemente no produce lesiones en las larvas, ya que todos los cortes observados tienen sus estructuras intactas. En algunos casos se observa que el intestino presenta la luz expandida, y, con menos frecuencia, se aprecia la existencia de material celular en el lumen (Foto 42).



**Foto 42.** Intestino medio. Material celular en luz (aldehído cumínico Modelo A).

En el caso del último compuesto monoterpénico, perillaldehído (compuesto de referencia), las larvas presentan las paredes internas en perfecto estado, si bien en varios cortes se observa que tienen la luz intestinal abierta (Foto 43).



**Foto 43.** Esófago preventricular (anillo nervioso) (perillaldehído Modelo B).

## 7. CURVA DOSIS-RESPUESTA *IN VIVO*

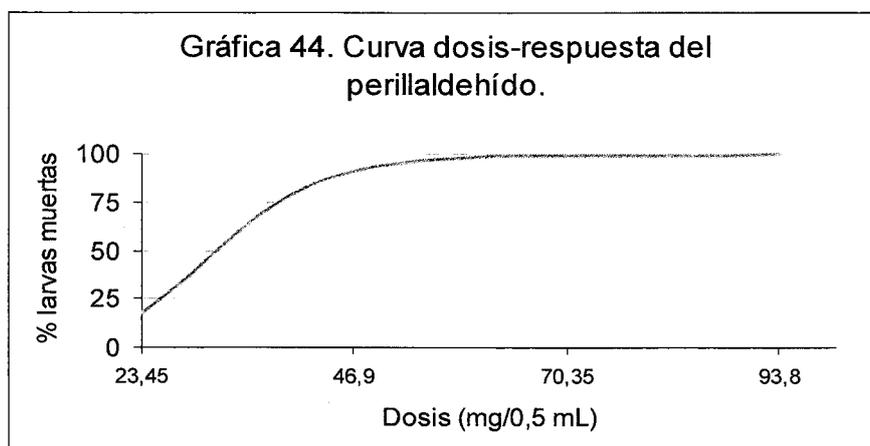
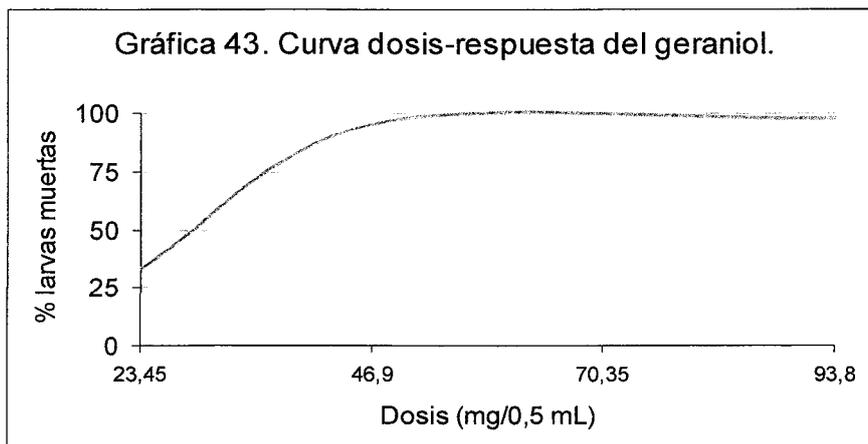
Para realizar las curvas dosis-respuesta de los principales componentes de aceites esenciales de origen vegetal ensayados *in vivo*, hemos seleccionado dos por su alta eficacia larvicida, geraniol y perillaldehído (Tabla 32).

**Tabla 32.** Datos de la curva dosis-respuesta *in vivo* del geraniol y el perillaldehído.

	<b>DOSIS</b> mg/0,5 mL	<b>L<sub>3</sub> MUERTAS</b> %	<b>HEMORRAGIAS</b> % ratas
<b>GERANIOL</b>	93,80	97,62	0
	46,90	95,18	0
	23,45	33,33	0
<b>PERILLALDEHÍDO</b>	93,80	100	0
	46,90	91,03	0
	23,45	17,95	0

En el caso del geraniol, la letalidad disminuye de forma apreciable cuando usamos la mitad de la dosis (1/2 D) respecto al caso de D (46,90 mg/0,5 mL). Al duplicarla (2 x D) el incremento es mínimo (<2,5 %), sin llegar a alcanzar el 100 % de larvas muertas (Gráfica 43). En ninguno de los animales empleados se ha observado la presencia de hemorragias.

Para el perillaldehído, la eficacia ha sido del 100 % a la mayor dosis administrada (2 x D = 93,80 mg/0,5 mL), con un aumento en el porcentaje de larvas muertas a medida que aumenta la dosis, desde el 17,95 % (1/2 D) hasta el 100 % (2 x D) (Gráfica 44). Al igual que ocurre con el geraniol, las ratas no muestran hemorragias.



## 8. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD MIELOPEROXIDASA (MPO) TISULAR

Según los datos obtenidos (Tabla 33), los valores de actividad MPO (U/g de proteína) en estómago, intestino delgado y ciego, calculados de la media de los cinco animales sacrificados para cada D de compuesto, no son significativos respecto al control (0,5 mL de aceite de oliva).

Tabla 33. Actividad MPO tisular.

	<b>ESTÓMAGO</b>	<b>INTESTINO</b>	<b>CIEGO</b>
	MPO (U/g prot.) Desviación estándar	MPO (U/g prot.) Desviación estándar	MPO (U/g prot.) Desviación estándar
<b>CARVACROL</b> (9,50 mg/0,5 mL)	644,65 262,94	2773,10 971,59	617,84 186,45
<b>TIMOL</b> (17,30 mg/0,5 mL)	347,52 115,67	1678,04 373,62	1259,03 265,38
<b>GERANIOL</b> (46,90 mg/0,5 mL)	346,31 67,29	1325,47 211,19	1339,72 383,72
<b>CITRONELOL</b> (46,90 mg/0,5 mL)	260,52 64,19	2017,75 313,52	513,66 163,57
<b>CITRAL</b> (46,90 mg/0,5 mL)	368,53 200,61	1774,43 563,47	877,11 158,83
<b>ALDEHÍDO CUMÍNICO</b> (26 mg/0,5 mL)	316,45 71,50	1261,83 437,32	1123,11 496,22
<b>PERILLALDEHÍDO</b> (46,90 mg/0,5 mL)	282,06 64,84	1475,49 167,50	805,05 97,44
<b>CONTROL</b> (0,5 mL aceite de oliva)	276,78 65,01	1646,76 162,00	1114,35 289,01

## 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 9.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS ENSAYOS *IN VITRO*

#### 9.1.1. Componentes de los aceites esenciales

Sobre el porcentaje de larvas muertas realizamos un ANOVA factorial mixto 7 x 3 x 4 que incluía la variable *componente* manipulada entre grupos con los siete niveles carvacrol, timol, geraniol, citronelol, citral, aldehído cumínico y perillaldehído; la variable *concentración* manipulada también entre grupos con los tres niveles 125 µg/ml (C<sub>1</sub>), 62,50 µg/ml (C<sub>2</sub>) y 31,25 µg/ml (C<sub>3</sub>); y la variable *hora de observación* manipulada intraensayo con los cuatro niveles 4, 8, 24 y 48 horas desde el inicio del ensayo. Este análisis mostró efectos principales de los factores *componente* [ $F(6, 43) = 33,40; p < 0,0001$ ], *concentración* [ $F(6, 43) = 353,65; p < 0,0001$ ], y *hora de observación* [ $F(3, 129) = 96,16; p < 0,0001$ ]; efectos de interacción de primer orden *componente* x *concentración* [ $F(12, 43) = 15,77; p < 0,0001$ ], *componente* x *hora de observación* [ $F(18, 129) = 8,44; p < 0,0001$ ], y *concentración* x *hora de observación* [ $F(6, 129) = 10,77; p < 0,0001$ ]; y efecto de interacción de segundo orden entre las tres variables [ $F(36, 129) = 3,26; p < 0,0001$ ].

Si tenemos en cuenta que se han encontrado efectos significativos de todas las variables y sus interacciones, se han podido analizar nuestras hipótesis de interés. En primer lugar exploramos el efecto principal de *concentración* llevando a cabo comparaciones planeadas entre las tres cantidades de concentración. Estas comparaciones nos demostraron que la C<sub>1</sub> fue más efectiva que la C<sub>2</sub> [ $F(1, 43) = 189,66; p < 0,0001$ ], y que la C<sub>3</sub> [ $F(1, 43) = 707,12; p < 0,0001$ ], y asimismo que la C<sub>2</sub> es más efectiva que la C<sub>3</sub> [ $F(1, 43) = 170,58; p < 0,0001$ ]. En segundo lugar, qué componente era más letal en menor tiempo con C<sub>1</sub> (la concentración más efectiva). Para ello, sobre el porcentaje de larvas muertas en los ensayos con C<sub>1</sub>, llevamos a cabo un ANOVA mixto 7 x 4 con la variable *componente* manipulada entre grupos con los siete niveles conocidos, y la variable *hora de observación* manipulada intraensayo con los cuatro niveles antes mencionados. Este análisis mostró efectos principales de las variables *componente* [ $F(6, 14) = 6,04; p < 0,005$ ] y *hora de observación* [ $F(3, 42) = 20,18; p < 0,0001$ ]; y de interacción entre ambos factores [ $F(18, 42) = 4,60; p < 0,0001$ ].

Esta interacción revela que los diferentes componentes no eran igualmente letales en cada tiempo ensayado. Comparaciones planeadas entre los diferentes componentes en las primeras horas de observación (4 y 8 horas), demostraron que la acción de los componentes carvacrol, timol, citronelol y citral era significativamente más letal que la de geraniol, aldehído cumínico y perillaldehído ( $p < 0,0001$  en todos los casos), no existiendo diferencias significativas entre sí en los cuatro primeros, ni en los tres últimos entre sí.

### 9.1.2. Aceites esenciales

Como en el análisis anterior, se realizó sobre el porcentaje de larvas muertas un ANOVA factorial mixto  $7 \times 3 \times 4$  que incluía en este caso la variable *aceite* manipulada entre grupos con los siete niveles comino, palamarrosa, lemongrass, geranio, litsea, orégano y citronela; la variable *concentración* manipulada también entre grupos con los tres niveles  $125 \mu\text{g/ml}$  ( $C_1$ ),  $62,50 \mu\text{g/ml}$  ( $C_2$ ) y  $31,25 \mu\text{g/ml}$  ( $C_3$ ); y la variable *hora de observación* manipulada intraensayo con los cuatro niveles 4, 8, 24 y 48 horas desde el inicio del ensayo. Este primer análisis replicó todos los efectos encontrados en el examen de los componentes previamente descrito.

Una vez encontrados estos efectos, como en el caso anterior, se ha procedido a explorar nuestra hipótesis de interés. En esta ocasión, nuevamente llevamos a cabo comparaciones planeadas para conocer dónde residían las diferencias respecto a la variable *concentración*. Las comparaciones nos demostraron que la  $C_1$  fue más efectiva que la  $C_2$  [ $F(1, 44) = 964,35$ ;  $p < 0,0001$ ], y que la  $C_3$  [ $F(1, 44) = 1897,11$ ;  $p < 0,0001$ ], y asimismo que la  $C_2$  es más efectiva que la  $C_3$  [ $F(1, 44) = 151,83$ ;  $p < 0,0001$ ]. Para conocer que aceite esencial producía mayor porcentaje de larvas muertas a las 4 horas y a la concentración mayor ( $C_1$ ), realizamos un ANOVA mixto  $7 \times 4$  con la variable *aceite* manipulada entre grupos con los siete niveles mencionados, y la variable *hora de observación* manipulada intraensayo. Este análisis sólo mostró efecto principal de la variable *hora de observación* [ $F(3, 48) = 11,96$ ;  $p < 0,0001$ ]; pero no efecto principal del factor *aceite* ni de la interacción de este factor y la variable *hora de observación* ( $F < 1,1$  en ambos casos). La ausencia de esta interacción revela que los diferentes aceites esenciales fueron similarmente letales en cada hora de lectura del ensayo.

## 9.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS ENSAYOS *IN VIVO*

### 9.2.1. Porcentaje de larvas muertas

Al porcentaje de larvas muertas, se aplicó un ANOVA factorial 7 x 3 que incluía las variables *componente* (carvacrol, timol, geraniol, citronelol, citral, aldehído cumínico y perillaldehído) y *modelo* (A, B y C) manipuladas entre grupos, obteniendo efectos principales tanto de la variable *componente* [ $F(6, 268) = 39,83; p < 0,0001$ ] como la variable *modelo* [ $F(2, 268) = 139,71; p < 0,0001$ ], y efecto de interacción de ambas variables [ $F(12, 268) = 5,78; p < 0,0001$ ]. Estos resultados revelan que todos los componentes no ejercían el mismo efecto sobre las larvas, que asimismo cada modelo no provoca el mismo grado de mortandad de las larvas, y que, como sugiere el efecto de interacción encontrado, el efecto de cada producto está modulado por el modelo mediante el que se administra.

El efecto principal del *componente* encierra una jerarquía en la mortandad que provocan los diferentes productos empleados. Comparaciones planeadas, realizadas entre los siete componentes, mostraron que perillaldehído, citral y geraniol eran significativamente más letales que el resto de componentes. Las comparaciones llevadas a cabo entre estos tres componentes revelan que el porcentaje de larvas muertas por la administración de perillaldehído fue significativamente superior al producido por el geraniol [ $F(1, 268) = 8,45; p < 0,005$ ], mientras que la diferencia entre el perillaldehído y el citral alcanzó un efecto marginal [ $F(1, 268) = 3,48; p = 0,06$ ]. Por último, no hubo diferencias significativas entre citral y geraniol ( $F = 1,05$ ).

Por lo que respecta al efecto principal del factor *modelo*, las comparaciones planeadas mostraron que el Modelo A provocaba significativamente mayor número de larvas muertas que el Modelo B [ $F(1, 268) = 257,24; p < 0,0001$ ] y el modelo C [ $F(1, 268) = 149,25; p < 0,0001$ ], y a su vez el modelo C provocaba más muertes de larvas que el B [ $F(1, 268) = 15,72; p < 0,0001$ ].

Finalmente, para analizar el efecto de interacción entre *componente* y *modelo* de administración, realizamos un ANOVA unifactorial tomando como variable independiente el factor *componente* y centrándonos únicamente en el efecto de cada componente en el caso del Modelo A de administración, por ser el que más muertes producía. En esta ocasión el factor *componente* incluía ocho niveles por la adición de

una condición control (aceite de oliva). Este análisis mostró un efecto significativo de la variable *componente* [ $F(1, 268) = 257,24; p < 0,0001$ ] que revela que los componentes no actuaban de la misma manera bajo este modelo de administración. En esta ocasión geraniol, perillaldehído y citral fueron significativamente superiores al resto sin haber diferencias significativas entre estos tres componentes (todas las  $F < 1$ ).

### 9.2.2. Porcentaje de hemorragias

Empleando como variable dependiente el porcentaje de ratas que presentaban hemorragia al final de los ensayos *in vivo*, se llevó a cabo un ANOVA factorial 7 x 3 que incluía nuevamente las variables *componente* (carvacrol, timol, geraniol, citronelol, citral, aldehído cumínico y perillaldehído) y *modelo* (A, B y C) manipuladas entre grupos. Este análisis mostró efectos principales tanto de la variable *componente*, [ $F(6, 268) = 2,23; p < 0,05$ ] como la variable *modelo* [ $F(2, 268) = 33,5; p < 0,0001$ ], pero no mostró efecto de interacción. Estos resultados revelan que todos los componentes no presentan el mismo porcentaje de ratas con hemorragia al final del ensayo y, asimismo, que los diferentes modelos de administración no presentan finalmente el mismo porcentaje de ratas con hemorragia.

Comparaciones planeadas, realizadas para analizar las diferencias que encierra el efecto principal del factor *componente*, nos revelan que el carvacrol presenta significativamente mayor porcentaje de ratas con hemorragia que el resto de componentes, mientras que entre estos restantes no existían diferencias significativas. Por lo que respecta al efecto principal del *modelo*, las comparaciones nos muestran que el Modelo A presenta significativamente menos hemorragias que el B [ $F(1, 268) = 51,61; p < 0,0001$ ] y que el C [ $F(1, 268) = 49,45; p < 0,0001$ ], no existiendo diferencias significativas entre estos dos últimos ( $F < 1$ ).

### 9.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CURVA DOSIS-RESPUESTA *IN VIVO*

Sobre el porcentaje de larvas muertas, se realizó un ANOVA factorial 2 x 3 que incluía las variables *componente* (perillaldehído y geraniol) y *dosis* (2 x D, D, 1/2 D) manipuladas entre grupos. Este análisis mostró solamente efecto principal de la variable *dosis* [ $F(1, 78) = 110,83; p < 0,0001$ ], no habiendo efecto principal de la

variable *componente* ni de la interacción *componente* x *dosis* (ambas  $F_s < 2$ ). Estos resultados revelan que los dos componentes ejercían un efecto semejante sobre las larvas, pero que, en cambio, como muestra el efecto del factor *dosis*, la cantidad de esta sí afectaba de modo diferente en el porcentaje de larvas muertas. La ausencia de efecto interacción nos muestra que en ninguna de las dosis un componente fue superior al otro.

Para analizar este efecto de las diferentes dosis, llevamos a cabo comparaciones planeadas mediante las que se observó que el efecto de la dosis 1/2 D era significativamente inferior a producido por las dosis 2 x D [ $F(1, 78) = 179,32$ ;  $p < 0,0001$ ] y D [ $F(1, 78) = 152,19$ ;  $p < 0,0001$ ], mientras que entre estas dos últimas no hubo diferencias significativas ( $F < 1$ ).

Por lo que respecta al porcentaje de ratas con hemorragia, la total ausencia de hemorragias en todos los ensayos llevados a cabo con los dos componentes, resta cualquier utilidad a su tratamiento estadístico.

#### 9.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD MIELOPEROXIDASA (MPO) TISULAR

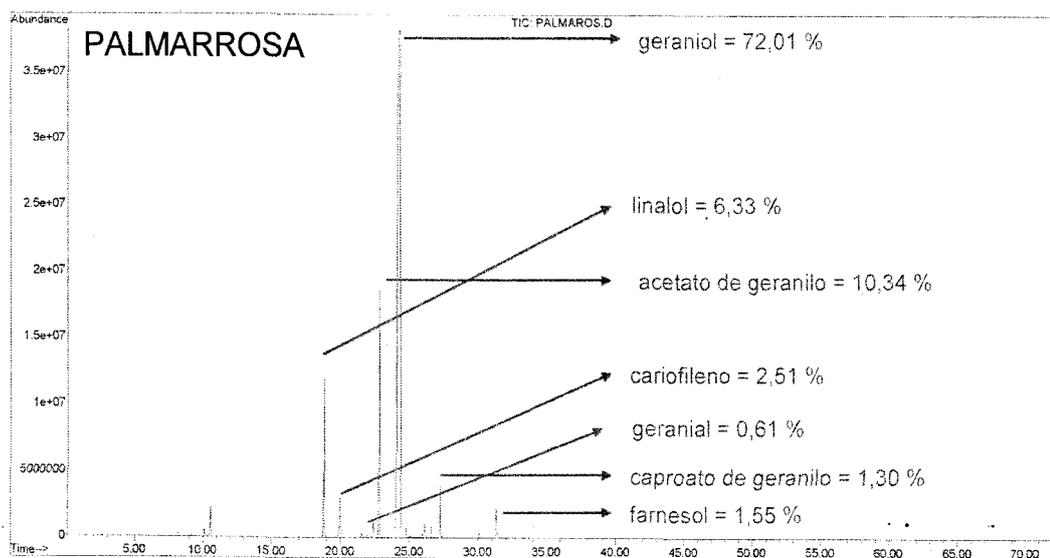
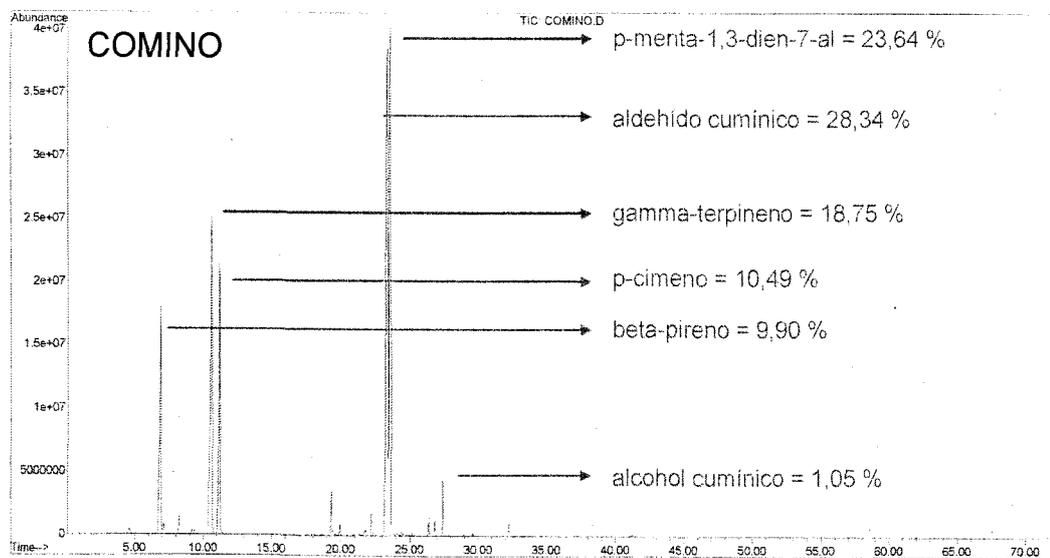
Cómo puede observarse en la Tabla 31, la actividad MPO medida en cada tejido después de la administración de los productos presenta una gran variabilidad, circunstancia que impide la aplicación de pruebas estadísticas paramétricas como el ANOVA y nos conduce al empleo de pruebas no paramétricas. Para el diseño experimental que nos ocupa, la prueba no paramétrica pertinente es la Kruskal-Wallis.

La aplicación del test de Kruskal-Wallis tomando como variables independientes el *componente* (carvacrol, timol, geraniol, citronelol, citral, aldehído cumínico, perillaldehído y aceite de oliva como control) y la *localización* (estómago, intestino delgado o ciego), reveló que la variable *componente* no ejercía ningún efecto (en todos los casos  $p > 0,3$ ). En otras palabras, que la actividad MPO tisular no difería en función del componente administrado en ninguna de los tres tejidos medidos.

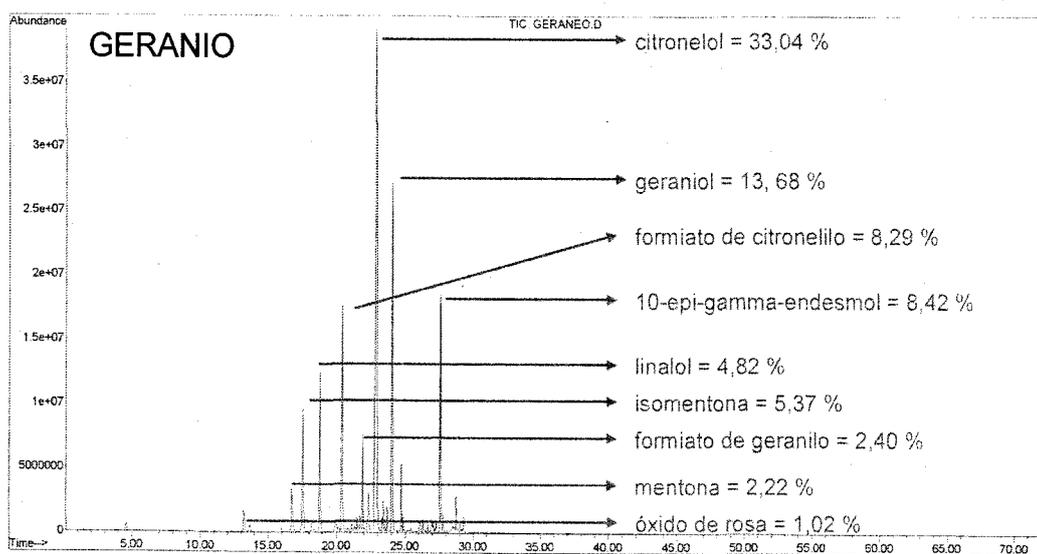
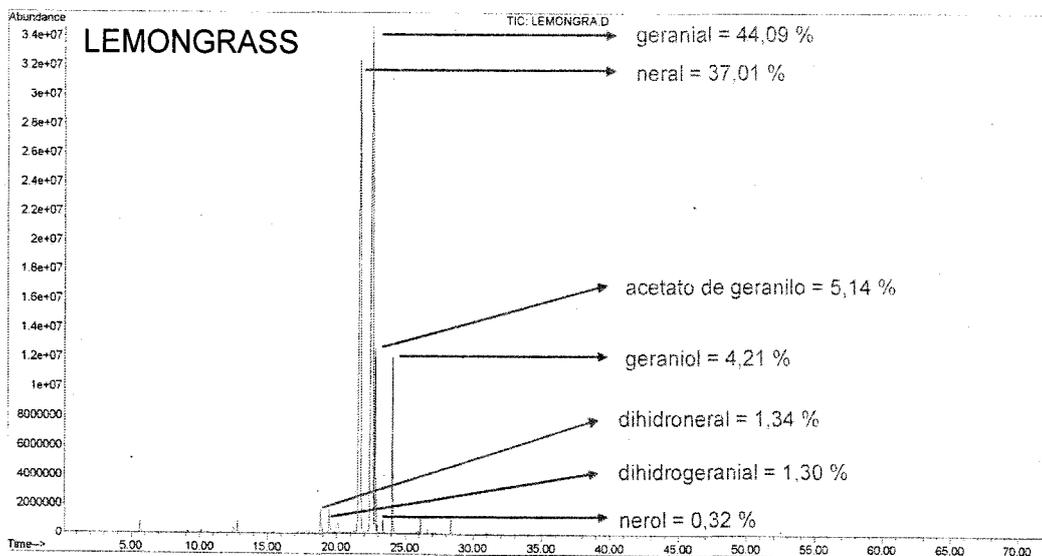
# APÉNDICE

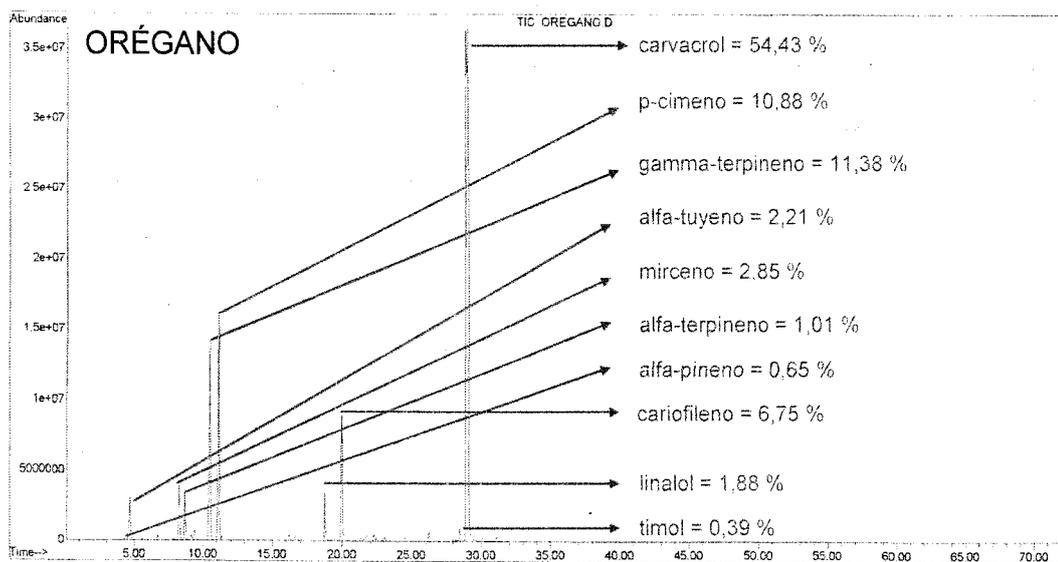
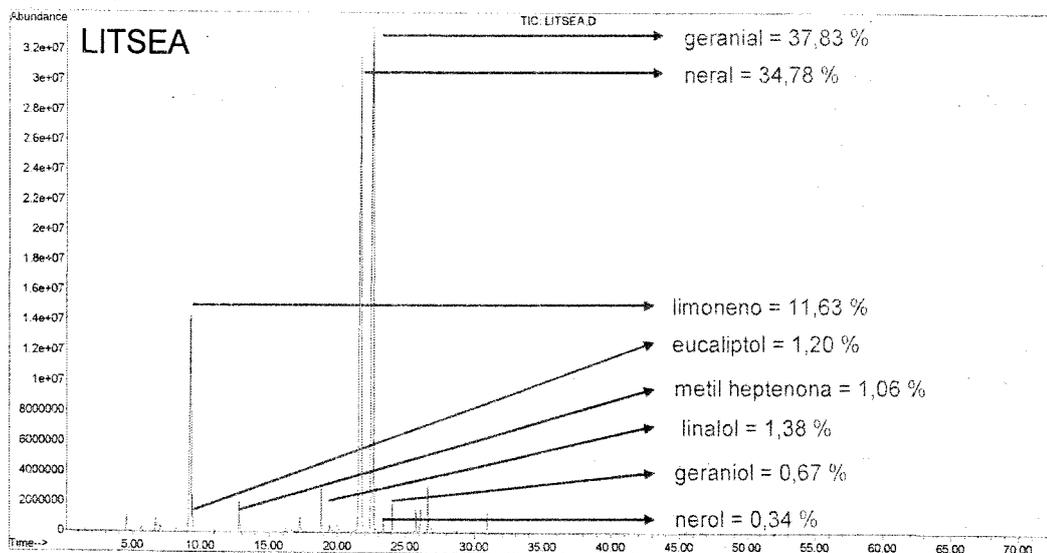


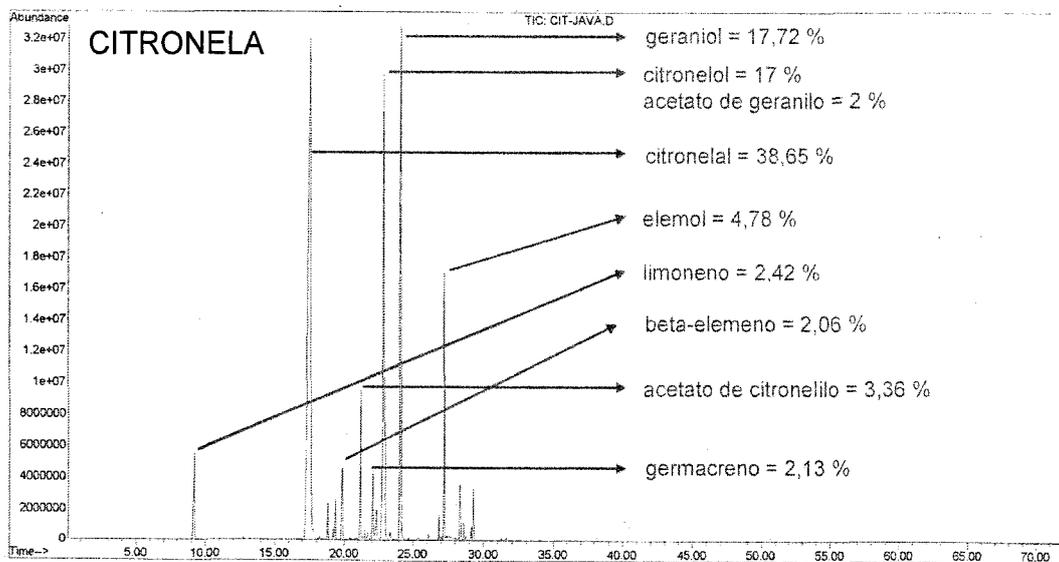
## CROMATOGRAMAS DE LOS ACEITES ESENCIALES



Actividad larvica de aceites esenciales de plantas aromáticas y sus componentes principales frente a larvas L<sub>3</sub> de *Anisakis simplex* s.l.

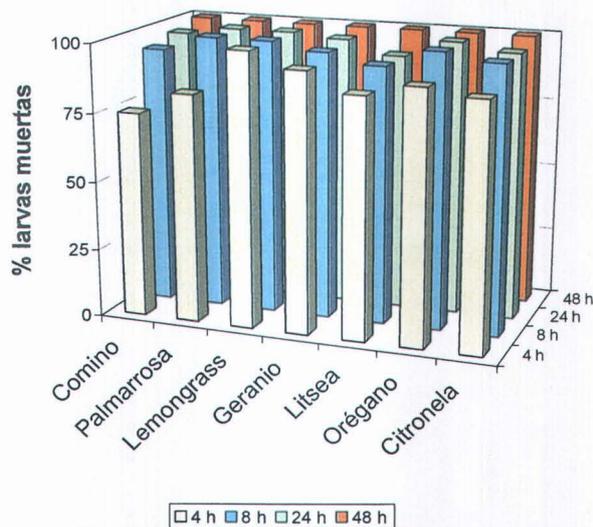




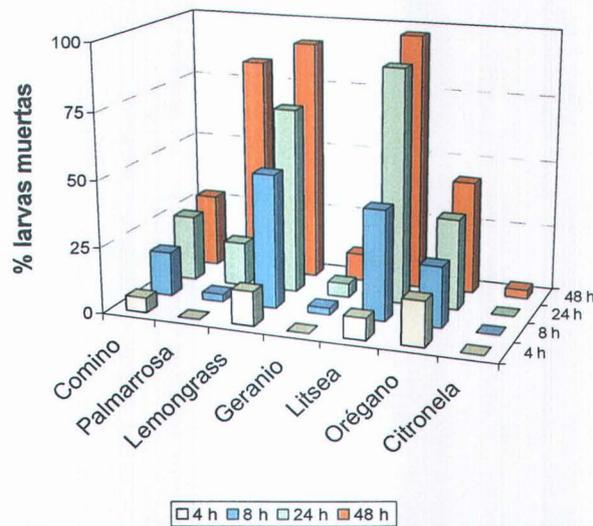


**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA *IN VITRO* DE LOS ACEITES ESENCIALES Y DE SUS COMPONENTES**

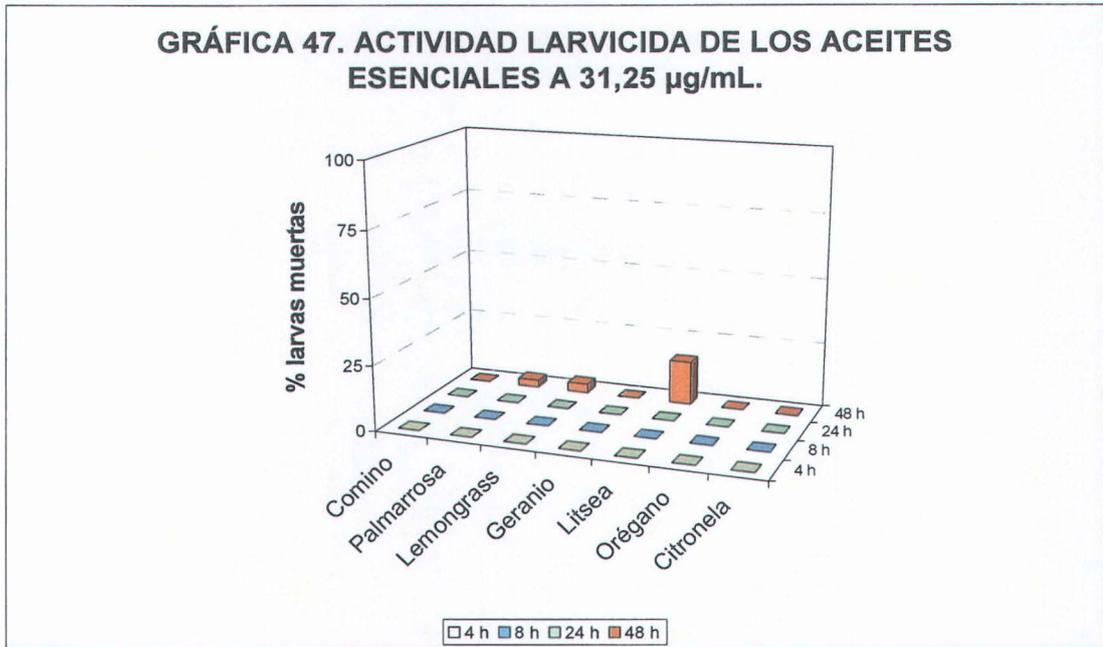
**GRÁFICA 45. ACTIVIDAD LARVICIDA DE LOS ACEITES ESENCIALES A 125 µg/mL.**



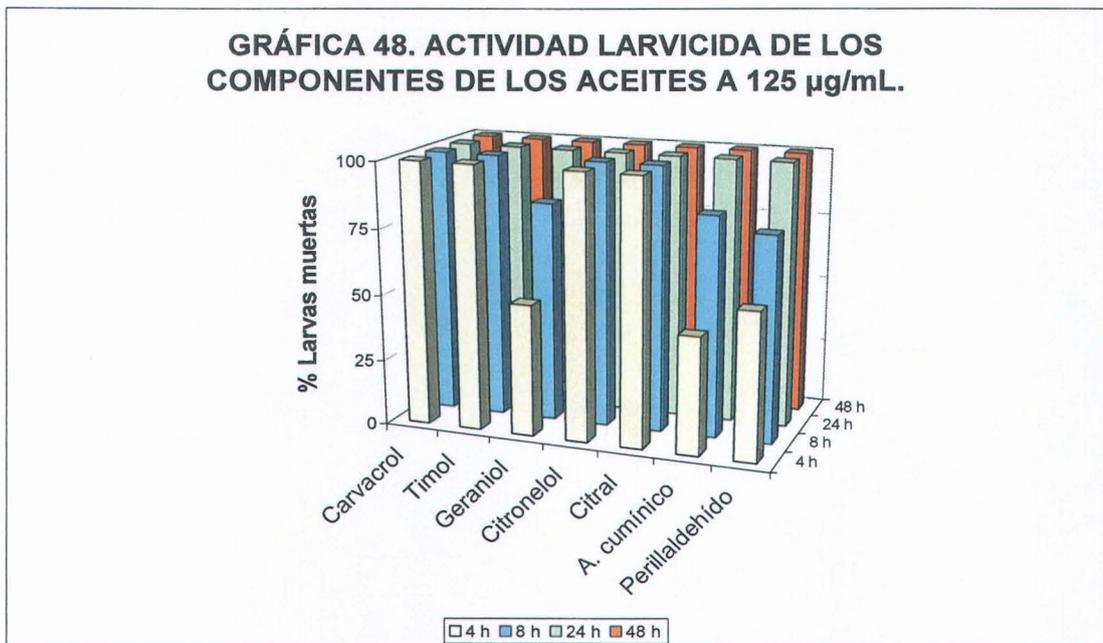
**GRÁFICA 46. ACTIVIDAD LARVICIDA DE LOS ACEITES ESENCIALES A 62,50 µg/mL.**



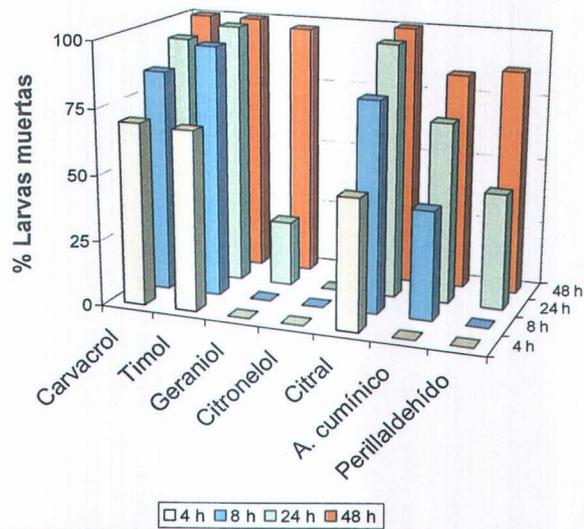
**GRÁFICA 47. ACTIVIDAD LARVICIDA DE LOS ACEITES ESENCIALES A 31,25 µg/mL.**



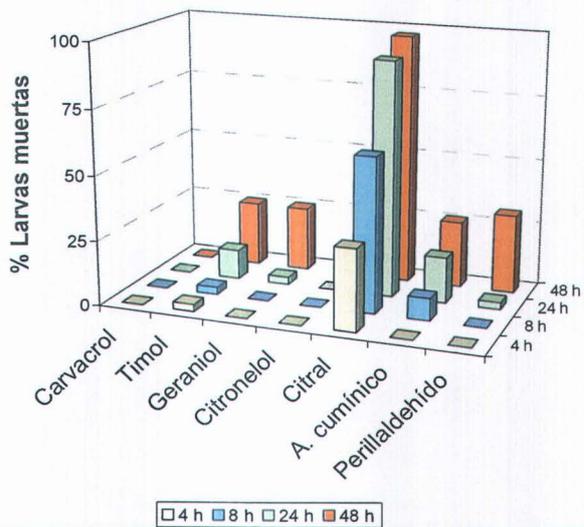
**GRÁFICA 48. ACTIVIDAD LARVICIDA DE LOS COMPONENTES DE LOS ACEITES A 125 µg/mL.**



**GRÁFICA 49. ACTIVIDAD LARVICIDA DE LOS COMPONENTES DE LOS ACEITES A 62,50 µg/mL.**



**GRÁFICA 50. ACTIVIDAD LARVICIDA DE LOS COMPONENTES DE LOS ACEITES A 31,25 µg/mL.**



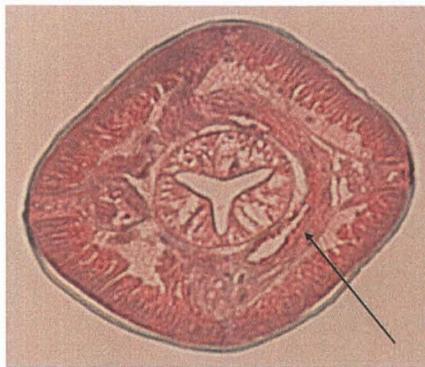
ESTUDIO HISTOLÓGICO COMPARATIVO DE L<sub>3</sub> DE *A. simplex* s.l.



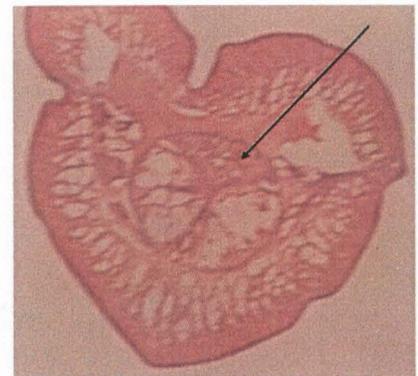
BOCA



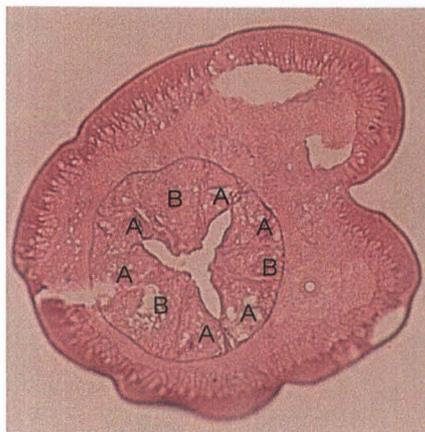
ESÓFAGO PREVENTRICULAR  
Próximo a boca



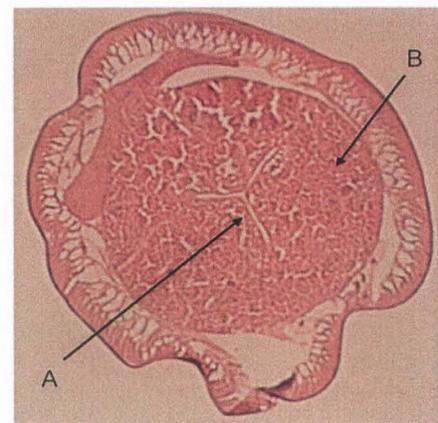
ESÓFAGO PREVENTRICULAR  
Anillo nervioso



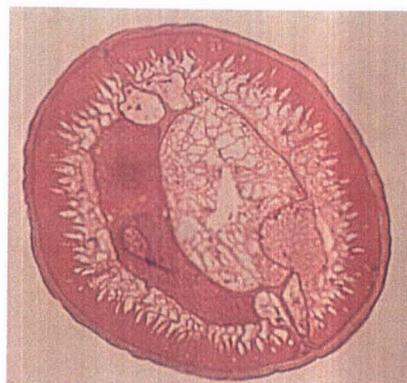
ESÓFAGO PREVENTRICULAR  
Glándula esofágica dorsal



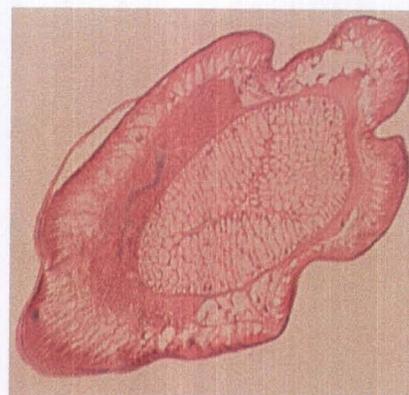
ZONA DE TRANSICIÓN ESOFÁGICA  
Glándulas dorsal (A) y subventral (B)



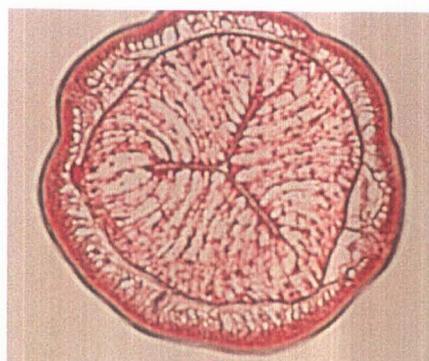
VENTRÍCULO  
Glándulas dorsal (A) y subventral (B)



ZONA DE TRANSICIÓN  
VENTRÍCULO-INTESTINO<sup>1</sup>



INTESTINO PROXIMAL



INTESTINO MEDIO



INESTINO DISTAL<sup>2</sup>



COLA

<sup>1</sup>Corte con daños de geraniol *in vitro* a 62,50 µg/mL.

<sup>2</sup>Corte con lesiones *in vitro* de aldehído cumínico a 125 µg/mL.



# DISCUSIÓN

BIBLIOTECA  
E. DE FARMACIA  
GRANADA



Los siete aceites esenciales ensayados resultaron efectivos *in vitro* a la concentración máxima de 125 µg/mL frente a L<sub>3</sub> de *A. simplex* s.l., logrando un 100 % de letalidad entre las 24 y las 48 horas desde el inicio de las experiencias (Gráfica 45). De todos ellos, el de lemongrass fue el más efectivo, puesto que desde las 4 horas no se observó ninguna larva de *A. simplex* s.l. viva. Los de orégano y palmarrosa también alcanzaron ese grado de letalidad si bien tras la segunda lectura (8 horas). En los demás casos, comino, geranio, litsea y citronela, el incremento del porcentaje de larvas muertas fue gradual, aumentando del 75 % a las 4 horas (comino) al 100 % a las 48 horas.

A la concentración intermedia (62,50 µg/mL), el efecto larvicida de los aceites esenciales disminuyó en relación con la mayor concentración ( $p < 0,0001$ ), no llegando en ninguna lectura al 100 % (Gráfica 46). Los de citronela y geranio fueron prácticamente ineficaces, con un 3,30 % y un 10,50 % de letalidad a las 48 horas, respectivamente. Los de comino y orégano, aunque en baja proporción, se muestran activos desde la primera lectura (4 horas), y sólo alcanzan el 27,80 % y el 42,90 % de larvas muertas al final del ensayo, respectivamente. Los aceites esenciales que mostraron una mayor letalidad, y siempre al final de esta experiencia (48 horas), fueron los de litsea (97,20 %), lemongrass (91,80 %) y palmarrosa (83,30 %).

Los resultados de la prueba realizada con los aceites esenciales a la menor concentración (31,25 µg/mL), nos muestran que la actividad larvicida bien es nula (comino, geranio, orégano y citronela), o está por debajo del 3,40 % (lemongrass y palmarrosa), salvo el de litsea, que alcanza un 16,70 % de L<sub>3</sub> muertas a las 48 horas (Gráfica 47).

En los ensayos llevados a cabo con los principales componentes de los aceites esenciales [todos ellos derivados monoterpénicos oxigenados, al igual que el perillaldehído (compuesto de referencia)], a la concentración de 125 µg/mL se observó que todos ellos alcanzaron el 100 % de efectividad entre las 8 y las 24 horas (Gráfica 48). De entre los derivados monoterpénicos, destacan el carvacrol, timol, citronelol y citral, debido a que en la primera lectura (4 horas) habían llegado a la máxima letalidad, no alcanzada en este tiempo por ninguno de los otros monoterpenos ( $p < 0,0001$ ). De entre estos últimos, los de mayor efectividad a las 8 horas fueron el aldehído cumínico y el geraniol ambos con un 83,40 %, seguidos por el perillaldehído (77,80 %). Teniendo en cuenta estos datos, el orden de los compuestos de mayor a menor actividad frente a L<sub>3</sub> de *A. simplex* s.l. a la mayor concentración, queda como sigue:

Carvacrol = Timol = Citronelol = Citral > Geraniol = Aldehído cumínico =  
Perillaldehído

Los buenos resultados obtenidos con carvacrol, timol, citronelol y citral se encuentran en consonancia con lo descrito para estos compuestos en relación a su actividad biocida frente a distintos agentes (Lis-Balchin y Deans, 1997; Varel y Miller, 2001; Lambert et al., 2001; Friedman et al., 2004). En lo que se refiere al perillaldehído (compuesto de referencia), los datos obtenidos por nosotros, si bien confirman su actuación *in vitro* frente a las L<sub>3</sub> de *A. simplex* s.l., lo sitúan por detrás del resto de los monoterpenos ensayados, ya que en la primera y segunda lectura su eficacia no alcanzó el 100%, coincidiendo con lo descrito por Kasuya et al. (1990) para esta misma concentración (125 µg/mL).

En el caso de la concentración intermedia (62,50 µg/mL) (Gráfica 49), todos los compuestos ensayados, salvo el citronelol, presentan cierta eficacia, máxima con el timol (24 horas), carvacrol (48 horas) y citral (48 horas). Por el contrario, el geraniol y el perillaldehído se mostraron eficaces a partir de las 8 horas.

Por último, en el experimento *in vitro* con la menor concentración de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales (31,25 µg/mL), sólo el citral presentó una actividad digna de interés frente a las larvas de *A. simplex* s.l., con un 97,20 % de L<sub>3</sub> muertas a las 48 horas. Dicha actividad fue inferior para el resto de los productos ensayados ( $p < 0,0001$ ), para algunos de los cuales, como el carvacrol y el citronelol, no se observó efecto larvica (Gráfica 50).

Si comparamos el efecto larvica de los aceites esenciales con el de sus componentes principales (Tabla 8), cabe hipotetizar que la alta letalidad lograda con el aceite esencial de lemongrass puede ser debida, en gran medida, a su alto contenido en citral (81,10 %), dado el alto grado de letalidad frente a las larvas de *A. simplex* observada para este monoterpeno. Este hecho, conjuntamente con los resultados obtenidos por otros autores, viene a corroborar el gran interés del citral como agente biocida puesto de manifiesto frente a diversos organismos patógenos tales como hongos (Cahumont y Léger, 1992; Mahmoud, 1994; Viollon y Chaumont, 1994), bacterias (Pattnaik et al., 1997; Kulevanova et al., 2000; Friedman et al., 2004) e insectos (Rice y Coats, 1984; Lampman et al., 2000; Zhu et al., 2001). A ello se añaden los datos aportados por diversos autores sobre el aceite esencial de lemongrass relativos a su

actividad frente a bacterias (Onawunmi et al., 1984 y 1985; Ogunlana et al., 1987) y hongos (Velutti et al., 2003).

El aceite esencial de orégano, dotado de actividad antimicrobiana y antifúngica (Aligiannis et al., 2001; Lambert et al., 2001; Velutti et al., 2003), contiene un 54,43 % de carvacrol (Tabla 8). Este componente también puede influir de manera considerable en la actividad larvicida del orégano, ya que es sobradamente conocido su poder antifúngico (Viollon y Chaumont, 1994), antimicrobiano (Ultee et al., 1999; Karatzas et al., 2000; Periago y Moezelaar, 2001; Knowles y Roller, 2001; Varel y Miller, 2001), e insecticida (Rice y Coats, 1984; Lindberg et al., 2000; Mansour et al., 2000; Isman et al., 2001; Tsoukatou et al., 2001). Además, en la composición del aceite esencial de orégano hay un 10,88 % de p-cimeno, precursor del carvacrol, que no presenta apenas actividad antimicrobiana de manera aislada, pero que combinado con el carvacrol ha mostrado un sinergismo en ensayos *in vitro*, ya que el efecto frente a *Bacillus cereus* (Ultee et al. 2000) es superior a la suma de ambos monoterpenos por separado. De igual forma, el timol, presente en un 0,39 % en el aceite esencial de orégano, al ser administrado junto con el carvacrol frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, presentó un efecto aditivo con este último (Lambert et al., 2001). Por otra parte, el aceite esencial de orégano contiene un discreto porcentaje de  $\alpha$ -pineno (0,65 %), compuesto dotado de actividad antimicrobiana frente a *Bacillus* sp. y *Saccharomyces cerevisiae* (Andrews et al., 1980).

El componente mayoritario del aceite esencial de palmarrosa, según ha quedado establecido en los análisis realizados mediante cromatografía de gases acoplada a detector de espectrometría de masas (ver Apéndice de Resultados), fue el geraniol (72,01 %), compuesto que en nuestra experiencia resultó menos letal frente a *A. simplex* s.l. que citral y carvacrol. Este hecho podría explicar la menor actividad larvicida frente a este parásito del aceite esencial de palmarrosa respecto a los de lemongrass y orégano, a pesar de encontrarse en mayor porcentaje el geraniol en el aceite esencial de palmarrosa que los otros dos en sus respectivos aceites esenciales. Por otra parte, los resultados obtenidos por diversos autores en los que se muestra que el geraniol es activo frente a distintos organismos patógenos (Chinou et al., 1996; Pattnaik et al., 1997; Rajab et al., 1998; Boyanova y Neshev, 1999), apoyan la actividad biocida de este derivado monoterpénico y, en consecuencia, la del aceite esencial de palmarrosa.

El aceite esencial de geranio se ha comportado como agente antibacteriano frente a distintos microorganismos (Lis-Balchin et al., 1998; Dorman y Deans, 2000) y como repelente de insectos (Botha y McCrindle, 2000), lo cual parece estar en consonancia con su marcada acción larvica a la concentración de 125 µg/mL. En su composición entran a formar parte, como componentes mayoritarios, el citronelol (33,04 %) y el geraniol (13,68 %). Las mismas características antimicrobianas que se han demostrado para el aceite esencial de geranio, han sido puestas de manifiesto para sus principales componentes: el citronelol (Chaumont y Léger, 1992; Viollon y Chaumont, 1994; Mahmoud, 1994; Lis-Balchin y Deans, 1997) y el geraniol (Chinou et al., 1996; Pattnaik et al., 1997; Rajab et al., 1998; Boyanova y Neshev, 1999); de igual forma ha sido demostrada la actividad insecticida de ambos derivados monoterpénicos, geraniol y citronelol (Rice y Coats, 1994; Lee et al., 1997; Botha y McCrindle, 2000; Zhu et al., 2001).

Estos datos aportados por otros autores parecen estar en consonancia con la marcada acción larvica del aceite esencial de geranio a la concentración de 125 µg/mL, en el que los componentes mayoritarios citronelol y geraniol presentan respectivamente las siguientes concentraciones: 33,04 % y 13,68 % (Tabla 8). Dichos monoterpenos oxidados experimentan un notable descenso en su actividad frente a *A. simplex* s.l. cuando las concentraciones aplicadas en los ensayos *in vitro* son menores a la anteriormente indicada (62,50 y 31,25 µg/mL), llegando a desaparecer este efecto en el caso del citronelol. Este mismo descenso de actividad se observa cuando el producto ensayado es el aceite esencial de geranio, llegando a ser nula su letalidad a la menor de las tres concentraciones ensayadas.

Para el aceite esencial de citronela de Java el cromatograma obtenido mediante cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (ver Apéndice de Resultados), puso de manifiesto la presencia de un 17,72 % de geraniol y un 17 % de citronelol.

La menor cantidad de citronelol respecto al aceite esencial de geranio, así como de geraniol respecto al de palmarrosa, pueden justificar la menor eficacia del aceite esencial de citronela de Java frente a las L<sub>3</sub> de *A. simplex* s.l., y ello a pesar de que esté presente en él otro monoterpreno con acción antibacteriana como es el limoneno (Andrews et al., 1980), si bien hay que tener en cuenta que su presencia en el aceite esencial de citronela de Java no alcanza el 2,50 %; por otra parte, no se han descrito

para el limoneno fenómenos de sinergismo o adición de efectos con otros componentes de este aceite esencial. A diferencia de otros aceites esenciales objeto de esta memoria de Tesis Doctoral, en el caso del de citronela de Java son escasas las referencias sobre su actividad biocida, si bien Tawatsin et al. (2001) han puesto de manifiesto su actividad repelente de mosquitos, que puede ser atribuida a la presencia en el mismo de citronelol y geraniol.

El aceite esencial de litsea presenta como principal componente al citral (72,61 %) (Tabla 8); esta concentración, a pesar de ser alta, es algo inferior a la detectada en el de lemongrass (81,10 %), lo cual podría explicar el ligero descenso en el efecto larvicida del aceite esencial de litsea respecto al de lemongrass. No obstante, ambos aceites esenciales son los más eficaces frente a las L<sub>3</sub> de *A. simplex* s.l. a la concentración intermedia ensayada, si bien resulta más efectivo el de litsea al final del ensayo (48 horas). Este último dato podría explicarse, al menos en parte, por la presencia de limoneno en la composición del aceite esencial de litsea en cantidad apreciable (11,63 %).

La actividad larvicida mostrada por el aceite esencial de comino frente a *A. simplex* s.l., al igual que la de su principal componente (aldehído cumínico), debe ser considerada como discreta, ya que la letalidad máxima se alcanzó tan solo con la mayor de las concentraciones ensayadas y una vez transcurridas 48 horas para el aceite esencial y 24 horas para su principal componente. Estos datos están en consonancia con los obtenidos por otros autores para el comino frente a distintos agentes patógenos (Agnihotri y Vaidya., 1996; Tunç et al., 2000).

Según Burt (2004), en función de los datos publicados sobre la actividad antibacteriana de los aceites esenciales en alimentos, el orden decreciente sería: Orégano = Clavo = Culantro = Canela > Tomillo > Menta > Rosa > Mostaza > Cilantro = Salvia, y en el caso de los componentes de los aceites esenciales, el orden establecido quedaría de la siguiente forma: eugenol > carvacrol = ácido cinámico > metil chavicol > aldehído cinámico > citral = geraniol. En nuestro estudio se confirmaría, por una parte, la capacidad del aceite esencial de orégano como agente activo frente a organismos patógenos de distinta índole, v. g., *A. simplex* s.l.; por otra parte, también quedaría refrendado un mayor grado de eficacia para el carvacrol en relación con el geraniol, en consonancia con lo afirmado por Burt (2004); sin embargo, a pesar de que este autor presenta al geraniol con idéntica actividad que el citral, los resultados obtenidos por

nosotros en los ensayos *in vitro* frente a L<sub>3</sub> de *A. simplex* s.l., muestran que el citral presenta una actividad larvicida superior a la del geraniol. De cualquier forma, lo que parece estar claro, es que dicha actividad no está influenciada por la capacidad antirradicalaria, ya que ninguno de los derivados monoterpénicos ensayados mostró actividad antioxidante (IC<sub>50</sub> ≥ 650) (Tabla 9) (Hierro et al., 2004).

El estudio histológico de las L<sub>3</sub> de *A. simplex* s.l. procedentes de los ensayos *in vitro*, muestra, en términos generales, la afectación de las membranas celulares del parásito. Si bien nuestras experiencias no han incluido estudios mecanicistas tendentes a poner de manifiesto el modo de actuación de los aceites esenciales objeto de estudio, así como de sus principales componentes, en la literatura especializada sobre los monoterpenos y, en particular, en la relativa a su modo de actuación sobre distintos microorganismos, se destaca como factor a tener en cuenta en su efecto biocida la hidrofobia (o lipofilia) que los caracteriza y que, según Sikkema et al. (1995), se encuentra relacionada con su capacidad tóxica frente a microorganismos en general cuya pared celular está formada por distintos polisacáridos, dentro de los cuales abundan los glucopéptidos. Su membrana citoplasmática es una bicapa de fosfolípidos, en la que se encuentran inmersas enzimas y proteínas transportadoras. Esta membrana citoplasmática tiene baja permeabilidad para moléculas polares y cargadas, si bien compuestos apolares, tales como los hidrocarburos cíclicos, pueden penetrar fácilmente la bicapa lipídica. Este interior hidrofóbico de las bicapas lipofílicas es una matriz perfecta para moléculas hidrofóbicas tales como los hidrocarburos cíclicos y, en consecuencia, los terpenos (Sikkema et al., 1995).

La interacción de los aceites esenciales con las membranas bacterianas celular, y mitocondrial, causa cambios importantes en la estructura de las mismas, y la acumulación de dichos aceites en la parte hidrofóbica de las membranas modifica su permeabilidad, provocando en ocasiones el hinchamiento de la misma (Sikkema et al., 1995; Burt, 2004). Los cambios en la integridad de la membrana también alteran su funcionamiento, en tanto en cuanto resultan afectados distintos parámetros por la interacción de los compuestos lipofílicos con la membrana, incidiendo sobre el funcionamiento de las proteínas en ella contenidas (Sikkema et al., 1995; Carson et al., 2002). Esta interacción, según Juven et al. (1994) y Sikkema et al. (1995), tiene dos posibles mecanismos de actuación: por acumulación en la bicapa lipídica distorsionando la interacción lípido-proteína; o por unión con las partes hidrofóbicas de las proteínas de

membrana. Todo lo anteriormente expuesto produce, tarde o temprano, la muerte celular.

Los aceites esenciales con un alto contenido en componentes fenólicos, tales como eugenol (fenilpropánico), carvacrol y timol (monoterpenfenólicos), son los que han demostrado mayores propiedades antibacterianas (Karatzas et al., 2000; Lambert et al., 2001; Friedman et al., 2004). El mecanismo de acción de estos fenoles se basa en la alteración de la membrana citoplasmática, de la fuerza protón motriz, del flujo de electrones, del transporte activo y en la precipitación del contenido celular (Burt, 2004). En este efecto parece tener importancia el grupo fenólico (Dorman y Deans, 2000; Ultee et al., 2002). Se ha visto que tanto carvacrol como timol son capaces de desintegrar la parte externa de la membrana de bacterias gram positivas, liberando los lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática al ATP (adenosintrifosfato) (Burt, 2004). En concreto, el carvacrol interacciona con las membranas de las células, donde se disuelve en la bicapa fosfolipídica y se alinea con las cadenas de los ácidos grasos (formando canales a través de la membrana), permitiendo la salida de iones citoplasmáticos; esta distorsión de la estructura física podría desestabilizar y expandir la membrana, alterando su permeabilidad (Ultee, 2002). Todo esto parece concordar con los efectos observados en los cortes histológicos de las larvas del nematodo sometidas al ensayo *in vitro* frente al carvacrol (Fotos 12 y 13), donde hemos encontrado que la célula excretora resultaba lisada, al igual que las células intestinales; también fue patente la alteración de la cutícula, formando ésta proyecciones hacia el exterior. El timol, en cambio, se une a las partes hidrofóbicas de las proteínas de membrana por puentes de hidrógeno, cambiando la permeabilidad de la misma (Juven et al., 1994), con las consecuencias ya mencionadas. En el estudio histológico realizado sobre las larvas empleadas en el ensayo *in vitro* (Fotos 15 y 16), los daños provocados al parásito son intestinales, con la luz dilatada, lisada y con material celular en su interior, lo que podría ser explicado, al menos en parte, por su modo de actuación y efecto ante otros organismos patógenos (Kulevanova et al., 2000; Isman et al., 2001).

Según nuestro estudio histológico, los monoterpenos alcohólicos (geraniol y citronelol) muestran un efecto en las larvas del nematodo parecido al descrito para los monoterpenos fenólicos (carvacrol y timol); la cara luminal del intestino apareció rota, con material celular en la luz del mismo, lo que indicaría que ha habido lisis celular (Fotos 17 y 18). En el caso del citronelol, el daño observado fue mayor, ya que el

producto llegó a atravesar la cara externa del intestino y prolongó su efecto a la musculatura del parásito, formando una pompa bajo la cutícula (Foto 20). Este hecho podría explicar la mayor letalidad del citronelol respecto al geraniol a la máxima concentración probada (125 µg/mL). Sin embargo, a la mínima (31,25 µg/mL), el geraniol provocó alteraciones en la cutícula de las larvas en forma de cuernos (Foto 19), lo que puede deberse al mayor tiempo de exposición del nematodo al compuesto, dado que estos fenómenos se observaron en larvas muertas tras 48 h de exposición al producto. En el modo de actuación de los monoterpenos alcohólicos, además de tener en cuenta su condición de componentes terpénicos de los aceites esenciales de plantas aromáticas, se podría establecer una relación con el de otros alcoholes con actividad antimicrobiana como el etanol; éste se basa en la interacción con las membranas biológicas, disminuyendo su integridad y causando un incremento pasivo en el flujo de protones a través de la membrana hasta disipar la fuerza protón motriz (Sikkema et al., 1995).

Los derivados monoterpénicos aldehídicos tuvieron un comportamiento dispar. Por un lado, el citral se mostró entre los más activos en los ensayos *in vitro*, localizando su acción en el tubo digestivo del parásito, lisando la cara luminal tanto del esófago (Foto 22) como del intestino (Foto 21). Aldehído cumínico (Fotos 23 y 24) y perillaldehído (Fotos 25 y 26), sin embargo, fueron los compuestos menos activos *in vitro* frente a las larvas de *A. simplex* s.l.; su estudio histológico reveló lesiones intestinales de menor importancia que las observadas en los demás componentes, consistentes en la alteración y rotura de la cara luminal y de algunas células intestinales. Los resultados obtenidos *in vitro* por Kasuya et al. (1990) para el perillaldehído fueron similares a los nuestros, si bien no hallaron cambios aparentes en el examen histológico de las larvas, sugiriendo que el mecanismo de acción se basaba en desórdenes producidos en el sistema nervioso. Por el contrario, en nuestros ensayos, hemos encontrado cambios estructurales en el intestino del parásito, por lo que la actuación del perillaldehído, e incluso de los otros dos derivados aldehídicos, debe ser parecida a la descrita con anterioridad para los demás compuestos monoterpénicos.

En los experimentos *in vivo* de los componentes de los aceites esenciales, los resultados obtenidos no se correspondieron, en orden de actividad larvicida, con los de los ensayos *in vitro*, siendo dicho orden el siguiente:

Geraniol = Perillaldehído = Citral > Citronelol = Timol > Aldehído cumínico >  
Carvacrol

Este cambio puede ser debido, entre otros factores, a la mayor dosis (46,90 mg/0,5 mL) administrada a las ratas en el caso de los cuatro primeros compuestos (geraniol, perillaldehído, citral y citronelol) respecto a los demás, en función de la mayor DL 50 del perillaldehído (2500 mg/kg peso corporal), en relación a las de timol, aldehído cumínico y carvacrol.

El porcentaje de larvas recuperadas vivas al término del modelo de administración conjunta (Modelo A), en el caso del geraniol fue del 2,41 %, mientras que para el perillaldehído fue del 7,69 %. Tanto en las experiencias con estos dos terpenos, como con citral, citronelol y timol, ningún animal de experimentación sufrió hemorragias a lo largo del tracto gastrointestinal. El control llevado a cabo con aceite de oliva en ratas mostró un elevadísimo porcentaje de animales con hemorragias al término del Modelo A (92,86 %), por lo que podemos afirmar que la administración *in vivo* de estos derivados monoterpénicos oxidados y los nematodos de forma conjunta, inhibe de alguna forma la capacidad de fijación y/o penetración que las larvas han demostrado tener.

La realización de los Modelos B y C *in vivo* demostró que el margen de tiempo de dos horas entre la infestación y la administración de la dosis de cualquiera de los compuestos sometidos a ensayo es suficiente para que las larvas desarrollen su patogenicidad en las ratas, aumentando significativamente el número de larvas vivas ( $p < 0,0001$ ), el número de larvas vivas fijadas y/o atravesando las paredes gastrointestinales, el porcentaje de hemorragias en animales ( $p < 0,0001$ ), así como el número de larvas recuperadas en la cavidad abdominal de las ratas al final de los ensayos. De todas formas, los resultados obtenidos en los Modelos B y C muestran que los nematodos no presentaron los niveles de actividad que alcanzaron en el experimento control con aceite de oliva (92,86 % de ratas con hemorragias), ya que el porcentaje máximo de hemorragias en animales fue del 71 %, obtenido para el citral (Modelo C) y el carvacrol (Modelo B). Sin embargo, el número de larvas vivas en varios ensayos con los monoterpenos se aproximó al del control (89,04 %), como fueron los casos del citronelol (Modelo B), timol (Modelo B), aldehído cumínico (Modelo B y C) y carvacrol (A, B y C). Éste último no mostró prácticamente ninguna actividad *in vivo*

( $p < 0,0001$ ), a diferencia de lo que sucedió *in vitro*, salvo una ligera inhibición de la capacidad de penetración del nematodo y un 13,10 % de larvas muertas en el Modelo A. La menor actividad mostrada por el carvacrol *in vivo* en relación con el ensayo *in vitro*, puede deberse, al menos en parte, a la baja dosis administrada en el ensayo *in vivo*, calculada a partir de la DL<sub>50</sub> de este monoterpeno fenólico. La diferencia entre los Modelos B y C, para todos los compuestos en general, estuvo en la localización de las larvas, aumentando el número de ellas halladas en ciego, heces y cavidad en el Modelo C; parece debida a la mayor duración de este ensayo (12 horas).

A la vista de los resultados obtenidos en el conjunto de las experiencias *in vivo* llevadas a cabo con perillaldehído, citral y carvacrol, se podría afirmar que el efecto larvívica mostrado por los distintos compuestos ensayados no es dependiente del tiempo que esté en contacto con el parásito, ya que los datos correspondientes a los Modelos B y C son casi idénticos, a pesar de existir una diferencia entre uno y otro de 8 horas. En el caso del carvacrol, aunque el número de larvas vivas sea inferior en el Modelo C (76,02 %), el de muertas era idéntico y, si consideramos el alto número de ellas que no se recuperaron al final del experimento (21,69 %), y que, muy probablemente, hallan tenido tiempo de atravesar las paredes gastrointestinales y migrar a otras localizaciones (musculatura, vísceras, etc.), donde se encapsularon y que, a pesar de una exhaustiva búsqueda, no se localizaron, por lo que se podrían considerar en cierto modo como vivas, y aproximarse así al dato del Modelo B (93,98 %).

En los casos de geraniol, citronelol y timol, el número de larvas muertas aumentó en el Modelo C (36,90 %, 41,11 % y 24,64 %, respectivamente) respecto al B (11,84 %, 6,76 % y 2,73 %, respectivamente), lo cual habla a favor de que el tiempo de contacto de los compuestos con el nematodo puede ser un factor influyente en el efecto larvívica.

Un hecho común a todos los ensayos *in vivo*, fue el mayor efecto larvívica de los distintos compuestos en el Modelo A respecto a los otros dos (aunque para el carvacrol fuera solo del 12 %) ( $p < 0,0001$ ). Esto pudiera ser debido al posible ingreso *per os* de los compuestos ensayados en el parásito, si bien la mayoría de los autores coinciden en que las larvas L<sub>3</sub> no se alimentan (Yasuraoka et al., 1967; Sommerville y Davey, 1976); sin embargo, en estudios *in vitro* se ha podido comprobar que sí existe paso de medio de cultivo al interior de las larvas por vía oral (Iglesias et al., 1997). Así, si el parásito se encuentra fijado y/o atravesando las paredes del estómago se haría

imposible la entrada vía oral del producto; incluso si la larva ha abandonado el estómago hacia otros órganos del animal infestado, en la mayoría de los casos se produce la encapsulación de la misma y esta estructura que rodea a la larva podría impedir que penetrase el componente en su interior por cualquier vía. En este mismo sentido, hemos de tener en cuenta que cuando el compuesto es administrado a las dos horas de la infestación (Modelos B y C), las posibilidades de que el parásito lo ingiera son mucho menores que en el Modelo A, debido a que las larvas pueden haber migrado a otras partes del tracto gastrointestinal, además de poder encontrarse en otras localizaciones. La posible entrada *per os* de los compuestos queda en parte refrendada por el estudio histológico, tanto *in vitro* como *in vivo*, de los nematodos recuperados muertos al final de las pruebas, donde se observó que todos tenían, en mayor o menor grado, alteraciones intestinales.

Un dato de interés hallado cuando se administra carvacrol *in vivo* fue que el número de animales con hemorragias era inferior en el Modelo C (57,14 %) respecto al B (71,43 %), si bien el número de larvas recuperadas en la cavidad abdominal fue mayor en el C (19,28 %) que en el B (9,64 %). Esta circunstancia pudiera deberse a que varias larvas penetrasen juntas por un mismo punto, aprovechando la lesión producida y, por tanto, generando una única hemorragia, algo que observamos a lo largo de nuestras experiencias en varias ocasiones; también podría haber ocurrido que a medida que transcurre el tiempo se produzca una reabsorción de la hemorragia.

Las lesiones observadas en los cortes histológicos de las larvas de las experiencias *in vivo* fueron similares a las que cada monoterpeneo produjo en los ensayos *in vitro*. El timol (Foto 35), geraniol (Foto 36), citronelol (Foto 39) y el citral (Foto 41) produjeron la alteración y rotura de la cara luminal del intestino, así como la lisis de células intestinales, salida y precipitación de material celular a la luz del mismo. La cutícula apareció alterada en forma de rugosidades, abombamientos e incluso proyecciones, por acción del carvacrol (Foto 33), geraniol (Foto 37), citronelol (Foto 39) y citral (Foto 40). En la mayoría de los cortes de carvacrol, aldehído cumínico y perillaldehído, la luz esofágica y la luz intestinal estaban más abiertas de lo normal, llegando incluso a aparecer material celular en su interior, algo que hace pensar que en algún punto del intestino se debió haber producido una rotura de la pared luminal. El carvacrol, además, ocasionó en las larvas una dilatación de los cordones laterales de las mismas (Foto 34).

La especie vegetal a partir de la cual se obtiene el aceite esencial rico en perillaldehído, *P. frutescens*, se usa de manera tradicional en la cocina china para la elaboración de platos a base de pescado crudo. En este sentido, los resultados obtenidos por nosotros, podrían justificar, al menos en parte, los datos encontrados en estudios epidemiológicos, según los cuales las poblaciones que emplean *P. frutescens* para condimentar el pescado crudo, presentan menor incidencia de anisakidosis (Kasuya et al., 1990). Por otra parte, existen experimentos que ponen de manifiesto el poder antibacteriano de los aceites esenciales de tomillo y orégano en filetes de perca, salmón y bacalao, y en ensalada de huevas de bacalao (Koutsoumanis et al., 1999; Mejholm y Dalgaard, 2002; Harpaz et al., 2003); el carvacrol, citral y geraniol tienen el mismo efecto en filetes de salmón (Kim et al., 1995). Además de este efecto antibacteriano, los aceites esenciales contenidos en las plantas aromáticas (orégano, tomillo, romero, etc.), añaden a los alimentos condimentados con ellas aroma y sabor. En lo relativo a los componentes mayoritarios de estos aceites esenciales, se conoce que la modificación de las características organolépticas consiste, en el caso del carvacrol, en un aroma ligeramente acre, que para el citral es limonado, y rosáceo cuando el componente implicado es el geraniol (Burt, 2004).

En lo que se refiere a la curva dosis-respuesta, seleccionamos los dos componentes de los aceites esenciales que mostraron mayor poder larvicida en los ensayos *in vivo*, geraniol (Gráfica 43) y perillaldehído (Gráfica 44). Los resultados obtenidos al aplicar el Modelo A *in vivo* con el doble de la dosis administrada con anterioridad (2 x 46,90 µg/mL), muestran un 100 % de eficacia para el perillaldehído, con un incremento del 9%; el geraniol, en las mismas condiciones, incrementó su letalidad en un 2,5 % (97,62 %). Cuando la dosis administrada fue la mitad (½ x 46,90 µg/mL), la disminución en el número de larvas muertas fue significativa en ambos casos (p<0,0001): 17,95 % para el geraniol y 33,33 % para el perillaldehído. Cabe destacar que en ningún caso se observaron hemorragias en los animales de experimentación, por lo que, a pesar de la disminución tanto de la dosis como del efecto larvicida, podría afirmarse que tanto geraniol como perillaldehído dan lugar a una disminución de la capacidad de fijación y/o penetración de las larvas de *A. simplex* s.l..

Los aceites esenciales pueden producir fenómenos irritativos cuando actúan directamente sobre las mucosas (Navarro et al., 1999). En este sentido, Horne et al. (2001) han descrito para distintos aceites esenciales el daño que causan sobre la

membrana celular, así como la posibilidad de lisis en las células de la mucosa intestinal. Por ello, con el fin de establecer si los componentes principales de los aceites esenciales objeto de esta memoria de Tesis Doctoral producían algún daño en las mucosas del tracto gastrointestinal de las ratas, llevamos a cabo la medición de la actividad MPO, parámetro indicativo de daño tisular (Krawisz et al., 1984), en muestras de estómago, intestino y ciego de los animales, que habían sido expuestos a la misma dosis utilizada en los ensayos *in vivo* de dichos productos. Los resultados obtenidos en todas las muestras analizadas (Tabla 33), mostraron que en ningún momento la actividad MPO de los tejidos analizados estuviera por encima de lo normal, por lo que se puede decir que los componentes no producen irritación significativa sobre las mucosas gastrointestinales de las ratas ( $p > 0,3$ ).



# CONCLUSIONES



1. Todos los aceites esenciales ensayados poseen actividad larvicida *in vitro* frente a L<sub>3</sub> de *A. simplex* s.l. a la concentración de 125 µg/mL. Destaca el aceite esencial de lemongrass, con una letalidad máxima desde las 4 horas.

2. Los principales componentes de dichos aceites esenciales mostraron una alta actividad larvicida *in vitro* a la mayor concentración ensayada. En el caso de carvacrol, timol, citronelol y citral, el porcentaje de larvas muertas fue del 100 % a las 4 horas del inicio de la experiencia.

3. El estudio histológico y los resultados del experimento *in vivo* permiten afirmar que la actuación de los derivados monoterpénicos ensayados tiene lugar en el tracto intestinal del parásito y, en menor medida, en la cutícula del mismo.

4. Geraniol, perillaldehído, citral y citronelol administrados a la dosis de 46,90 mg/0,5 mL a la vez que los nematodos, impiden la fijación y/o penetración de las larvas de *A. simplex* s.l. en las paredes gastrointestinales de las ratas.

5. Ninguno de los componentes ensayados *in vivo* producen irritación sobre las mucosas gastrointestinales de los animales de experimentación.

6. La consideración conjunta de los resultados obtenidos con el geraniol y el perillaldehído frente a L<sub>3</sub> de *Anisakis simplex* s.l., y la ausencia de daño sobre las células de la mucosa intestinal, hablan en favor del uso preventivo de estos compuestos y/o de las plantas aromáticas que los contienen frente a la anisakiosis, siempre a expensas de los imprescindibles y necesarios estudios clínicos.



# BIBLIOGRAFÍA





Abollo E. (1999). Anisáquidos en aguas de Galicia: del gen al ecosistema. Tesis Doctoral, Universidad de Vigo.

Adams R.P. (1995). Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry. Carol Stream , Allured Publ. Corp., IL.

Agarwall I. y Mathela C.S. (1979). Study of antifungal activity of some terpenoids. *Indian Drugs Pharm. Ind.* 14: 19-21.

Agnihotri S. y Vaidya A.D. (1996). A novel approach to study the antibacterial properties of volatile components of selected Indian medicinal herbs. *Ind. J. Exp. Biol.* 34: 712-715.

Aliyiannis N., Kalpoutzakis E., Mitaku S., Chinou I.B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agr. Food. Chem.* 49: 4168-4170.

Allegrini J., Simeon de Buochberg M. y Boillots A. (1972). Essential oil antibacterial power. *Pharm.* 29: 819-827.

Anderson R.C. (1992). Nematodes parasites of vertebrates. Their development and transmission. CAB International, Wallingford.

Andrews R.E., Parks L.W. y Spence K.D. (1980). Some effects of Douglas fir terpenes on certain microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 301-304.

Angot V. y Brasseur P. (1995). Les larves d'anisakidés et leur incidence sur la qualité des poissons et produits de poisson. *Revue Méd. Vét.* 146: 791-804.

Arenal-Vera J.J., Marcos-Rodríguez J.L., Borrego-Pintado M.H., Bowakin-Dib W., Castro-Lorenzo J. y Blanco-Álvarez J.L. (1991). Anisakiasis como causa de apendicitis aguda y cuadro reumatológico. El primer caso en la literatura médica. *Rev. Esp. Enf. Dig.* 79: 355-358.

Arras G. y Usai M. (2001). Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest *Citrus* pathogens: chemical analysis of *Thymus capitatus* oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. *J. Food. Prot.* 64: 1025-1029.

Asami K., Watanuki T., Sakai H., Imano H. y Okamoto R. (1965). Two cases of stomach granuloma caused by *Anisakis*-like larvae nematodes in Japan. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.* 14: 119-123.

Asami K. e Inoshita Y. (1967). Experimental anisakiasis in guinea pigs: Factors influencing infection of larvae in the host. *Jpn. J. Parasitol.* 16: 415-422.

Banning P.V. (1971). Some notes on a succesful rearing of the herring-worm *Anisakis marina* L. (Nematoda: Heterocheilidae). *J. Cons. Int. Explor. Mer.* 34: 84-88.

Bauchot M.L. y Pras A. (1987). Guía de los peces del mar de España y de Europa. Editorial Omega, Barcelona, pp: 170.

Berland B. (1961). Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia* 2: 1-50.

Boettge K. (1954). Huiles essentielles et spasmolyse. *Medizinische Natatschrift* 8: 444-446.

Botha B.M. y McCrindle C.M. (2000). An appropriate method for extracting the insect repellente citronellol from an indigenous plant (*Pelargonium graveolens* L'Her) for potential use by resource-limited animal owners. *J. South African Veter. Assoc.* 71: 103-105.

Boyanova L. y Neshev G. (1999). Inhibitory effect of rose oil products on *Helicobacter pylori* growth *in vitro*: preliminary report. *J. Med. Microbiol.* 48: 705-706.

Bruins A.P. (1979). Negative ion chemical ionization mass spectrometry in the determenation of components in essential oils. *Anal. Chem.* 51: 967-972.

- Bullerman L.B., Lieu F.Y. y Seier S.A. (1977). Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. *J. Food Sci.* 42: 1107-1109.
- Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223-253.
- Buzzell G.R. y Sommerville R.I. (1985). The structure of the esophagus in the third-stage infective larva of *Anisakis* sp. (Nematoda: Anisakidae). *Trans. Am. Microsc. Soc.* 104: 86-94.
- Cabo J., Bravo L., Jiménez J. y Navarro C. (1980). *Thymus hiemalis* Lange. Etude qualitative et quantitative de son huile essentielle per G.C.. *Planta Med.* 39: 270.
- Carneseccchi S., Schneider Y., Ceraline J., Duranton B., Gosse F., Seiler N. y Raul F. (2001). Geraniol, a component of plant essential oils, inhibit growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298: 197-200.
- Carson C.F., Mee B.J. y Riley T.V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1914-1920.
- Carvajal J. (1984). Anisakiasis. *Parasitología Clínica. Publicaciones Técnicas Mediterráneo, Santiago de Chile.* 23: 183-186.
- Chaumont J.P. y Léger D. (1992). Campaign against allergenic moulds in dwellings. Inhibitor properties of essential oil of *Geranium* "Bourbon", citronellol, geraniol and citral. *Ann. Pharmaceut. Franc.* 50: 156-166.
- Chinou I.B., Roussis V., Perdetzoglou D. y Loukis A. (1996). Chemical and biological studies on two *Helicrysum* species of Greek origin. *Planta Med.* 62: 377-379.

Clavel A., Delgado B., Sánchez-Acedo C., Carbonell E., Castillo J., Ramírez J., Quílez J., Gómez-Lus R. y Kagei N. (1993). A live *Anisakis physeteris* larva found in the abdominal cavity of a woman in Zaragoza, Spain. *Jpn. J. Parasitol.* 42: 445-448.

Cocheton J.J., Cabou I. y Lecomte I. (1991). Anisakiase et infections par les anisakidés. *Ann. Med. Interne* 142: 121-130.

Croteau R. (1977). Site of monoterpene biosynthesis in *Majorana hortensis* leaves. *Plant. Physiol.* 59: 519-520.

Croteau R. (1981). Biosynthesis of monoterpenes. En: Biosynthesis of isoprenoid compounds. Porter I.J.W. y Spurgeon S.L. (eds.). Washington, pp: 226-282.

Crowell P.L. (1999). Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *J. Nutrition* 129: 775-778.

Cusí Sánchez V., González Cuevas A., Juncosa Morros T., Portús Vinyeta M. y Parri Ferrandis F. (1999). Larvas de anisákido en hernia epigástrica incarcerada. *An. Esp. Pediatr.* 50: 413-414.

Daschner A., Alonso-Gómez A., Mora C., Moreno-Ancillo A., Villanueva R. y López-Serrano M.C. (1997). Anisakiasis gastro-alérgica con parasitación masiva. *Rev. Esp. Alergol. Inmunol. Clín.* 12: 370-372.

Davey J.T. (1971). A revision of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Ascaridida). *J. Helminthol.* 45: 51-72.

Del Rey A. (2003). Estudio parasitológico, epidemiológico y clínico de la anisakidosis en la comarca de Antequera. Tesis Doctoral, Universidad de Granada.

De Montigni S., Prevot S. y Basset D. (1991). Anisakiase gastrique: guérison par extraction endoscopique retardée. *La Presse Médicale* 20: 180.

- Del Olmo M., Cózar A., Martínez J.M. y Ureña C. (1998). Anisakiasis a nivel ileal. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 90: 120-123.
- Deardorff T.L., Fukumura T. y Raybourne R.B. (1986). Invasive anisakiasis. A case report from Hawaii. *Gastroenterology* 90: 1047-1050.
- Desowitz R.S. (1986). Human and experimental anisakiasis in the United States. *Hokkaido J Med Sci* : 358-371.
- Dodson C.H., Dressler R.L., Hills H.G., Adams R.M. y Williams N.H. (1969). Biologically active compounds in Orchid fragrances. *Science* 164: 1243-1249.
- Dorman H.J. y Deans S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88: 308-316.
- Dujardin F. (1845). Cited from Stiles and Hassall (1899).
- Fang H.J., Su X.L., Liu H.Y., Chen Y.H. y Ni J.H. (1989). Studies on the chemical components and anti-tumour action of the volatile oils from *Pelargonium graveoleus*. *Acta Pharmaceut. Sinica* 24: 366-371.
- Farag R.S., Shalaby A.S., El-Baroty G.A., Ibrahim N.A., Ali M.A. y Hassan E.M. (2004). Chemical and biological evaluation of the essential oils of different *Melaleuca* species. *Phytother. Res.* 18: 30-35.
- Feldman D.B. y Seely J.C. (1988). *Necropsy Guide: Rodents and the Rabbit*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Francis M.J.O. (1971). Monoterpene biosynthesis. En: *Aspects of terpenoids chemistry and biochemistry*. Goodwin T.W. (ed.). Academic Press, London, pp: 29-49.

Friedman M., Henika P.R., Levin C.E. y Mandrell R.E. (2004). Antibacterial activities of plant essential oils and their constituents against *Escherichia coli* 0157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *J. Agric. Food. Chem.* 52: 6042-6048.

Gaasenbeek C.P.H., Borgsteede F.H.M., Eijck I.A.J.M., Schuurman T. y van der Gaag M.A. (2004). The effect of phytotherapy on experimental *Ascaris suum* infections in pigs. IX European Multicolloquium of Parasitology (EMOP IX), Valencia: 356.

García del Moral R. (1993). Laboratorio de Anatomía Patológica. Interamericana McGraw-Hill, Madrid.

Goldfain D. y Potet F. (1984). Anisakiase gastric. Diagnostic et traitement endoscopiques. *La Presse Médicale* 13: 2586.

Gómez B., Tabar A.I., Larrinaga B., Álvarez M.J., García B.E. y Olaguibel J.M. (1998). Eosinophilic gastroenteritis and *Anisakis*. *Allergy* 53: 1148-1154.

Goto C., Kasuya S., Koga K., Ohtomo H. y Kagei N. (1990). Lethal efficacy of extract from *Zingiber officinale* (traditional Chinese medicine) or [6]-shogaol and [6]-gingerol in *Anisakis* larvae *in vitro*. *Parasitol. Res.* 76: 653-656.

Govere J., Durrheim D.N., Du Toit N., Hunt R.H. y Coetzee M. (2000). Local plants as repellents against *Anopheles arabiensis*, in Mpumalanga Province, South Africa. *Central African J. Med.* 46: 213-216.

Grabda J. (1976). Studies of the life cycle and morphogenesis of *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809) (Nematoda: Anisakidae) cultured *in vitro*. *Acta Ichthyol. Piscat.* I: 119-139.

Halligan J.P. (1975). Toxic terpenes from *Artemisia californica*. *Ecology* 56: 999-1003.

Hammer K.A., Carson C.F. y Riley T.V. (1997). In vitro susceptibility of *Malassezia furfur* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Med Vet Mycol* 35: 375-377.

- Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. (1998). In vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (Tea tree) oil and tea tree oil products against *Candida* spp. *J Antimicrob Chemother* 42: 591-595.
- Harpaz S., Glatman L., Drabkin V. y Gelman A. (2003). Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwater-reared Asian sea bass (*Lates calcarifer*). *J. Food Prot.* 66: 410-417.
- Hartwich G. (1974). Key to genera of the Ascaridoidea. CH1 Key to the Nematode Parasites of Vertebrates. Anderson C., Chabaud A.G. y Willmott S. (eds.). Commonwealth Agricultural Bureaux, Fraham Royal, Bucks.
- Hierro I., Valero A., Pérez P., González P., Cabo M.M., Montilla M.P. y Navarro M.C. (2004). Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. *Phytomed.* 11: 77-82.
- Hojgaard D.P. (1998). Aspects of the life cycle of whaleworm, *Anisakis simplex* (Nematoda: Ascaridoidea), and its infection of saithe, *Pollachius virens* (L.). Tesis Doctoral, Universidad de Copenague.
- Horne D.S., Holm M., Oberg C., Chao S. y Young D.G. (2001). Antimicrobial effects of essential oils on *Streptococcus pneumoniae*. *J. Essent. Oil Res.* 13: 387-392.
- Hubert B., Bacou J. y Belveze H. (1989). Epidemiology of human anisakiasis: incidence and sources in France. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40: 301-303.
- Iglesias L., Valero A. y Adroher F.J. (1997). Some factors which influence the *in vitro* maintenance of *Anisakis simplex* (Nematoda). *Folia Parasitol.* 44: 297-301.
- Ishikura H. (1969). Occurrence of anisakiasis and its clinical presentation. *Saishin Igaku* 24: 357-365.

Ishikura H. (1990). Clinical features of intestinal anisakiasis. Intestinal anisakiasis in Japan. Springer-Verlag, Tokyo, pp: 89-100.

Ishikura H., Kikuchi K., Nagasawa K., Ooiwa T., Takamiya H., Sato N. y Sugane K. (1992). Anisakidae and anisakidosis. Progress in Clinical Parasitology III. Sun T. (ed.). Springer-Verlag, New York, pp: 43-102.

Isman M.B., Wan A.J. y Passreiter C.M. (2001). Insecticidal activity of essential oils to the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*. *Fitoter.* 72: 65-68.

Jenning W. y Shibamoto T. (1980). Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography. Academic Press, New York.

Juven B.J., Kanner J., Schved F. y Weisslowicz H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 626-631.

Kagei N., Orikasa H., Hori E., Sannomiya A. y Yasumura Y. (1995). A case of hepatic anisakiasis with a literal survey for extra-gastrointestinal anisakiasis. *Jpn. J. Parasitol.* 44: 346-351.

Kanias C.D. y Loukis A. (1987). Determination and correlation of active constituents and trace elements in the medicinal plant *T. capitatus*. En: Fresenius Zeitschrift fur Analytische Chemie. Haffman y Link (eds.), pp: 355-357.

Karaman S., Digrak M., Ravid U. e Ilcim A. (2001) Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *J Ethnopharmacol* 76: 183-186.

Karatzas A.K., Bennik M.H., Smid E.J. y Kets E.P. (2000). Combined action of S-carvone and mild heat treatment on *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Appl. Microbiol.* 89: 296-301.

- Kasuya S., Goto C. y Ohtomo H. (1988). Studies on prophylaxis against anisakiasis-A screening of killing effects of extracts from foods on the larvae. *Jpn. Assoc. Infect. Dis.* 62: 1152-1156.
- Kasuya S., Hamamo H. e Izumi S. (1989). Gastric anisakiasis with anaphylactoid reactions. *A. C. I. News* 1: 13-14.
- Kasuya S., Goto C., Koga K., Ohtomo H., Kagei N. y Honda G. (1990). Lethal efficacy of leaf extract from *Perilla frutescens* (traditional Chinese medicine) or perillaldehyde on *Anisakis* larvae *in vitro*. *Jpn. J. Parasitol.* 39: 220-225.
- Kayser O. y Kolodziej H. (1997). Antibacterial ativity of extracts and constituents of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*. *Planta Med.* 63: 508-510.
- Kim J.M., Marshal M.R., Cornell J.A., Preston J.F. y Wei C.L. (1995). Antibacterial activity of carvacrol, citral and geraniol against *Salmonella typhimurium* on culture medium and on fish cubes. *J. Food Sci.* 60: 1364-1374.
- Knowles J. y Roller S. (2001). Efficacy of chitosan, carvacrol, and a hydrogen peroxide-based biocide against foodborne microorganisms in suspension and adhered to stainless steel. *J Food Prot* 64: 1542-1548.
- Koie M., Berland B. y Burt M.D.B. (1995). Development to third stage larva occurs in eggs of *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 52: 134-139.
- Koutsoumanis K., Lambropoulou K. y Nychas G.J.E. (1999). A predictive model for the non thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial. *J. Food Microbiol.* 49: 63-74.
- Kozima K., Oyanagi T. y Shiraki K. (1966). Pathology of the anisakiasis. *Nippon Rinsho* 24: 2314-2323.

Krawisz J.E., Sharon P. y Stenson W.F. (1984). Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 87: 1344-1350.

Kwee H.G. y Sautter R.L. (1987). Anisakiasis. *AFP* 36: 137-140.

Kulevanova S., Kaftandzieva A., Dimitrovska A., Stefkov G., Grdanoska T. y Panovski N. (2000). Investigation of antimicrobial activity of essential oil of several Macedonian *Thymus* L. species (Lamiaceae). *Bollet. Chim. Farmaceut.* 139: 276-280.

Kurita N., Miyaji M., Kurane R. Takahara Y. (1981). Antifungal activity of components of essential oils. *Agric. Biol. Chem.* 45: 945-952.

Lambert R.J., Skandamis P.N., Coote P.J. y Nychas G.J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91: 453-462

Lampman R., Eckenbach U, Seigler D. y Novak R. (2000). Laboratory evaluations of methylated soy oil and monoterpenes as mosquito larvicides. *J. Am. Mosquito Contr. Assoc.* 16: 153-157.

Lee S., Tsao R., Peterson C. y Coats J.R. (1997). Insecticidal activity of monoterpenoids to western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae), twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae), and house fly (Diptera: Muscidae). *J. Econ. Entomol.* 90: 883-892.

Lindberg C.M., Melathopoulos A.P. y Winston M.L. (2000). Laboratory evaluation of miticides to control *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidea), a honey bee (Hymenoptera: Apidae) parasite. *J. Econ. Entomol.* 93: 189-198.

Lis-Balchin M. y Deans S.G. (1997). Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* 82: 759-762.

- Lis-Balchin M., Buchbauer G., Ribisch K. y Wenger M.T. (1998). Comparative antibacterial effects of novel *Pelargonium* essential oils and solvent extracts. *Lett. Appl. Microbiol.* 27: 135-141.
- Loomis W.D. y Croteau R. (1980). Biochemistry of terpenoids. En: *Lipids: structure and function*. Stumpf P.K. (ed.). New York, pp: 363-418.
- López Peñas D., Ramírez Ortiz M.L., del Rosal Palomeque R., López Rubio F., Fernández Crehuet R. y Miño Fugarolas G. (2000). Estudio de 13 casos de anisakiasis en la provincia de Córdoba. *Med. Clínn.* 114: 177-180.
- López Vélez R., García A., Barros C., Manzarbeitia F. y Oñate J.M. (1992). Anisakiasis en España. Descripción de 3 casos. *Enf. Infecc. y Microbiol. Clin.* 10: 158-161.
- Mahmoud A.L. (1994). Antifungal action and antiaflatoxic properties of some essential oil constituents. *Lett. Appl. Microbiol.* 19: 110-113.
- Manley K.M. y Embil J.A. (1989). *In vitro* effect of ivermectin on *Pseudoterranova decipiens* survival. *J. Helminthol.* 63: 72-74.
- Mansour S.A., Messeha S.S. y el-Gengaihi S.E. (2000). Botanical biocides. 4. Mosquitocidal activity of certain *Thymus capitatus* constituents. *J Nat Toxins* 9: 49-62.
- Margolis L. (1977). Public health aspects of "codworm" infection: a review. *J. Fish. Res. Board Can.* 34: 887-898.
- Martínez-Ubeira F., Valiñas B., Lorenzo S., Iglesias R., Figueiras A. y García-Villaescusa R. (2000). Anisakuosis y alergia. Un estudio seroepidemiológico en la Comunidad Autónoma Gallega. Documentos técnicos de Saúde Pública B 24. Xunta de Galicia, España.

Martins A.P., Salgueiro L., Gonçalves M.J., da Cunha A.P., Vila R., Canig S., Mazzoni V., Tomi F. y Casanova J. (2001). Essential oil composition and antimicrobial activity of three Zingiberaceae from S. Tome e Principe. *Planta Med.* 67: 580-584.

Mateo C., Morera M.P., Sanz J., Calderón J. y Hernández A. (1978). Estudio analítico de aceites esenciales procedentes de plantas españolas. 1º Especies del género *Thymus*. *Riv. Ital. E.P.P.O.S.* 60: 621-627.

Matsui T., Lida M., Murakami M., Kimura Y., Fujishima M., Yao Y. y Tsuji M. (1985). Intestinal anisakiasis: clinical and radiological features. *Radiology* 157: 299-302.

Matsumoto T., Lida M., Kimura Y., Tanaka K., Kitada T. y Fujishima M. (1992). Anisakiasis of the colon: radiologic and endoscopic features in six patients. *Radiology* 183: 97-99.

Mattiucci S., Nascetti G., Cianchi R., Paggi L., Arduino P., Margolis L., Bratney J., Webb S., D'Amelio S., Orecchia P. y Bullini L. (1997). Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex, with evidence for a new species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *J. Parasitol.* 83: 401-416.

Mattiucci S., Paggi L., Nascetti G., Abollo E., Webb S.C., Pascual S., Cianchi R. y Bullini L. (2001). Genetic divergence and reproductive isolation between *Anisakis brevispiculata* and *Anisakis physeteris* (Nematoda: Anisakidae). *Int. J. Parasitol.* 31: 9-14.

Mattiucci S., Paggi L., Nascetti G., Portes Santos C., Costa G., Di Benedetto A.P., Ramos R., Argyrou M., Cianchi R. y Bullini L. (2002). Genetic markers in the study of *Anisakis typica* (Diesing, 1860): larval identification and genetic relationships with other species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae). *Syst. Parasitol.* 51: 159-170.

- Mattiucci S., Nascetti G., Ewbb S.C., Cianchi R. y Bullini L. (2004). Genetic evidence of two new biological species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae): genetic relationships with the other species of the genus, systematic and ecological inferences. IX European Multicolloquium of Parasitology (EMOP IX), Valencia: 552.
- Megalla S.E., el-Keltawi N.E.M. y Ross S.A. (1980). A study of antimicrobial action of some essential oil constituents. *Herba Pol.* 26: 181-186.
- Mejholm O. y Dalgaard P. (2002). Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 27-31.
- Minamoto T., Sawaguchi K., Ogino T. y Mai M. (1991). Anisakiasis of the colon: report of two cases with emphasis on the diagnostic and therapeutic value of colonoscopy. *Endosc.* 23: 50-52.
- Moore D.A.J., Girdwood R.W.A. y Chiodini P.L. (2002). Treatment of anisakiasis with albendazole. *The Lancet* 360: 54.
- Morillas Márquez F., Navarro Moll C., Montilla Herrera P., Pérez Galindo P., Morales Yuste M. y Martín Sánchez J. (2004). Activity of the monoterpene derivates carvacrol, linalool and  $\alpha$ -terpineol, obtained from aromatic plants, on *Leishmania infantum*. IX European Multicolloquium of Parasitology (EMOP IX), Valencia: 147.
- Mozgovoi A.A. (1951). Ascarids of mammals of the USSR (Anisakoidea). *Tr. Gel'mintol. Lab.* 5: 14-22.
- Murata I. y Yasuda I. (1989). Mortal or inhibitory effects with chinese medicine on the activity of *Anisakis* type 1 larvae. *Jpn J. Parasitol.* 38: 43.
- Nakata H., Takeda K. y Nakayama T. (1980). Radiological diagnosis of acute gastric anisakiasis. *Radiology* 135: 49-53.

Nascetti G., Paggi L., Orecchia P., Smith J.W., Mattiucci S. y Bullini L. (1986). Electrophoretic studies on the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae) from the Mediterranean and North-East Atlantic. *Int. J. Parasitol.* 16: 633-640.

Navarro M.C., Montilla M.P., Martín A., Jiménez J. y Utrilla M.P. (1993). Free radical scavenger and antihepatotoxic activity of *Rosmarinus tomentosus*. *Plana. Med.* 59: 312-314.

Navarro M.C., Cabo M.M., Crespo M.E. y Jiménez J. (1999). Mono-, sesqui- y diterpenos. En: Farmacognosia General. Ángel M<sup>a</sup> Villar del Fresno (ed.). Síntesis, Madrid, pp: 153-172.

Ogunlana E.O., Hoglund S., Onawunmi G. y Skold O. (1987). Effects of lemongrass oil on the morphological characteristics and peptidoglycan synthesis of *Escherichia coli* cells. *Microbios* 50: 43-59.

Oh H.K., Sakai T., Jones M.B. y Longhurst W.M. (1967). Effect of various essential oils isolated from Douglas fir needles upon sheep and deer rumen microbial activity. *Appl. Microbiol.* 15: 777-784.

Olveira A., Sánchez Rancaño S., Conde Gacho P., Moreno A., Martínez A. y Comas C. (1999). Anisakiasis gastrointestinal. Siete casos en tres meses. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 91: 71-72.

Olson A.C., Lewis M.D. y Hauser M.L. (1983). Proper identification of anisakine worms. *Am. J. Med. Technol.* 49:111-114.

Onawunmi G.O., Yisak W.A. y Ogunlana E.O. (1984). Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.). *Staph. J Ethnopharmacol.* 12: 279-286.

Onawunmi G.O. y Ogunlana E.O. (1985). Effects of lemongrass oil on the cells and spheroplasts *Escherichia coli* NCTC 9001. *Microbios Lett.* 28: 63-68.

Orecchia P., Paggi L., Mattiucci S., Smith J.W., Nascetti G. y Bullini L. (1986). Electrophoretic identification of larvae and adults of *Anisakis* (Ascaridida: Anisakidae). *J. Helminthol.* 60: 331-339.

Oshima T. (1972). *Anisakis* and anisakiasis in Japan and adjacent area. En: Progress of Medical Parasitology in Japan IV. Morishita K., Komiya Y. y Matsubayashi H. (eds.). Meguro Parasitological Museum, Tokyo, pp: 304-393.

Oshima T. y Kliks M. (1987). Effects of marine mammal parasites on human health. *Int. J. Parasitol.* 17: 415-421.

Oshima T., Nakazawa M. y Sugiyama Y. (1990). Effect of mebendazole on *Anisakis simplex* larvae *in vivo*. Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Congress of Parasitology, *Bull. Soc. Franc. Parasitol.* 8: 1058.

Paggi L., Nascetti G., Webb S., Mattiucci S., Cianchi R. y Bullini L. (1998). A new species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales (Ziphiidae): allozyme and morphological evidence. *Syst. Parasitol.* 40: 161-174.

Papageorgiov V.P. y Argyriadov N. (1981). Trace constituents in the essential oil of *Thymus capitatus*. *Phytochemistry* 20: 2995-2997.

Pattnaik S., Subramanyam V.R., Bapaji M. y Kole C.R. (1997). Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios* 89: 39-46.

Pellecuer J., Roussel J.L., Andary C., Privat G., Jacob M. y Tomei R. (1977). Recherche du pouvoir antifongique de quelques huiles essentielles. *Riv. Ital. E.P.P.O.S.* 61:10-11.

Periago P.M. y Moezelaar R. (2001). Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* 68: 141-148.

Perry N.S., Houghton P.J., Sampson J., Theobald A.E., Hart S., Lis-Balchin M., Houtt J.R., Evans P., Jenner P., Milligan S. y Perry E.K. (2001). In-vitro activity of *S. lavandulaefolia* (Spanish sage) relevant to treatment of Alzheimer's disease. *J. Pharmacy Pharmacol.* 53: 1347-1356.

Pethitory J.C. y Marty B. (1988). L'anisakiase en France. *La Lettre del'Infectiologue* 3: 96-99.

Rajab M.S., Cantrell C.L., Franzblau S.G. y Fischer N.H. (1998). Antimycobacterial activity of (E)-phytol and derivatives: a preliminary structure-activity study. *Planta Med.* 64: 2-4.

Rao B.G.N.V. y Nigam S.S. (1970). In vitro antimicrobial efficiency of some essential oils. *Flavour Ind.* 1: 725-729.

Revert A. (1975). Estudio comparativo de diversas especies del género *Thymus* L. desde el punto de vista de sus esencias. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, pp: 427.

Rice P.J. y Coats J.R. (1994). Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 87: 1172-1179.

Rochat J. (1970). Essential oils. Antispasmodic activity and active constituents. *Bull. Techn. Gattefossé SFPA* 65: 62-67.

Rosales M.J., Mascaró C., Fernández C., Luque F., Sánchez Moreno M., Parras L., Cosano A. y Muñoz J.R. (1999). Acute intestinal anisakiasis in Spain: a fourth-stage *Anisakis simplex* larva. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 823-826.

Ruitenbergh E.J., Berkvens J.M. y Duyzings M.J.M. (1971). Experimental *Anisakis marina* infections in rabbits. *J. Comp. Path.* 81: 157-163.

- Shirama M., Koga T., Ishibashi H., Uchida S., Ohta Y. y Shimoda Y. (1992). Intestinal anisakiasis: US in diagnosis. *Radiology* 185: 789-793.
- Sikkema J., de Bont J.A.M. y Poolman B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59: 201-222.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J. y Klenk D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.
- Smith J.W. y Wootten R. (1978). Anisakis and Anisakiasis. *Adv. Parasitol.* 16: 93-163.
- Sommerville R.I. y Davey K.G. (1976). Stimuli for cuticle formation and ecdysis *in vitro* of the infective larva of *Anisakis* sp. (Nematoda: Ascaridoidea). *Int. J. Parasitol.* 6: 433-439.
- Stiles C.W. y Hassall A. (1899). Internal parasites of the seal. En: The fur seals and fur-seal island of the north pacific ocean, Part III. Jordan D.S (ed.), Report on Fur Seal Investigations, Washington, pp: 99-177.
- Suzuki J., Murata I., Enokida R. y Yasuda I. (1994). Effects of Chinese medicine for helminth (VII). Minimum lethal concentration on 3rd stage larvae of *Anisakis simplex* with the natural compounds, isolated from crude drugs and several kinds of derivatives. *Annual Report of the Tokio Metropolitan Research Laboratory of Public Health* 45: 35-41.
- Tawatsin A., Wratten S.D., Scott R.R., Thavara U. y Techadmrongsin Y. (2001). Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. *J. Vector Ecol.: J. Soc. Vector Ecol.* 26: 76-82.
- The Merck Index (1996). 12<sup>th</sup> edition, New Jersey, pp: 1223.

Tisserand R. y Balacs T. (1995). Essential Oil Safety. A guide for health care professionals. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp: 186-189.

Tojo J., Santamarina M.T., Peris D., Ubeira F.M., Leilo S.L. y Sanmartin M.L. (1992). *In vitro* effect of anthelmintics on *Anisakis simplex* survival. *Jpn J. Parasitol.* 41: 473-480.

Tsoukatou M., Tsitsimpikou C., Vagias C. y Roussis V. (2001). Chemical intra-Mediterranean variation and insecticidal activity of *Crithmum maritimum*. *Z Naturforsch* 56: 211-215.

Tunç I., Berger B.M., Erler F. y Dagl F. (2000). Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored- product insects. *J. Stor. Prod. Res.* 36: 161-168.

Ultee A., Kets E.P.W. y Smid E.J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4696-4610.

Ultee A., Slump R.A., Steging G. y Smid E.J. (2000). Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *J. Food Prot.* 63: 620-624.

Ultee A. (2002). Bactericidal action of carvacrol towards the food pathogen *Bacillus cereus*. A Case Study of a Novel Approach to Mild Food Preservation. Wageningen University, The Netherlands.

Uribe S., Ramírez J. y Peña A. (1985). Effects of  $\beta$ -pineno on yeast membrane functions. *J. Bacteriol.* 161: 1195-1200.

Valero A., Mira-Gutiérrez J., Pérez-Cano R., Sanz-Domínguez J., Geraldía-Loma M., García-Herruzo J., García-Martos P. y Adroher F.J. (1992). Descripción de un caso de anisakiosis humana. IX Reunión Científica de Parasitólogos Españoles, León: 69.

Van der Broucke C.O. y Lemli J.A. (1980). Antispasmodic activity of *Origanum compactum*. *Planta Med.* 38: 317-331.

Van Thiel P.H., Kuipers F.C., Roskam T.H. (1960). A nematode parasitic to herring, causing acute abdominal syndromes in man. *Trop. Geogr. Med.* 12: 97-113.

Van Thiel P.H. (1962). Anisakiasis. *Parasitology* 52: 16-17

Varel V.H. y Miller D.N. (2001). Plant-derived oils reduce pathogens and gaseous emissions from stored cattle waste. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1366-1370.

Vartak P.H. y Sharma R.N. (1993). Vapour toxicity & repellence of some essential oils & terpenoids to adults of *Aedes aegypti* (L) (Diptera: Culicidae). *Indian J. Med. Res.* 97: 122-127.

Velutti A., Sanchis V., Ramos A.J., Egido J. y Marín S. (2003). Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *Int. J. Food Microbiol.* 2757: 1-10.

Verhamme M.A.M. y Ramboer C.H.R (1988). Anisakiasis caused by herring in vinegar: a little known medical problem. *Gut* 29: 843-847.

Viollon C. y Chaumont J.P. (1994). Antifungal properties of essential oils and their main componentes upon *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 128: 151-153.

Viu M., Sanchez-Acedo C., del Cacho E., Quilez J. y Lopez-Bernad F. (1996). Occurrence of anisakid larvae (Nematoda: Ascaridida) in fresh market fish from Zaragoza (Spain). *Res. Rev. Parasitol.* 56: 25-28.

Weerasooriya M.V., Fujino T., Ishii Y. y Kagei N. (1986). The value of external morphology in the identification of anisakid nematodes: a scanning electron microscope study. *Z. Parasitenkd.* 72: 765-778.

Yasuraoka K., Koyama T. y Kato K. (1967). Studies on the *in vitro* axenic development of *Anisakis* larvae (1). *Jpn. J. Parasitol.* 16: 290-291.

Yousef R.T. y Tawil G.G. (1979). Antimicrobial activity of volatile oil components. *Manuf. Chem. Aerosols News* 50: 59-63.

Zhu B.C., Henderson G., Chen F., Fei H. y Laine R.A. (2001). Evaluation of vetiver oil and seven insect-active essential oils against the Formosan subterranean termite. *J. Chem. Ecol.* 27: 1617-1625.

**PUBLICACIONES DERIVADAS  
DE ESTA TESIS**



## 1. PUBLICACIONES

Hierro I., Valero A., Pérez P., González P., Cabo M.M., Montilla M.P. y Navarro M.C. (2004). Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. *Phytomedicine* 11: 77-82.

Hierro I., Valero A., González de Selgas J.M. y Navarro M.C. (2004). Actividad larvívica del timol frente a *Anisakis simplex* s.l.. *Revista de Fitoterapia* (en prensa).

Valero A., Hierro I., González P., Montilla P. y Navarro M.C.. Activity of various essential oils and their main components against L<sub>3</sub> larvae of *Anisakis simplex* s.l.. En: *Recent Progress in Medicinal Plants*. Govil J.N. (ed.). Studium Press LLC, Houston (en prensa).

## 2. COMUNICACIONES A CONGRESOS

Hierro I., González P., Pérez P., Montilla P., Díaz V., Navarro M.C. y Valero A.. Actividad de productos monoterpénicos de origen natural frente a las larvas de *Anisakis simplex* s.l.. I Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Granada 2001, pp. 94.

González P., Hierro I., Pérez P., Cabo M.C., Valero A. y Navarro M.C.. Actividad de aceites esenciales de los géneros *Litsea* y *Cimnopogon* frente a las larvas de *Anisakis simplex* s.l.. I Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Granada 2001, pp. 95.

Hierro I., Valero A., Navarro M.C.. Actividad larvívica del Timol frente a *Anisakis simplex* s.l.. II Congreso de Fitoterapia, Granada 2003, pp. 38.

Hierro I., Valero A., Díaz V., González J.M. y Navarro M.C.. Larvicide activity of Geraniol (monoterpenic derivate) against L<sub>3</sub> larvae of *Anisakis simplex* s.l. IX European Multicolloquium of Parasitology (EMOP IX), Valencia 2004, pp. 359.

