

**Universidad Industrial de Santander
Escuela de Biología
Programa de Maestría en Biología**

Proyecto de investigación

**ESTUDIO DEL POTENCIAL DE ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS DE
COLOMBIA COMO INGREDIENTES DE DESINFECTANTES CON EFECTO
VIRUCIDA SOBRE VIRUS CON ENVOLTURA**

Valentina Parra Acevedo

Orientadora: Prof. Dra. Raquel E. Ocazonez J.

Bucaramanga, junio de 2023

Agradecimientos

En primer lugar, quiero expresar mi profundo agradecimiento a la Profesora Raquel E. Ocazonez por su invaluable orientación y guía durante el desarrollo de esta investigación. Sus consejos expertos y enseñanzas han sido fundamentales para mi crecimiento académico.

Me gustaría hacer un agradecimiento especial a mis compañeras de laboratorio: Sindi Alejandra Velandia, Lina Marcela Silva, Elizabeth Quintero, Silvia Barrios y Elías Cuartas. Su paciencia, ayuda y sabios consejos han sido invaluable a lo largo de este proyecto.

También deseo expresar mi gratitud a mi familia por su incondicional apoyo moral y su amor inquebrantable. Gracias por siempre creer en mí y por animarme a seguir adelante. Agradezco especialmente a mi novio Jhon David y a su familia por brindarme su apoyo incondicional, acogerme en su hogar y brindarme consuelo en los momentos difíciles.

Asimismo, quiero extender mi agradecimiento a la Universidad Industrial de Santander por brindarme innumerables oportunidades de crecimiento y enriquecimiento académico. Agradezco también el apoyo económico que me ha permitido concluir mis estudios de maestría.

RESUMEN

Título: Estudio del potencial de aceites esenciales de plantas de Colombia como ingredientes de desinfectantes con efecto virucida sobre virus con envoltura*

Autor: Valentina Parra Acevedo**

Palabras claves: Aceites esenciales, Virus con envoltura, Desinfectantes, Alcohol

Descripción:

Los virus RNA con envoltura son responsable de las pandemias y epidemias más conocidas y los desinfectantes a base de alcohol son los más utilizados para controlar la transmisión. El uso prolongado de estos desinfectantes tiene efectos adversos en salud humana y el medio ambiente; por lo tanto, existe una necesidad por desarrollar desinfectantes seguros y amigables con el medio ambiente. Los aceites esenciales (AE) son reconocidos como seguros y muchos poseen actividad antiviral. El presente estudio investigó la actividad desinfectante de soluciones a base de AE combinadas o no con alcohol (OH) contra los virus dengue (DENV-2) y chikunhunya (CHIKV) como sustitutos de virus con envoltura. Se utilizaron el método de suspensión cuantitativa y análisis *in silico* de actividad antiviral de los componentes de los AEs. Una solución de 12% AE + 10% OH redujo 100% ($> 4,0 \log_{10} \text{TCID}_{50}$) la infectividad de ambos virus en un minuto de exposición. Soluciones de 12% y 3% AE sin OH redujeron 100% la infectividad de ambos virus en 10 min y 30 min de exposición, respectivamente. El análisis *in silico* sugirió que terpenos de los AE, especialmente sesquiterpenos hidrocarbonados, podrían alterar la envoltura de los virus al acomodarse (energía de -6.0 a 8.0 kcal/mol) en sitios de las proteínas E-DENV-2 (n = 29) y complejo E1-E3 – CHIKV (n=17) claves en el proceso de fusión y en consecuencia interferir con el ingreso de los virus a la célula. Los resultados demuestran el potencial de los AE como ingredientes de desinfectantes seguros y respetuosos con el medio ambiente para controlar virus pandémicos con envoltura.

*Trabajo de grado

** Facultad de ciencias. Escuela de Biología. Directora: Raquel Elvira Ocazonez, PhD.

ABSTRACT

Title: Potential of essential oils from Colombian plants as disinfectant ingredients with virucidal effects on enveloped viruses*.

Author: Valentina Parra Acevedo*

Keywords: essential oils, enveloped viruses, disinfectant, alcohol, disinfectant.

Description:

Enveloped viruses with RNA genome are responsible of pandemics and epidemics, and alcohol-based disinfectants are used to control their transmission. The large-scale use of these disinfectants has side effects on human health and the environment; and therefore, there is an urgent need to develop safe and environmentally friendly disinfectants. Essential oils (EOs) are recognized as safe and many exhibit strong antiviral activity. The present study investigated the disinfectant activity of solutions containing EO combined or not with alcohol (OH) against dengue (DENV-2) and chikungunya (CHIKV) viruses as surrogate RNA enveloped viruses. Both the quantitative suspension test and *in silico* analysis of antiviral activity of EO components were carried out. A solution of 12% EO + 10% OH reduced 100% ($> 4.0 \log_{10} \text{TCID}_{50}$) the infectivity of both viruses within 1 min of exposure. Solutions containing 12% and 3% EO without OH reduced 100% the infectivity of both viruses within 10 min and 30 min of

, respectively. *In silico* analysis suggested that EO-terpenes, especially sesquiterpenes hydrocarbons, could alter virus envelopes by binding (-6.7 to 8.0 kcal/mol energy) to E DENV-2 (n = 29) and E1-E3 CHIKV complex (n = 17) proteins into key sites for the fusion process and thereby interfere with virus entry into the cell. The results demonstrate the potential of EOs as ingredients of safe and environmentally friendly disinfectant to control enveloped pandemic viruses.

* Master thesis

** Faculty of Science. Department of Biology. Director: Raquel Elvira Ocazonez, PhD.

TABLA DE CONTENIDIO

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	6
1. OBJETIVOS	10
1.1. General:	10
1.2. Específicos:	10
2. MARCO TEORICO	11
2.1. Propiedades de los AE	11
2.2 Potencial antiviral de los Aes.....	12
2.3 Propiedades de los desinfectantes virucidas	15
AEs como ingredientes de desinfectantes:	16
Alcoholes como ingredientes de desinfectantes:.....	16
2.4 Aspectos generales de los virus con envoltura y genoma de ARN.....	17
Estructura y replicación del DENV-2:	18
3. METODOLOGÍA.....	24
3.1 Mezcla de AE.....	24
3.2 Composición química de la mezcla AE	24
3.3. Mezcla de OH	25
3.4 Preparación de las soluciones	25
3.5 Células	25
3.6 Virus.....	25
3.7 Ensayo de citotoxicidad	25
3.8 Evaluación de la actividad desinfectante	26
3.9 Análisis <i>in silico</i> (docking molecular)	27
3.10 Análisis de datos	28
4. RESULTADOS	28
4.1 Soluciones.....	28
4.2 Actividad desinfectante de las soluciones	30
4.3 Plausibles mecanismos de acción desinfectante de la mezcla de AE	32
Afinidad de enlace entre AE-compuestos y DENV-2.....	37

Afinidad de enlace entre AE-compuestos y CHIKV .	40
5. DISCUSSION.....	43
6. CONCLUSIONES.....	47
7. DIVULGACION DE LOS RESULTADOS	48
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	49
APENDICES	58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Soluciones analizadas en el estudio	29
Tabla 2. Viabilidad de las células Vero tratadas con las soluciones	30
Tabla 3. Actividad desinfectante de soluciones a base de AE en distintos tiempos de exposición	31
Tabla 4. Efecto de la adición de alcohol sobre la actividad desinfectante de soluciones a base de AE.....	32
Tabla 5. Composición química de mezcla de AE	34
Tabla 6. Compuestos AE con la menor energía de unión con la proteína E DENV-2.....	38
Tabla 7. Compuestos AE con la menor energía de unión con el complejo glicoproteico E1-E2-E3 del CHIKV.....	41
Tabla suplementaria 1.Valores de energías de unión AutoDock Vina de los compuestos identificados en la mezcla AE y las proteínas de la envoltura.	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del virión del DENV-2.....	19
Figura 2. Estructura del virión del CHIKV.	22
Figura 3. Resultados representativos del análisis de citotoxicidad de las soluciones.	29
Figura 4. Efecto de la adición de alcohol sobre la actividad desinfectante de soluciones a base de AE.	33
Figura 5. Mapa de calor de las energías libres de unión de los componentes de la mezcla de AE con las proteínas de la envoltura de los virus analizados.	36
Figura 6. Resultados representativos de la afinidad de enlace y posiciones de acoplamiento de terpenos de los AE con la proteína E del DENV-2.	38

Figura 7. Resultados representativos de la afinidad de enlace y posiciones de acoplamiento de terpenos de los AE con el complejo proteico E3-E2-E1 del CHIKV. 41

INTRODUCCIÓN

Los virus zoonóticos se han establecido con frecuencia en la población humana y son considerados una fuerte amenaza. Varios de ellos han causado pandemias con importantes pérdidas económicas y siguen causando epidemias de magnitud preocupante (Barro et al., 2020). Virus zoonóticos con genoma de RNA y rodeados por una membrana celular lipídica (envoltura) han emergido y reemergido en los últimos 100 años. El virus de la influenza (H1N1) cobró la vida de aproximadamente 50 millones de personas en 1918-1919 y continúa causando epidemias globales con millones de infecciones (Martini et al., 2019). El virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) ha dejado más de 36 millones de infectados y centenares de fatalidades desde 1981 cuando se detectó por primera vez. En 2019, el coronavirus SARS-CoV-2 fue detectado y a la fecha ha causado más de 768 millones de casos y más de 6.9 millones de muertes (Wang et al., 2021; PAHO, 2023).

La transmisión de virus pandémicos con envoltura se puede hacer por inhalación de aerosoles (gotas líquidas), inhalación de material seco (polvo o heces) y por el contacto de piel y ojos con fluidos corporales, superficies y objetos (fómites) contaminadas (Bushman et al., 2019; Leung, 2021). El contacto entre manos y superficies por sólo cinco segundos puede transferir suficiente virus que podría propagarse al tocar las membranas mucosas de la nariz y la boca (Otter et al., 2016). Lo anterior puede ocurrir si el virus ha sobrevivido en el medio ambiente hasta el momento del contacto. El uso de agentes desinfectantes para la limpieza de superficies y el cuidado personal es una de las estrategias de primera línea para limitar la

transmisión de los virus durante una epidemia (Querido et al., 2019). La Organización Mundial de la Salud recomienda el uso de desinfectantes a base de alcoholes (OH) los cuales, por lo general, contienen altas concentraciones de etanol (80% v/v) o isopropanol (70% v/v) o una combinación de ellos (Kampf, 2018; Lin et al., 2020; (Suchomel et al., 2020). Debido a su naturaleza lipofílica, los OHs dañan la envoltura de los virus por delipidación y desnaturalización de las proteínas.

Los desinfectantes a base de OH tienen limitaciones (Boyce, 2018). El OH se evapora rápidamente cuando se expone al aire limitando el tiempo de contacto con el virus lo cual reduce la eficacia. Para garantizar una mejor desinfección, los fómites se deben sumergir en el desinfectante; sin embargo, la exposición constante al alcohol con el tiempo puede deteriorar el fómite causando decoloración, agrietamientos, deformidades y pérdida por mal funcionamiento. Por lo tanto, las soluciones con altas concentraciones de OH no se recomiendan como desinfectantes de superficies de contacto frecuente como puertas, pasamanos, sillas e interruptores, y tampoco se recomienda para aplicar sobre instrumentos u objetos cuya vida útil puede verse afectada por la exposición constante al OH (Boyce, 2018). Además, el uso repetido y prolongado de alcoholes puede afectar la salud de los individuos expuestos, se ha reportado que la absorción dérmica de etanol puede conducir a niveles tóxicos si alguien se expone varias veces al día (Gormley et al., 2012; Salomone et al., 2018). Los OH también pueden afectar el medio ambiente, de acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, el mal uso y la eliminación de la sustancia a base de OH se pueden convertir en un riesgo para la vida silvestre (Amorati et al., 2013; Perricone et al., 2015).

Los aceites esenciales (AE) constituyen las fracciones líquidas volátiles responsables de los aromas característicos de las plantas (Manion & Widder, 2017). Los AE han sido

objeto de investigación durante años debido a sus diversas propiedades biológicas entre las cuales se listan actividades antibacteriana, antifúngica y antiviral, lo que las convierte en agentes prometedores para combatir microorganismos patógenos (Aziz et al., 2018; Manion & Widder, 2017; Maurya et al., 2021). Además, algunos AE presentan efectos analgésicos y antiinflamatorios, ofreciendo un alivio potencial en el manejo de enfermedades. En la actualidad, los AE y sus componentes son de gran interés en diversas industrias y se utilizan como ingredientes en una variedad de productos comerciales, tales como, saborizantes de alimentos, jabones, lociones, champús, colonias, detergentes para ropa e incluso repelentes de insectos(Asadollahi et al., 2019; Dhifi et al., 2016). Más aún, gracias a sus propiedades bactericidas y antioxidantes, los AE también se emplean como conservantes en alimentos. Existe evidencia científica suficiente sobre la actividad virucida de los aceites esenciales (AE) extraídos de plantas aromáticas contra una serie de virus RNA con envoltura. Entre estos, el virus de la influenza (H1N1), el coronavirus SARS-CoV-2, el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y Herpesvirus (Ma & Yao, 2020; Reichling, 2021; Wani et al., 2021).

El interés de la comunidad científica en los AE como desinfectantes es reciente y motivado por la pandemia Covid-19. Luego de una búsqueda exhaustiva en base de datos se encontraron cinco trabajos. El AE de *Melaleuca alternifolia* combinado con etanol fue eficaz para inactivar el coronavirus felino (FCoVII) y el coronavirus humano HCoV-OC4 en cinco minutos de exposición (Romeo et al., 2022). Una mezcla comercial de AE fue eficaz para reducir la concentración de virus Phi 6 cuando se aplicó sobre superficies de cerámica, acero inoxidable y laminados contaminados (Bailey et al., 2021) y una preparación comercial de AE-timol presentó actividad desinfectante contra SARS-CoV-2 suspendido en el aire (Çağrı

& Murat, 2023). Una preparación a base de AE de eucalipto fue eficaz para inactivar virus H1N1 en superficies contaminadas (Pyankov et al. 2012).

En Colombia, la investigación sobre los usos potenciales de los AE para la industria de productos naturales es de gran interés. El efecto antiviral de AE de distintas plantas de la flora colombiana sobre virus RNA con envoltura, específicamente virus del dengue (DENV) y virus de la fiebre amarilla, está documentado (Gómez et al., 2013; Meneses et al., 2009; Ocazonez et al., 2010; Velandia et al., 2016). No se encontraron estudios publicados sobre la actividad desinfectante de los AE de plantas colombianas. Dado que el aprovechamiento de la biodiversidad de Colombia es un tema de gran interés para el desarrollo industrial del país y existe la necesidad de desinfectantes seguros y amigables con el medio ambiente, la presente investigación evaluó el potencial de AE como desinfectantes. Se determinó la actividad desinfectante de una mezcla de siete AEs combinada o no con una mezcla de OHs. Además, se realizó un análisis *in silico* de la actividad antiviral de los componentes de los AE para proponer hipótesis del modo de acción de las soluciones evaluadas.

1. OBJETIVOS

1.1. General:

Evaluar el potencial de los AE como ingredientes de desinfectantes con efecto virucida sobre virus con envoltura.

1.2. Específicos:

- (i) Establecer diferencias de la actividad desinfectante virucida de soluciones a base de AE respecto a la concentración, tipo de virus y tiempo de exposición
- (ii) Determinar el efecto del OH sobre la actividad desinfectante virucida de soluciones a base de AE
- (iii) Proponer mecanismos de acción virucida de los AEs con base en el perfil *in silico* antiviral de sus componentes químicos.

2. MARCO TEORICO

2.1. Propiedades de los AE

Los AE se obtienen a partir de diversas partes de la planta usando diversos métodos, la destilación y la extracción con solventes son los más utilizados (Aziz et al., 2018). Con la destilación existen diferentes procedimientos, la hidrotdestilación en un equipo Clevenger es uno de los más comunes. El método tiene en cuenta las propiedades de las moléculas de agua en estado de vapor de asociarse con moléculas de aceite, el AE se extrae cuando la presión del vapor lisa las células vegetales liberándolo en el vapor que luego se condensa. Con la extracción con solventes, el método por fluidos supercríticos es el más utilizado y se utiliza como material de arrastre sustancias químicas en condiciones especiales de temperatura y presión. El dióxido de carbono es el solvente supercrítico más utilizado (Aziz et al., 2018).

Los principales componentes de los AE son los terpenoides y polipropenoides. Los terpenoides son metabolitos secundarios de las plantas cuya estructura está formada por el ensamblaje sistémico de unidades de isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno). La concatenación de estas unidades en la cadena principal da lugar a una amplia variedad de terpenoides. La diversidad estructural y química de estos componentes se debe a la repetición, ciclación y reordenamiento de las unidades de isopreno. En los AE, se encuentran principalmente monoterpenos que tienen un esqueleto de 10 átomos de carbono, sesquiterpenos con un esqueleto de 15 átomos de carbono, diterpenos con un esqueleto de 20 átomos de carbono y triterpenos con un esqueleto de 30 átomos de carbono. Cada uno de ellos, además, gracias a modificaciones bioquímicas como el reordenamiento y la oxidación pueden clasificarse en derivados oxigenados como ácidos, alcoholes, cetonas, aldehídos, ésteres y éteres (Manion & Widder, 2017; Wani et al., 2021).

2.2 Potencial antiviral de los Aes

En los últimos años numerosos estudios *in vitro* sobre el potencial antiviral de los AE y componentes de los AE han sido publicados. En las revisiones Ma & Yao (2020) y Reichling, (2021) se detalla el conocimiento actual del efecto antiviral de los AE de un número importante de especies vegetales sobre virus con envoltura. Por mencionar algunos, AEs de aneldo (*Anethum graveolens* L.), y lavanda (*Lavandula officinalis* Chaix) han mostrado actividad antiviral *in vitro* contra el virus del herpes simple tipo 1(HSV-1) (Orhan et al., 2012). Específicamente, Los AE de manuka (*Leptospermum scoparium* J.R.Forst. & G.Forst), anis estrellado (*Illicium verum* Hook.f), aceite de hisopo (*Hyssopus officinalis* L.), árbol de té australiano (*Melaleuca alternifolia* Cheel), jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) mostraron su máximo efecto anti HSV-1 a través de la inactivación directa del virión en ausencia de células (acción virucida) (Schnitzler, 2019; Schnitzler et al., 2008) Así mismo, AEs de tomillo (*Thymus vulgaris* L.), árbol de la canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume), bergamota (*Citrus bergamia* Risso & Poit.), limoncillo (*Cymbopogon flexuosus* (Nees) Will. Watson.) entre otros, mostraron inactivar en un 100% el virus de la influenza (VIF) cuando el virus fue tratado previamente en ausencia de células (Vimalanathan & Hudson, 2012). Además, mezclas de AE de diferentes ejemplares botánicos han revelado potencial virucida contra el virus de la bronquitis infecciosa aviar (Jackwood et al., 2010). Así mismo, un estudio reciente demostró que el AE de *T. vulgaris* presenta actividad virucida contra el coronavirus felino; el tratamiento con el AE durante 1 hora logró reducir significativamente el título viral (Catella et al., 2021). La actividad antiviral de AE de plantas de Colombia sobre virus con envoltura ha sido documentada (Gómez et al., 2013; Meneses et al., 2009;

Ocazonez et al., 2010; Silva-Trujillo et al., 2022). Los AE de especies de *Lippia* y de *Turnera diffusa* presentaron efecto inhibitorio del DENV el virus de la fiebre amarilla.

Los AE pueden actuar sobre el virus a nivel extracelular e intracelular (Ma & Yao, 2020a; Reichling, 2021; Wani et al., 2021). Los AE pueden afectar directamente la estructura del virus e impedir el ingreso a la célula. Los AE pueden interferir en las etapas de replicación del genoma, ensamblaje y liberación de la partícula viral ; Los estudios *in vitro* publicados hasta la fecha sugieren que el principal modo de acción de los AE sobre virus es la inactivación directa de viriones en ausencia de células. En la mayoría de los casos, el mayor efecto se observó cuando los viriones se incubaron con AE durante 1 hora o más antes de su adicción a la célula hospedera, lo que indica un efecto directo (efecto virucida). Se ha propuesto que la acción virucida de los AE se debe principalmente a la alteración de la envoltura y sus estructuras asociadas. Esto se atribuye a la naturaleza lipofílica de los AE, lo cual les permite atravesar la envoltura viral, provocando la desestabilización y permeabilización de la membrana (Romeo et al., 2022; Yap et al., 2021). Además, estudios *in silico* e *in vitro* sugieren que los AE también pueden bloquear proteínas virales necesarias para la entrada del virus a la célula. (Reichling, 2021; Wani et al., 2021; Yao, 2012).

La actividad antiviral de componentes químicos de los AE se ha investigado usando diversos modelos *in vitro*. Orhan et al. (2012) y Pajaro-Castro et al. (2015) reportaron un fuerte efecto antiviral del compuesto β -cariofileno contra HSV y DENV2, indicando que las plantas ricas en este compuesto, como la pimienta negra, el cannabis, canela, orégano y clavo, pueden servir como fuentes potenciales para la selección de antivirales. Lai et al. (2012) evaluaron el potencial virucidal de carvacrol y timol, compuestos fenólicos presentes en los AE del tomillo y el orégano. Los autores reportaron que el tratamiento durante una hora de HSV-1 con ambos compuestos fue suficiente para evidenciar, mediante microscopía de

transmisión, disrupción en la envoltura viral hasta más de 80% con respecto al control experimental. Así mismo, Mediouni et al. (2020) evaluaron los posibles mecanismos de acción de carvacrol y timol sobre el virus de la inmunodeficiencia humana. los autores sugieren que estos compuestos pueden alterar el contenido de colesterol de la envoltura viral bloqueando la entrada del virus en la célula diana. Por otro lado, Wu et al. (2012) investigaron las propiedades antivirales del pachulí, principal contituyente de *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. El postratamiento de las células infectadas con el virus de la influenza con pachulí produjo una fuerte reducción de la replicación viral

Los análisis de acoplamiento molecular (*in silico*) se han usado para formular hipótesis sobre el modo de acción antiviral de los componentes químicos de los AE (Reichling, 2021). Estos análisis predicen la afinidad de enlace entre el compuesto y una proteína viral (Chen & Kirchmair, 2020). En el estudio realizado por Trujillo et al. (2022) se analizó la actividad antiviral de AEs de plantas de Colombia sobre DENV-2. Los resultados *in silico* reportaron que sesquiterpenos y monoterpenos, tales como, cis-calameneno, δ - α - γ -cadineno, α guaieno y viridifloreno se acoplan con la proteína E DENV-2 con la menor energía de unión (energías negativas desde -7.0 kcal/mol). Recientemente se reportó que 1,8-cineol (eucalipto) de *Eucalyptus globulus* Labill, carvacrol de *Origanum vulgare* L. y *Thymus vulgaris*, terpineol, guaiol, linalool, β -selinenol, α -eudesmol y γ -eudesmol de *M. cajuputi* se acoplan fuertemente a la proteína espiga del SARS-CoV-2 (Reichling, 2021). Además, un estudio sobre el potencial antiviral del AE de *Melaleuca alternifolia* sugirió, que su principal constituyente terpinen-4-ol puede ser el responsable de la inhibición de la entrada del virus de la influenza a la célula, ya que encontró una fuerte energía de interacción entre este compuesto y receptor en la célula del virus celular (Li et al., 2016).

2.3 Propiedades de los desinfectantes virucidas

El uso de desinfectantes para el cuidado personal y la desinfección de superficies es una medida principal para limitar la propagación de enfermedades virales. Para este fin, existe un gran número de desinfectantes virucidas disponibles (Lin et al., 2020). Virucida es un término general que describe un agente químico de amplio espectro que inactiva virus con y sin envoltura (Rabenau et al., 2005). La principal forma de medir la eficacia de un desinfectante es mediante la reducción de la infectividad del virus, una reducción de al menos 4 log del título viral, la cual se correlaciona con una desinfección del 99,99% es la reducción mínima esperada. La eficacia de un agente desinfectante virucida depende de la concentración del agente, el tiempo y temperatura de exposición del virus al agente (Lin et al., 2020). El ensayo de suspensión es el método recomendado para analizar la actividad desinfectante de una preparación nueva (Rabenau et al., 2020). El ensayo consiste en suspender el virus en variadas concentraciones de la preparación y por variados tiempos; luego, la mezcla se adiciona a una célula altamente permisiva para la replicación del virus y 72 h después se determina el título viral. Reducción 4 log del título del virus tratado respecto al no-tratado indica pérdida de infectividad (Rabenau et al., 2020).

La eficacia de desinfectantes contra virus que causan pandemias y epidemias en humanos es difícil de evaluar usando los métodos de laboratorio que hoy día están avalados por las autoridades sanitarias locales y globales. Esto debido a que por el potencial virulento que caracteriza a estos virus, se requieren laboratorios con infraestructura y equipo del más alto nivel de bioseguridad lo cual es de alto costo y por tanto ausentes en la mayoría de las ciudades donde ocurren las pandemias y epidemias (Eggers et al., 2021). En consecuencia, la evaluación de la actividad desinfectante con los métodos de laboratorio se realiza sobre virus patógenos menos peligrosos y similares en estructura denominados virus sustitutos. Los

requisitos para los virus sustitutos son: alta resistencia a la desecación, propagación sencilla en cultivos de células, disponibilidad en las colecciones de virus y nivel de bioseguridad bajo (1 y 2) (Eggers et al., 2021).

AEs como ingredientes de desinfectantes:

En los últimos años, diversos estudios han explorado el potencial de AEs como agentes antimicrobianos para limpieza (Bolouri et al., 2022; Manion & Widder, 2017). Los AE y sus componentes activos se han convertido en una alternativa natural, segura con el usuario y eco-amigable para controlar la contaminación de microorganismos patógenos. Muchos estudios han explorado el uso de aceites esenciales como posibles alternativas antibacterianas y antifúngicas a los desinfectantes comerciales (Cho et al., 2020; Kowalczyk et al., 2020). Por ejemplo, Barbosa et al. (2016) evaluó la eficacia desinfectante de los AE de orégano y romero (*Salvia Rosmarinus*), solos o en combinaciones, contra varias bacterias y una investigación realizada por Mouatcho et al. (2017) evaluó el posible uso AE de timol como desinfectante, encontrando que una preparación de AE al 3% redujo significativamente la población de *Escherichia coli*. Sin embargo, la investigación del potencial de AE como desinfectante contra virus aún es insuficiente (Lin et al., 2020). Estudios recientes han demostrado que preparaciones a base de AE de árbol de té al 3% y alcohol desinfectan el virus SARS-CoV-2 (Romeo et al., 2022) y que mezclas de AEs de diferentes especies vegetales son desinfectantes eficaces contra virus sustitutos del SARS-CoV-2 (Bailey et al., 2021).

Alcoholes como ingredientes de desinfectantes:

Los desinfectantes a base de OH son los más utilizados para eliminar virus en superficies y manos (Boyce, 2018; Kampf, 2018; Martín-González et al., 2020). Existe

suficiente evidencia sobre la actividad virucida de desinfectantes a base de alcohol sobre virus con envoltura (Lin et al., 2020). Por ejemplo, una formulación a base de etanol demostró inactivar el virus Ébola y diferentes coronavirus después de un minuto de exposición (Cook et al., 2016; Hulkower et al., 2011). Una solución desinfectante constituida por 40% de etanol requirió sólo 30 segundos para inactivar el virus SARS-CoV-2 (Xiling et al., 2021) dos formulaciones a base de alcohol recomendadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) demostraron un marcado efecto virucida contra los virus Zika, Ébola, SARS-Cov y MERS-Cov (Siddharta et al., 2017).

Los mecanismos de acción virucida propuestos para los OH son la desnaturalización de proteínas y la disrupción de la envoltura viral (Boyce, 2018; Singh et al., 2020). La naturaleza anfifílica de los alcoholes les confiere afinidad tanto con moléculas polares como con regiones hidrofóbicas de la envoltura del virus. La presencia de átomos de oxígeno debilita las interacciones lipofílicas y aumenta la afinidad interna de la membrana por el agua. Por lo tanto, el contacto de virus con alcohol conduce a la alteración de la fluidez de su membrana, y en consecuencia a la desestabilización y desnaturalización de las proteínas asociadas. La actividad virucida del OH depende en gran medida de la naturaleza del mismo, concentración y estructura del virus (Boyce, 2018). El etanol ha demostrado ser eficaz contra virus envueltos y algunos virus no envueltos; mientras el isopropanol ha demostrado ser efectivo contra virus envueltos, pero inefectivo contra virus sin envoltura. El isopropanol es más lipofílico que el etanol y en consecuencia es menos activo contra virus sin envoltura (Lin et al., 2020).

2.4 Aspectos generales de los virus con envoltura y genoma de ARN

La mayoría de los patógenos virales que causan enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes son virus con envoltura y genoma de tipo ARN (Valero-Rello & Sanjuán, 2022). La envoltura que corresponde a la superficie de la partícula viral (virión), es una parte de membrana celular obtenida durante el ensamblaje del virión en el interior de la célula o en el momento de su egreso hacia el medio extracelular (Vaney et al., 2013; Zhang et al., 2013). La envoltura viral contiene glicoproteínas del virus con afinidad por proteínas expuestas en la superficie de las células que actúan como receptores y co-receptores del virus (Navaratnarajah et al., 2008). Estas proteínas median el ingreso del virus a la célula y promuevan la fusión de las membranas celular y viral para la liberación del material genético del virus en el citoplasma (Palombi et al., 2021). En consecuencia, las glicoproteínas virales han sido seleccionadas como blancos para el descubrimiento de agentes virucidas (Rey & Lok, 2018; Verma et al., 2020). Los lípidos de las envolturas virales juegan un rol importante durante la producción de viriones en la célula y en la infectividad de los mismos en células susceptibles (Aktepe et al., 2015; Hitakarun et al., 2022). Se ha demostrado que la inhibición de la síntesis de ácidos grasos en la célula infectada reduce significativamente la replicación viral y el contenido lípidos puede afectar la replicación e infectividad de virus envueltos (Hitakarun et al., 2022; Sousa et al., 2020). El virus Dengue serotipo 2 (DENV-2) y el virus Chikunguya (CHIKV) se usaron en el presente estudio para evaluar la actividad desinfectante de las preparaciones. Se describen las características de los virus que constituyen marco de referencia del presente estudio.

Estructura y replicación del DENV-2:

El DENV-2 pertenece al género Flavivirus, es pequeño (~50 nm), posee envoltura y genoma RNA monocatenario tipo mensajero (ssARN) dentro de una cápside pseudo

icosaédrica. Del marco de lectura del RNA se deriva una poliproteína que se fragmenta, por acción de una proteasa del virus y proteasas de la célula, en tres proteínas que conforman el virión denominadas cápside (C), membrana (M) y envoltura (E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5). La proteína E se encuentra en forma de homodímeros en la superficie del virus formando una cubierta y la proteína M se encuentra debajo de esta cubierta evitando cambios conformacionales de E que puedan alterar el proceso de ingreso del virión a la célula (Zonetti et al., 2018). Las proteínas NS tienen funciones claves en el ciclo replicativo del virus (Rodenhuis-Zybert et al., 2010). La Figura 1 representa los componentes estructurales del virión del DENV-2.

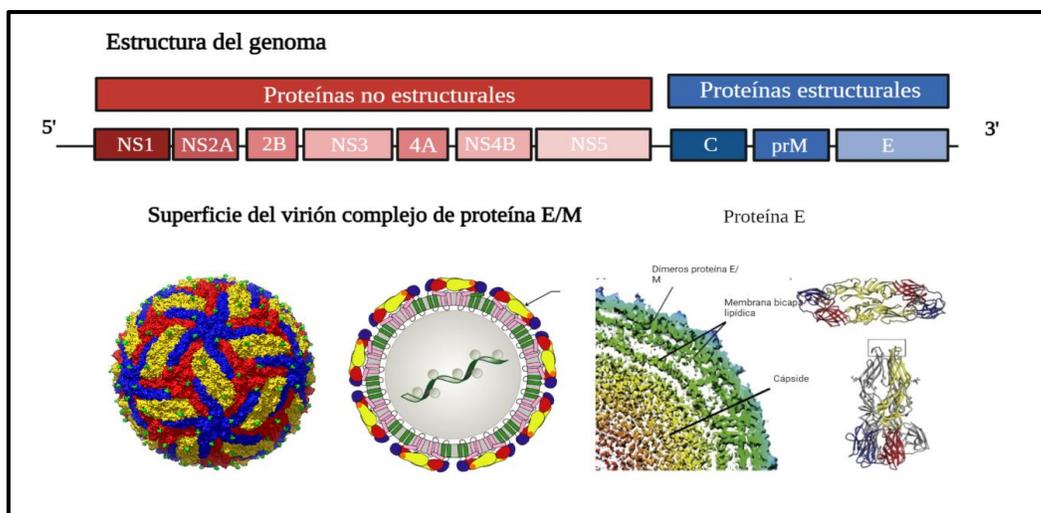


Figura 1. Estructura del virión del DENV-2. Arriba, se representan el genoma SS(+)-ARN, las proteínas individuales derivadas de la poliproteína. Abajo, la estructura del virión, la superficie del virión con proteínas (E y M) ancladas a la envoltura viral. Modificado de: Lok. 2016, Cell press, 24: 239–236; Rey et al. 2018, EMBO reports,19:206-224.

Las etapas del ciclo replicativo del DENV están bien descritas en la revisión de Rodenhuis et al (2010). Brevemente, el virión se adhiere a la superficie de la célula mediante el acoplamiento de la proteína E con diversas proteínas celulares receptoras. Entre los receptores celulares involucrados están: la lectina tipo C denominada DC-SIGN (captadora

de la molécula 3 de adhesión intercelular específica de células dendríticas, no asociada a integrina), el receptor de manosa (MR) de los macrófagos, proteína de choque térmico (HSPp70 /HSPp90) y la proteína chaperonina GRP78 de los hepatocitos (Begum et al., 2019; Cruz-Oliveira et al., 2015). Los viriones son internalizados por endocitosis mediada por clatrina, en la endosoma ocurre fusión de la envoltura viral con la membrana celular, la cápside libre se descompone y el RNA viral es liberado al citoplasma. La replicación del RNA viral ocurre en la membrana del retículo endoplasmático (RE) con la participación de proteínas NS, entre estas la proteasa NS2b-NS3 y la polimerasa NS5. El virión se ensambla en el RE y es transportado en vesículas a la superficie de la célula para ser excretado previa fragmentación de la proteína M, un proceso conocido como maduración del virión (Rodenhuis-Zybert et al., 2010).

La proteína E del DENV-2 tiene un rol importante en la infectividad del virus (Begum et al., 2019; Cruz-Oliveira et al., 2015; Nasar et al., 2019; Zonetti et al., 2018). La proteína E comprende tres dominios ricos en hojas β : DI, DII y DIII. El dominio I se sitúa estructuralmente entre dominio II, el dominio de homodimerización, y el dominio III similar a la inmunoglobulina. El dominio II contiene el bucle de fusión involucrado en la fusión de la membrana celular y viral durante la entrada del virus. El dominio III está expuesto en la superficie de DENV y contiene epítomos motivos de unión celular (Cruz-Oliveira et al., 2015). La proteína E es sintetizada y plegada junto con la proteína prM (actúa como chaperona), se une al receptor y desencadena la endocitosis mediada por clatrina. El entorno endosomal ácido conlleva al cambio conformacional que expone el bucle de fusión en un extremo del dominio II. Los dominios I y II se doblan entre sí, la proteína E se inserta como monómero en la membrana objetivo promoviendo la reorganización lateral del monómero E para formar un trímero. Consecutivamente, una región flexible localizada entre el dominio I y dominio II

rota junto con el dominio III. Este movimiento genera un plegamiento que permite la fusión entre la envoltura viral y membrana celular (Begum et al., 2019; Rodenhuis-Zybert et al., 2010; Tomlinson et al., 2012).

Estructura y replicación del CHIKV:

El CHIKV pertenece al género Alphavirus, es un virus pequeño (70 nm) de genoma ARN de sentido positivo en una cápside icosaédrica rodeada por la envoltura. La cápside de CHIKV tiene una simetría compleja compuesta por cuatro subunidades idénticas en cada una de las veinte caras triangulares icosaédricas ($T = 4$). El ARN codifica cinco proteínas estructurales denominadas cápside (C), tres glicoproteínas de envoltura (E1-E3) y un péptido de fusión. Las glicoproteínas E1 y E2 son heterodímeros expuestos en la envoltura como picos triméricos o espigas y tienen roles importantes en la adsorción e ingreso del virión al interior de la célula hospedera (Weaver & Lecuit, 2015). El RNA también codifica cuatro proteínas NS (nsP1-4), las cuales, en combinación con proteínas de la célula, forman la maquinaria de replicación con actividades enzimáticas distintas responsables de la replicación del ARN viral (Abraham et al., 2018; Ghildiyal & Gabrani, 2020). La Figura 2 representa los componentes estructurales del virión del CHIKV.

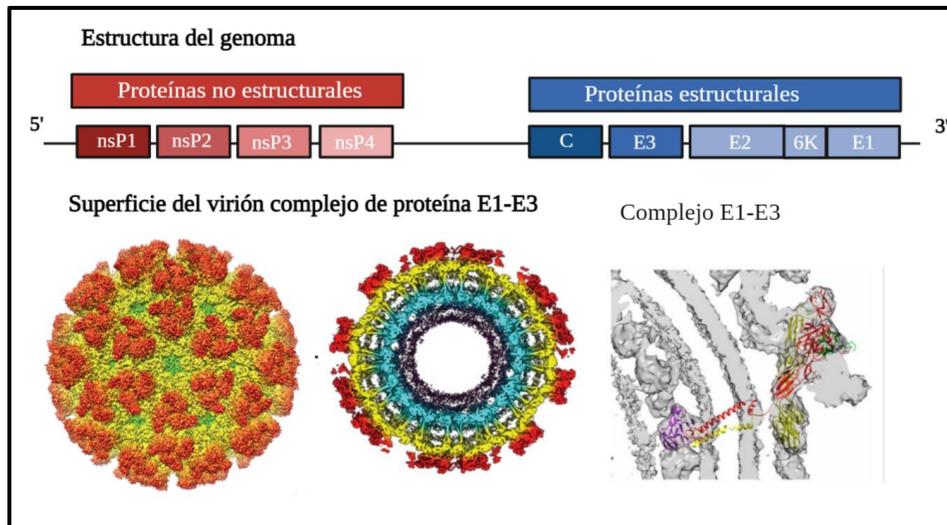


Figura 2. Estructura del virión del CHIKV. Arriba, se representan el genoma SS(+)-ARN, las proteínas individuales derivadas. Abajo, la estructura del virión, la superficie del virión con las glicoproteínas E1, E2 y E3 formando espigas (picos triméricos) en la envoltura viral. Modificado de: Yao et al. 2020, *PNAS*, 52: 13703–13707;

Las etapas del ciclo replicativo del CHIKV están bien descritas en la revisión de Wichit., et al. (2021). Brevemente, el CHIKV interactúa con diferentes receptores celulares de membrana para iniciar la internalización del virus, entre estos: glicosaminoglicanos (GAG) expresados en la mayoría de células mamíferas, la glucoproteína de superficie celular inmunoglobulina de células T y mucina 1 (TIM1 y TIM4) que se expresan en células inmunitarias, fosfatidilserina (PtdSer), la lectina calcio-dependiente de tipo C (DC-SIGN) y la molécula de adhesión llamada MXRA8 (Matriz de remodelación asociada 8) (Cunha et al., 2020; Schnierle, 2019). CHIKV ingresa a la célula mediante endocitosis en un proceso dependiente de pH por vesículas recubiertas de clatrina. El ambiente ácido de la endosoma promueve la fusión de la envoltura viral con la membrana de la vesícula permitiendo la liberación de la cápside en el citoplasma. Las proteínas NS conforman el complejo replicativo donde se sintetiza el ARN viral. El ensamblaje del genoma viral y la cápside se lleva a cabo en el citoplasma. La envoltura viral es adquirida de la membrana celular cuando la partícula

se libera de la célula por un proceso dependiente de pH y temperatura (Cunha et al., 2020; Weaver & Lecuit, 2015).

La espiga del CHIKV es un complejo de tres glucoproteínas (E1-E3) insertadas en la envoltura, la cual tiene un rol importante en la infección del virus (Battini et al., 2021; Malet et al., 2009; Schnierle, 2019; Verma et al., 2020). La proteína E1 consta de tres dominios ricos en hojas β (DI, DII Y DIII). En el DII se encuentra el péptido de fusión ubicado en el extremo distal, el cuál es necesario para la fusión membrana celular y viral. La proteína E2 madura contiene tres dominios: el dominio N-terminal A, ubicado en el centro; dominio B en la punta lateral; y el dominio C-terminal C, ubicado cerca de E1 y la membrana viral. Se ha reportado que proteína E2 es la responsable de la unión con el receptor celular y es el objetivo principal de los anticuerpos neutralizantes (Schnierle, 2019). La proteína E1, se produce y se pliega de manera co-traducciona con la proteína chaperona p62. La chaperona se une al receptor, promoviendo la internalización del virus al endosoma. El entorno ácido del endosoma produce la disociación de la proteína E2 dejando expuesto el bucle de fusión. Posteriormente, se genera un movimiento de bisagra del dominio II en relación con el dominio I y provoca una trimerización con la proteína E1 adyacente. La proteína E1 se inserta como trímero en la membrana diana, y sufre un reordenamiento conformacional que promueve la unión de las membranas viral y endosomal (Fields & Kielian, 2013; Li et al., 2016; Wichit et al., 2021).

3. METODOLOGÍA

3.1 Mezcla de AE

Se utilizó una mezcla de AEs puros de siete plantas aromáticas y medicinales cultivadas en Colombia. Los AEs se obtuvieron por hidrodestilación, como está reportado (Silva-Trujillo et al., 2022), de las plantas *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Will Watson (familia Poaceae), *Cymbopogon winterianus* (Java citronella) Jowitt ex Bor (familia Poaceae), *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth, *Lippia origanoides* Kunth (familia Verbenaceae), *Elettaria cardamomum* (L.) Maton (familia de las Zingiberaceae), *Swinglea glutinosa* (Blanco) Merr (familia de las Rutaceae) y *Citrus × aurantium* L (familia de las Rutaceae). Las plantas fueron colectadas del Jardín Botánico del Centro Nacional de Agroindustrialización de Especies Vegetales Tropicales Aromáticas y Medicinales (CENIVAM) de la Universidad Industrial de Santander (UIS), Bucaramanga, Colombia. La mezcla de AE fue suministrada por la Prof. Dra. Elena Stashenko, Directora del CENIVAM.

3.2 Composición química de la mezcla AE

La composición química fue analizada en el Laboratorio del Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas (CROM-MASS) de la UIS, para lo cual se utilizaron los métodos de cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC/MS) y detección por ionización en llama (GC/FID). Los procedimientos técnicos están publicados (Silva-Trujillo et al. 2022). Los datos de composición química fueron suministrados por la Prof. Dra. Elena Stashenko (CENIVAM, UIS).

3.3. Mezcla de OH

Se utilizó una mezcla preparada en el CROM-MASS que contenía 75% etanol y 25% isopropanol + glicerol. La mezcla fue suministrada por la Prof. Dra. Elena Stashenko (CENIVAM, UIS)

3.4 Preparación de las soluciones

La mezcla de AEs (6×10^6 $\mu\text{g/mL}$) disuelta en dimetil sulfoxido (DMSO: 40%) se usó para preparar siete soluciones de variada concentración de AE (12%, 6% y 3%) combinadas o no con OH en variada proporción (1%, 5% y 10%). Las soluciones se mezclaron con ayuda de un vortex hasta disolución completa.

3.5 Células

Las células Vero (células de riñón de mono verde africano; CCL-81™. ATCC) se cultivaron en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS) y un 1% de antibiótico a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂.

3.6 Virus

DENV-2 NGC (C.D.C, Puerto Rico) se propagó en células C6/36 de *Aedes albopictus* (Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, La Habana, Cuba). CHIKV, una cepa local aislada de un paciente en nuestro laboratorio (Carreño et al., 2019), se propagó en células Vero. Ambos virus fueron titulados utilizando un protocolo de la dosis infecciosa mediana de cultivo tisular (TCID₅₀) - ensayo de Spearman Karber (Ramakrishnan, 2016).

3.7 Ensayo de citotoxicidad

El ensayo se usó para determinar la dilución mínima de cada solución inocua para la célula (Vero) del ensayo de actividad desinfectante. Esto para asegurar las condiciones de mayor viabilidad celular indispensable para el título viral del control experimental. Se usó el protocolo del laboratorio como está publicado (Silva-Trujillo et al., 2022). Brevemente, las

células se cultivaron en placas de 96 pozos por 24 h a 37°C; 5% CO₂ hasta observar monocapa celular confluyente. Las células fueron tratadas con diluciones base 10 (n = 3) de la solución durante 1 h. Células no tratadas y células tratadas con dimetil sulfoxido (10%) se analizaron en paralelo como control negativo y control positivo de citotoxicidad. La solución se retiró, las células se lavaron y luego se adicionó medio de cultivo de mantenimiento y las placas se incubaron 72 h a 37°C; CO₂ 5%. Luego, las células se tiñeron con cristal violeta (0.5%) como sigue: a cada pozo se adicionó 50 µL del colorante por 20 min a temperatura ambiente, el exceso de colorante se retiró lavando con agua tres veces, luego la placa se dejó secar por 2 h a temperatura ambiente. El colorante retenido por la célula se liberó adicionando a cada pozo 200 µL de metanol (100%) y se midió en un espectrofotómetro de placa (Multiskan Go Thermo Fisher Scientific, USA) a longitud de onda de 570 nm. Cada muestra se analizó por triplicado en tres ensayos independiente. El porcentaje de viabilidad de células tratadas respecto al de células no-tratadas se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = [(D.O. \text{ en células tratadas}) / (D.O. \text{ en células no-tratadas}) \times 100].$$

3.8 Evaluación de la actividad desinfectante

Se utilizó la prueba de suspensión cuantitativa de acuerdo con la Guía para evaluar desinfectantes químicos con respecto a su actividad virucida en el ámbito de la medicina humana. Preparado por la Asociación Alemana para el Control de Enfermedades Víricas (DVV) y el Instituto Robert Koch (RKI) (Rabenau et al., 2020). La prueba se realizó en cinco intervalos (1, 5, 10, 20 y 30 min) de exposición del virus DENV-2 (8,4 log₁₀ TCID₅₀/mL) y CHIKV (7,8 log₁₀ TCID₅₀/mL) con cada solución. Brevemente, se mezclaron 10 µL de la preparación de virus con 80 µL de la solución y 10 µL de agua. El control experimental consistió en la misma preparación de virus mezclada con 90 µL de agua. Al final de la exposición, se adicionó 900 µl de medio de cultivo helado a cada mezcla y luego se terminó

el título de partículas virales infecciosas utilizando el protocolo de (TCID₅₀) antes mencionada. Diluciones seriadas (10⁻¹ hasta 10⁻⁷) de la mezcla con virus-tratado y la mezcla control se adicionaron a monocapas de células Vero en placas de 96 pocillos y luego se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante cinco días para replicación del virus. Al término, las células se lavaron, se tiñeron con cristal violeta y el colorante liberado se cuantificó por espectrofotometría como se mencionó antes. Los valores de densidad óptica se usaron para estimar los valores de TCID₅₀ (log10) / mL mediante el método de Spearman Karber (Ramakrishnan, 2016). La actividad desinfectante se expresó con el factor de reducción (FR) que correspondió a la diferencia entre Log10 TCID₅₀ mL del control (virus no-tratado) y Log10 TCID₅₀/mL del experimental (virus tratado). Valores FR ≥ 3.5 indicaron eficacia desinfectante de 99.9% (Rabenau et al., 2020).

3.9 Análisis *in silico* (docking molecular)

Las proteínas de la envoltura de cada virus y los componentes químicos identificados en la mezcla de AEs se seleccionaron para el análisis. Estructuras 3D de la proteína E de DENV-2 (PDB ID: 10AN) y del complejo E1-E2-E3 de CHIKV (PDB ID: 3N42) fueron descargados de Protein Data Bank. Las estructuras químicas de los constituyentes de la mezcla de AE fueron recuperadas de la base de datos PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). La preparación de las proteínas, los compuestos y el análisis de docking se hizo con el software AutoDock Vina (Version 1.5.6, La Jolla, CA, U.S.A) con el procedimiento del laboratorio como está publicado (Trujillo-Correa et al., 2019). Las estructuras de las proteínas se optimizaron removiendo moléculas de agua, solventes y ligandos cristalizados a través del programa PyMOL 2.3.9, seguido de una minimización de la energía (1000 kJ/mol). A cada proteína se adicionaron cargas de Kollman en cada átomo y los átomos de hidrógenos no polares se fusionaron con la estructura proteica

usando Autodock Tools (Morris et al., 2009). Se incluyó además como fitoquímico de referencia a epigallocatequina galato (EGCG), el cual ha reportado afinidad con proteínas de la envoltura viral (Saifulazmi et al., 2022; Sharma et al., 2017). Los compuestos se prepararon asignándoles hidrógenos polares y cargas de Gasteiger a cada átomo. Las estructuras de proteínas y compuestos se guardaron en formato PDBQT. Se usaron parámetros por defecto y la exhaustividad de la búsqueda se fijó a 100. Se realizaron diez corridas por ligando y se calculó la energía promedio de interacción (Kcal/mol) para los mejores acoplamientos. La visualización de las estructuras se realizó con el programa PyMOL 1.7.0. Las interacciones moleculares en 3D y 2D se realizaron con el programa BIOVIA Discovery Studio v. 21.1.0. Valor de energía -6.0 kcal/mol fue el umbral de afinidad de enlace entre proteína y AE-compuesto.

3.10 Análisis de datos

Los análisis se realizaron usando el software GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com). Los datos de densidad óptica (D.O.) se normalizaron restando los valores de pozos sin células a pozos con células tratadas con la muestra y células no-tratadas y se presentan como promedios con el error estándar. Los títulos virales en cultivos infectados con virus tratado y no-tratado se compararon con la prueba de ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Tukey-Kramer, adoptando un nivel de significación de 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 Soluciones

La Tabla 1 muestra las soluciones evaluadas para actividad desinfectante. El ensayo de citotoxicidad reveló que ninguna de las soluciones fue citotóxica para la célula del ensayo desinfectante (Figura 3, Tabla 2). La viabilidad celular después de incubar las células con la

menor dilución (1:10) de cada solución osciló entre 80% y 100%, respecto a las células no tratadas.

Tabla 1. Soluciones analizadas en el estudio

Nº	Contenido	DMSO, %	Identificador
1	12% AE + 1% OH	7,9	12AE+1OH
2	12% AE + 5% OH	7,6	12AE+5OH
3	12% AE + 10% OH	7,2	12AE+10OH
4	6% AE+ 10% OH	7,2	6AE+10OH
5	3% AE + 10% OH	1,8	3AE+10OH
6	12% AE	8,0	12AE
7	3% AE	2,0	3AE
8	10% OH	-	10OH

AE, es una mezcla de AE de siete plantas aromáticas. OH es una mezcla de etanol (ca. 70%) and otros OHs (ca. 2.5%: isopropanol, and glycerol). Dimetil sulfoxido (DMSO) fue usado como un solvent de AE, la concentración final en la solución es presentada.

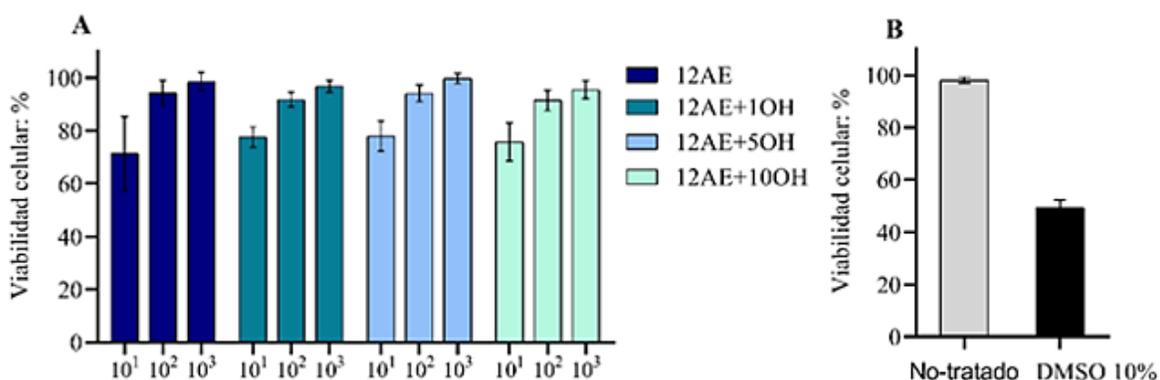


Figura 3. Resultados representativos del análisis de citotoxicidad de las soluciones. Células Vero se trataron con la solución y la viabilidad 72 h después se determinó mediante el ensayo de cristal violeta. **A.** Viabilidad con las diluciones mayores de soluciones que contenían AE combinado o no con OH (Tabla 1). **B.** Viabilidad con los controles, negativo (no-tratado) y diluyente de los AE (DMSO 10%). Los datos son promedios + DS tres experimentos por triplicado.

Tabla 2. Viabilidad de las células Vero tratadas con las soluciones

Solución	Dilución / Porcentaje de viabilidad		
	1:10	1: 100	1: 1000
12AE	80 ± 26	90 ± 13	100 ± 10
12AE+1OH	80 ± 11	92 ± 8,4	96 ± 6,0
12AE+5OH	80 ± 16	93 ± 7,3	97 ± 2,7
12AE+10OH	80 ± 25	90 ± 10	100 ± 10
6AE+10OH	92 ± 9,2	96 ± 7,1	98 ± 3,3
3AE+10OH	92 ± 8,9	95 ± 9,1	95 ± 7,3
3AE	100 ± 0,0	94 ± 8,9	90 ± 33
10OH	94 ± 5,4	90 ± 8,8	90 ± 10
Ácido acético	0.0 ± 3,2	80 ± 32	93 ± 4,9

Ácido acético (5%) fue usado como agente virucida. Los datos son promedios ± DS de tres ensayos independientes en triplicado.

4.2 Actividad desinfectante de las soluciones

Los títulos virales en los controles experimentales (no-tratados) fueron $3,8 - 5 \pm 1,2$ y $5,3 \pm 0,55$ TCID₅₀ (log10) por mL de DENV-2 y CHIKV, respectivamente. Un factor de reducción de 4-log10 fue el valor de corte para actividad desinfectante (Rabenau et al., 2020). La Tabla 3 presenta la actividad desinfectante de las soluciones a base AE sin OH en los tiempos de exposición. Solución 12% AE, mostró actividad desinfectante desde 1 min hasta 30 min de exposición con DENV-2 (FR desde 3.9 hasta 5.4; reducción del título desde 81.6% hasta 100%); mientras que con CHIKV, la actividad se observó a partir de 10 min de exposición. Solución 3% AE, mostró actividad desinfectante desde 30 min para ambos virus DENV-2 (FR: 3,7; reducción del título 100%) y CHIKV (FR: 5,0; reducción del título 100%).

Tabla 3. Actividad desinfectante de soluciones a base de AE en distintos tiempos de exposición

Solución	DENV-2: TCID ₅₀ / mL				CHIKV: TCID ₅₀ / mL			
	Control	Tratado	FR	% RF	Control	Tratado	FR	% RF
12% AE								
1 min	5,0 ± 1,2	1 ± 1,6	3,9 ± 0,4	81,6	5,3 ± 0,5	5,3 ± 0,5	0,0	0,0
5 min	5,4 ± 0,2	0,0	5,4 ± 0,2	100	5,7 ± 0,7	3,0 ± 0,7	2,7 ± 0,1	47,3
10 min	5,0 ± 1,0	0,0	5,0 ± 1,5	100	4,8 ± 0,4	0,0	4,8 ± 0,3	100
20 min	5,4 ± 0,5	0,0	5,4 ± 0,5	100	4,9 ± 0,1	0,0	4,0 ± 0,1	100
30 min	4,5 ± 0,9	0,0	4,5 ± 0,9	100	4,6 ± 0,5	0,0	4,6 ± 0,5	100
3% AE								
1 min	3,8 ± 0,4	3,1 ± 0,3	0,7 ± 0,3	18,4	ND	ND	ND	-
5 min	4,0 ± 0,1	3,0 ± 0,6	0,9 ± 0,5	25	6,1 ± 0,6	5,4 ± 0,5	0,6 ± 0,6	11,4
10 min	5,0 ± 1,5	3,3 ± 0,6	1,0 ± 0,7	26,6	5,1 ± 0,2	5,1 ± 0,4	0,0	0,0
20 min	3,7 ± 0,4	2,1 ± 0,8	0,4 ± 1,0	43,2	6,1 ± 0,3	3,3 ± 0,7	2,8 ± 0,8	45,9
30 min	3,7 ± 0,4	0,0 ± 1,4	3,7 ± 0,1	100	5,0 ± 1,5	0,0	5,0 ± 1,5	100

RF: factor de reducción; R, %: porcentaje de reducción del título del virus; 0,0, no se detectó el virus. ND: no determinado. Los datos son medias ± DS de tres ensayos independientes por triplicado. * ANOVA unidireccional: DENV-2: $F_{7,16} = 20,27$; y CHIKV: $F_{7,14} = 46$, $p < 0,001$; prueba post hoc de Tukey, $p < 0,001$.

Para evaluar el efecto de la adición de OH sobre la actividad desinfectante de la mezcla de AEs, se analizaron soluciones de 12%, 6% y 3% AE combinadas con OH (desde 1%, 5% y 10%) a tiempo de exposición de 1 min. Con ambos virus la adición de OH incrementó la actividad desinfectante de los AE aunque el CHIKV mostró menor susceptibilidad (Tabla 4, Figuras 4). La solución 12% AE + 10% OH mostró actividad desinfectante con ambos virus (FR: 4,9 y 5,9) y al reducir el OH a 1% y 5% se mantuvo la acción desinfectante sobre DENV-2 pero se perdió sobre CHIKV. De otro lado, la reducción de AE a 6% mantuvo la actividad desinfectante sobre DENV (FR = 4,9) pero se perdió sobre CHIKV (FR = 0,0). La adición de 10% OH a la solución 3% AE no incrementó la actividad, estos resultados fueron similares para la solución 1 sin AE y 10% OH.

Tabla 4. Efecto de la adición de alcohol sobre la actividad desinfectante de soluciones a base de AE

Soluciones	DENV-2: TCID ₅₀ / mL			CHIKV: TCID ₅₀ / mL		
	Log ₁₀	FR	% R	Log ₁₀	FR	% R
Agua	3,8 ± 0,4 y 5 ± 1,2			5,3 ± 0,5	-	-
Ácido acético	0,0	4,9 ± 0,0	100	0,0	5,3 ± 0,5	100
12AE	1 ± 1,6	3,9 ± 0,4	81,6	5,3 ± 0,5	0,0	0,0
12AE+1OH	0,0	4,9 ± 0,0	100	4,3 ± 0,7	0,9 ± 0,7	18,8
12AE+5OH	0,0	4,9 ± 0,0	100	3,1 ± 0,2*	2,2 ± 0,2	41,5
12AE+10OH	0,0	4,9 ± 0,0	100	0,0	5,3 ± 0,0	100
6AE+10OH	0,0	4,9 ± 0,0	100	5,7 ± 0,2	0,0	0,0
3AE+10OH	3,5 ± 0,7	0,5 ± 0,7	28,5	4,8 ± 1,0	0,4 ± 1,0	9,5
3AE	3,1 ± 0,3	0,7 ± 0,6	19,8	ND	ND	
10OH	4,2 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,0	5,3 ± 0,5	0,0	0,0

Las pruebas se realizaron mediante un ensayo cuantitativo en suspensión. FR: factor de reducción, Log 10 TCID₅₀ virus control - Log 10 TCID₅₀ virus tratado; % R, porcentaje de reducción del título del virus en relación con el virus control; 0,0, no se detectó el virus. * ANOVA unidireccional: DENV F_{9,17} = 21,64; CHIKV F_{7,31} = 14,57, $p < 0,001$; prueba post hoc de Tukey, $p < 0,001$).

4.3 Plausibles mecanismos de acción desinfectante de la mezcla de AE

La Tabla 5 se presenta los datos de composición química de la mezcla de los AE suministrados por la Prof. Dra. Elena Stashenko. Se identificaron un total de 42 compuestos. Los monoterpenos oxigenados fueron los más abundantes, geraniol (35,4%), citronelal (22,6%) y citronelol (14,1%), seguido de los acetatos (7,2%); mientras que los monoterpenos hidrocarbonados constituyeron un 4,2%. Los sesquiterpenos, se encontraron en menor concentración (8,4%), entre ellos los sesquiterpenos hidrocarbonados representaron un 5,7%, destacando germacreno D y δ -cadineno, y los sesquiterpenos oxigenados un 2,7%.

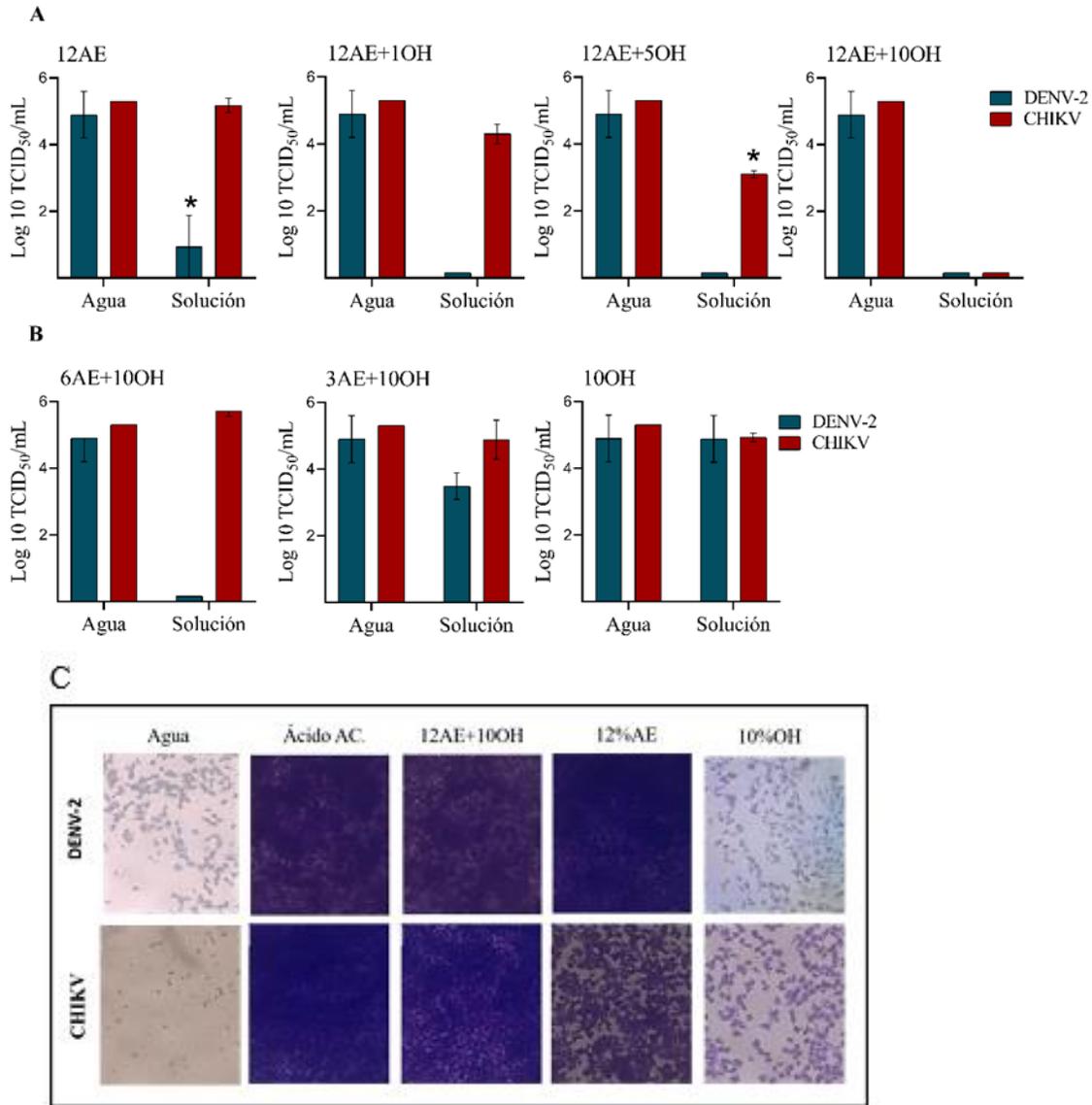


Figura 4. Efecto de la adición de alcohol sobre la actividad desinfectante de soluciones a base de AE. A Soluciones 12% AE combinadas con 1%, 5% y 10% alcohol (OH) B. Soluciones 6% y 3% AE combinadas con 10% OH, solución sin AE y con OH (10OH) como control. ANOVA unidireccional: DENV-2, $F_{9,17} = 21,64$; CHIKV, $F_{7,31} = 14,57$, $p < 0,001$; prueba post hoc de Tukey, $p < 0,001$. C: Fotografías de células Vero infectadas con virus no-tratados (Agua) y tratado con las soluciones 12% AE sin y con 10% OH por 1 min. Ácido acético y OH al 10% fueron usados como controles. El color morado es indicativo de reducción de la replicación similar al control (células no infectadas).

Tabla 5. Composición química de mezcla de AE según análisis GC/FID

Nº	Compuesto	Clase	Índice de retención lineal		Área: %.
			Exp.	Lit.	
1	α -Pinenol*	MH	934	932 ^a	0.1
2	6-Methyl-hept-5-en-2-ona	CO	984	985 ^a	0.1
3	β -Mirceno*	MH	989	990 ^a	0.2
4	<i>p</i> -Cimeno*	MH	1026	1027 ^a	0.8
5	Limoneno*	MH	1031	1029 ^a	2.0
6	1,8-Cineole*	MO	1036	1034 ^a	0.3
7	<i>trans</i> - β -Ocimeno	MH	1047	1050 ^a	0.9
8	γ -Terpineno*	MH	1060	1059 ^a	0.2
9	Linalool*	MO	1100	1096 ^a	2.2
10	Citronelal*	MO	1157	1153 ^a	22.6
11	Isopulegol	MO	1165	1155 ^a	0.3
12	<i>n</i> -Decanal	MO	1207	1201 ^a	0.1
13	Citronelol	MO	1220	1233 ^a	14.1
14	Neral	MO	1241	1242 ^b	0.4
15	Geraniol*	MO	1258	1255 ^b	35.4
16	Geranial*	MO	1271	1270 ^b	0.8
17	Timol*	CF	1292	1290 ^a	1.1
18	Carvacrol*	CF	1301	1298 ^a	2.1
19	Acetato de citronelilo	MO	1346	1350 ^a	2.5
20	Eugenol	CF	1354	1356 ^a	0.4
21	Acetato de geranilo	MO	1377	1379 ^a	4.7
22	β -Elemeno	SH	1396	1389 ^a	1.0
23	<i>trans</i> - β -Cariofileno*	SH	1432	1428 ^d	0.9
24	α -Guaieno	SH	1444	1440 ^b	0.1
25	α -Humuleno*	SH	1468	1465 ^d	0.2
26	γ -Muroleno	SH	1484	1478 ^a	0.1
27	Germacreno D*	SH	1492	1481 ^a	1.5
28	α -Muroleno	SH	1506	1500 ^a	0.4
29	α -Bulneseno	SH	1511	1509 ^a	0.1
30	γ -Cadineno	SH	1523	1513 ^a	0.3
31	δ -Cadineno	SH	1526	1522 ^a	1.1
32	Elemol	SO	1557	1548 ^a	0.9
33	<i>trans</i> -Nerolidol*	SO	1565	1561 ^a	0.2
34	Germacreno D-4-ol	SO	1578	1574 ^a	0.7
35	Óxido de cariofileno*	SO	1586	1582 ^a	0.1
36	<i>epi</i> - α -Cadinol	SO	1653	1650 ^c	0.1
37	<i>epi</i> - α -Murolol	SO	1655	1642 ^c	0.2

Tabla 5. continuación

38	α -Cadinol	SO	1667	1653 ^c	0.2
39	α -Eudesmol	SO	1669	1659 ^c	0.1
40	Patchoulol	SO	1691	1660 ^b	0.1
41	Farnesol	SO	1719	1723 ^b	0.1
42	Hexanoato de nerilo	MO	1750	1732 ^c	0.2
1.	Monoterpenos				87.7
1.1	Monoterpenos hidrocarbonados (MH)				4.2
1.2	Monoterpenos oxigenados (MO)				83.5
	Alcoholes				52
	Acetatos				7.2
	Aldehídos				23.8
	Otros (éteres, ésteres, epóxidos)				0.5
2.	Sesquiterpenoides				8.4
2.1	Sesquiterpenos hidrocarbonados (SH)				5.7
2.2	Sesquiterpenos oxigenados (SO)				2.7
	Alcoholes				2.6
	Otros (Óxidos)				0.1
3.	Compuestos fenólicos(CF) (Timol, carvacrol, eugenol)				3.6
4.	Otros compuestos oxigenados (CO) (<i>n</i> -Decanal, 6-methyl-5-hepten-2-ona)				0.2

LRI, Índices de retención lineal calculados utilizando la mezcla de *n*-alcanos C8-C25 en la columna DB-5MS (no polar). Exp. Experimental. Lit. Literatura. ^aAdams, 2007; ^bBabushok et al., 2011; ^cNIST 2017; ^dDavies, 1990). *Uso de compuestos estándar. Datos suministrados por la Prof. Dra. Elena Stashenko

Los 42 compuestos identificados en los AE se incluyeron en el análisis de docking usando como blancos las proteínas de la envoltura de los dos virus. La Figura 5 presenta el perfil de afinidad de enlace entre proteínas virales y terpenos basado en los valores de energías negativas en kcal/mol. Estos valores de energía se listan en la Tabla suplementaria 1 al final del presente documento.

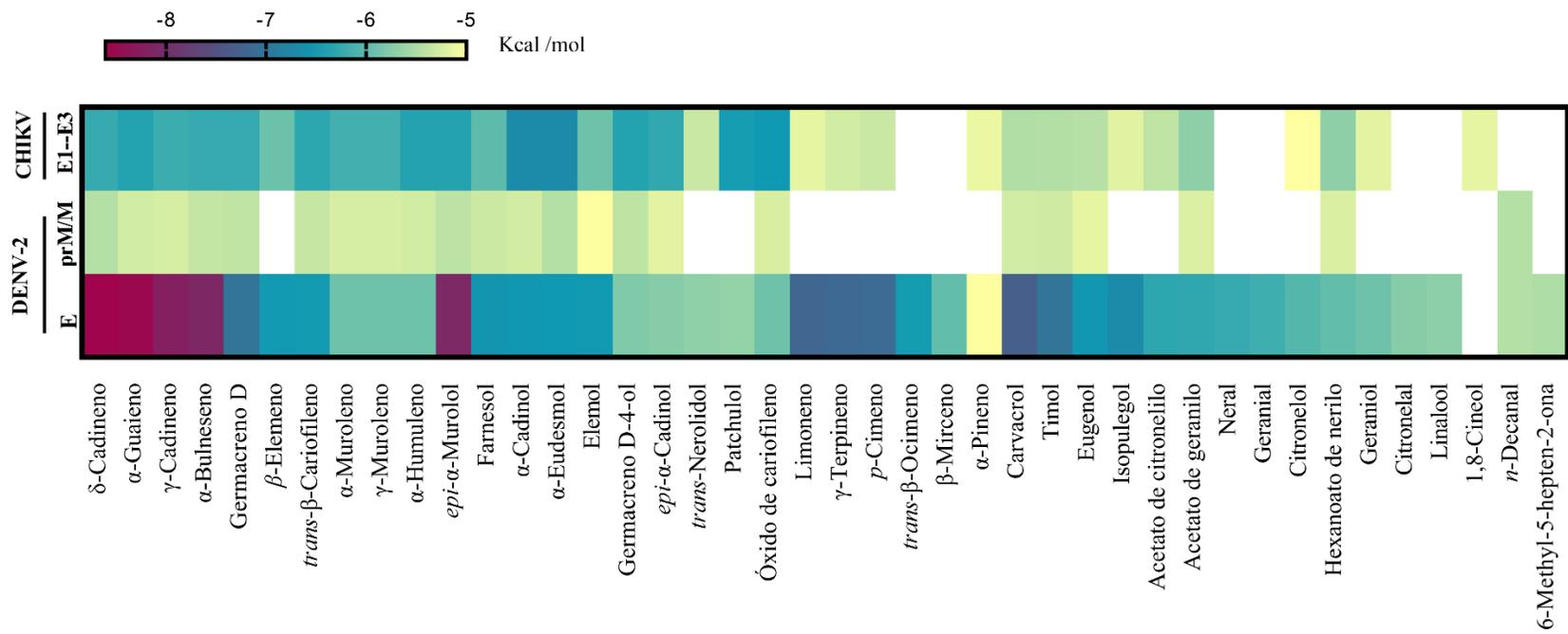


Figura 5. Mapa de calor de las energías libres de unión de los componentes de la mezcla de AE con las proteínas de la envoltura de los virus analizados. Proteína E y prM/M del DENV-2) y la espiga E1-E2-E3 del CHIKV.

Afinidad de enlace entre AE-compuestos y DENV-2.

La partícula del DENV tiene una cápside rodeada por una envoltura lipídica que contiene las proteínas de la envoltura (E) y de membrana (prM/M) (Zhang et al., 2013). Con base en los valores de energía, el análisis predijo afinidad de enlace de 25 (60%) terpenos con la proteína E, de los cuales doce presentaron las mejores energías (-7,03 a -8,61 kcal/mol) y trece energías débiles (-6,0 a -6,7 kcal/mol). Los compuestos se acomodaron en un sitio consenso correspondiente al bolsillo del detergente β -octilglucósido (β OG) en la región bisagra de la proteína E, formando enlaces hidrofóbicos con residuos de aminoácidos (Figura 6). Los sesquiterpenos hidrocarbonados como cadineno (δ y γ), α -guaeno y α -bulneseno y el sesquiterpeno oxigenado *epi*- α -muurolol mostraron las afinidades de unión más fuertes (-8,10 a -8,61 kcal/mol) seguidos por monoterpenos hidrocarbonados (limoneno, *p*-cimeno y γ -terpineno: -7,16 a -7,22 kcal/mol) y fenólicos (carvacrol y timol: -7,03 a -7,32 kcal/mol). Otros sesquiterpenos oxigenados (farnesol, α -cadinol y α -eudesmol) y monoterpenos oxigenados (isopulegol, acetato de citronelilo, neral, geranial y citronelol) mostraron afinidades de unión débiles (-6,50 a -6,70 kcal/mol) con la proteína E. Farnesol y α -cadinol formaron enlaces de hidrógeno, el primero con Gyl190, Leu191 e His282, y el segundo con Thr48 y Tyr137. La Tabla 6 presenta compuestos con las menores energías de enlace con la proteína E del DENV-2. Los análisis sugieren que los terpenos no presentan afinidad de enlace con la proteína prM (energías negativas desde -4,08 hasta -5,47 kcal/mol).

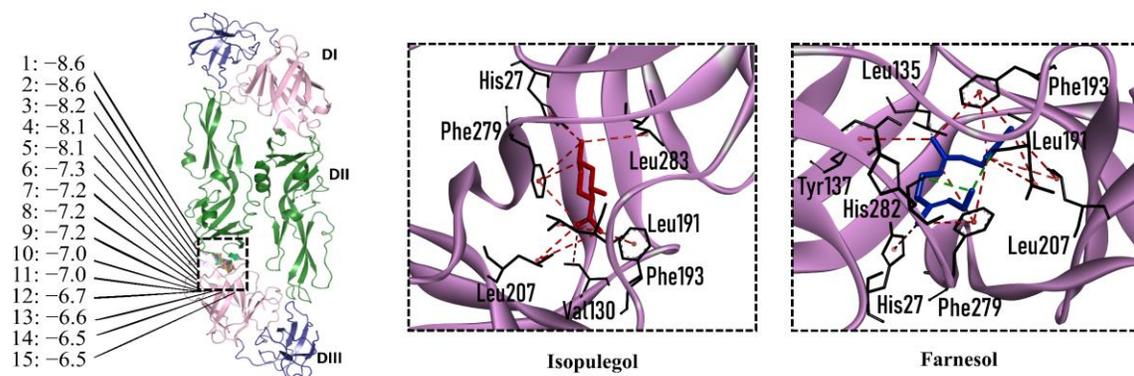


Figura 6. Resultados representativos de la afinidad de enlace y posiciones de acoplamiento de terpenos de los AE con la proteína E del DENV-2. Los terpenos se acomodaron en el bolsillo β OG. Los aminoácidos que interactúan se muestran como líneas negras; las interacciones de enlace de hidrógeno se representan como líneas punteadas verdes y las interacciones hidrofóbicas se representan como líneas punteadas rojas. Terpenos: 1, δ -cadineno; 2, α -guaieno; 3, γ -cadineno; 4, α -bulneseno; 5, carvacrol; 6, *epi*- α -muurolol; 7, γ -terpineno; 8, limoneno; 9, *p*-cimeno; 10, germacreno D; 11, timol; 12, farnesol; 13, isopulegol; 14, α -cadinol; 15, α -eudesmol.

Tabla 6. Compuestos AE con la menor energía de unión con la proteína E DENV-2

Compuesto	Estructura	Residuos de aminoácidos. Puentes H en negrita	Kcal/mol
δ -Cadineno		Leu45, Thr48, Leu135, Tyr137, Thr189, Leu191, Phe193, Phe279, Leu283	$-8,61 \pm 0,8$
α -Guaieno		Glu26, Leu45, Thr48, Tyr137, Leu191, Phe193, Phe279, Leu283	$-8,55 \pm 1,0$
γ -Cadineno		Leu45, Thr48, Leu135, Tyr137, Thr189, Leu191, Phe193, Phe279, Leu283	$-8,22 \pm 1,0$

Tabla 6. continuación

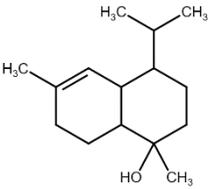
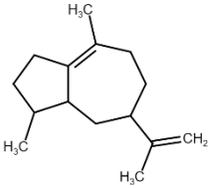
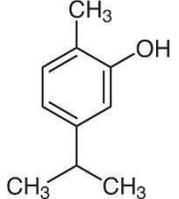
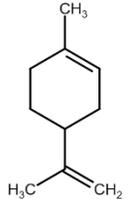
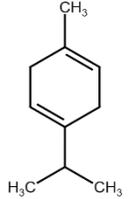
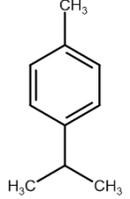
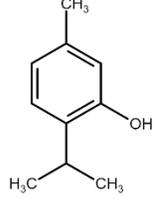
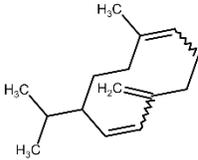
<i>epi</i> - α -Murolool		Thr48, Tyr137, Thr189, Leu191, Leu287, Phe279, Leu283	$-8,10 \pm 1,0$
α -Bulneseno		Thr48, Thr189, Phe193, Leu287, Phe279, Leu283	$-8,12 \pm 0,9$
Carvacrol		Thr189, Leu191, Leu287, Phe279, Leu283	$-7,32 \pm 0,3$
Limoneno		Thr48, Leu135, Phe193, Phe279, Leu283	$-7,22 \pm 0,2$
γ -Terpineno		Thr48, Val130, Leu191, Leu287, Phe279, Leu283	$-7,18 \pm 0,4$
<i>p</i> -Cimeno		Thr48, Val130, Leu191, Leu287, Phe279, Leu283	$-7,16 \pm 0,5$
Timol		Thr48, Leu135, Tyr137, Thr189, Phe193, Phe279	$-7,03 \pm 0,4$

Tabla 6. continuación

Germacreno D		Thr48, Leu135, Tyr137, Thr189, Leu191, Phe193, Leu287, Phe279	$-7,03 \pm 1,1$
--------------	---	--	-----------------

Afinidad de enlace entre AE-compuestos y CHIKV.

La partícula del CHIKV tiene una cápside rodeada por una envoltura lipídica que contiene el complejo glicoproteico E1-E2-E3 o espiga (Malet et al., 2009). Con base en los valores de energía (Figura 6), el análisis de docking predijo acoplamiento de 16 compuestos con el complejo E1-E2-E3 (energías menores a $-6,0$ kcal/mol). Los sesquiterpenos oxigenados α -cadinol, α -eudesmol y óxido de cariofileno mostraron las mejores energías de unión ($-6,50$ a $-6,70$ kcal/mol) seguidos de patchoulol, germacreno D-4-ol y *epi*- α -muurolol ($-6,37$ a $-6,45$ kcal/mol). Los sesquiterpenos hidrocarbonados como α -guaieno, α -humuleno y trans- β -cariofileno ($-6,32$ a $-6,38$ kcal/mol) seguidos de α -bulneseno, germacreno D y δ -cadineno ($-6,25$ a $-6,26$ kcal/mol) mostraron afinidades de unión más débiles. Los sesquiterpenos se acomodaron en dos sitios consenso correspondientes a un bolsillo en el dominio II de la proteína E1 (seis sesquiterpenos) y un bolsillo en el conector β -ribbon de la proteína E2 (once sesquiterpenos) (Figura 7). Todos los compuestos AE formaron enlaces hidrofóbicos con residuos de aminoácidos y cinco de los compuestos principales formaron enlaces de hidrógeno con aminoácidos que recubrían el bolsillo. La Tabla 7 presenta los compuestos de AE con la menor energía de enlace con el complejo CHIKV E1-E2-E3.

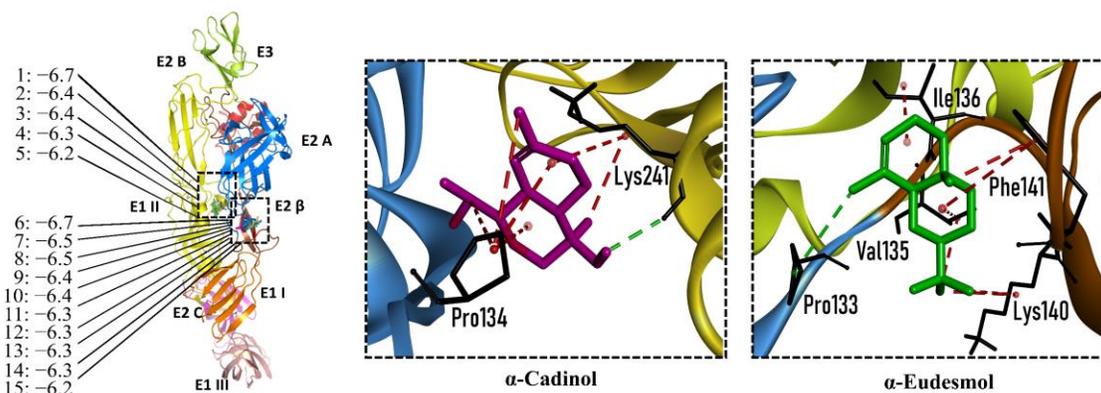


Figura 7. Resultados representativos de la afinidad de enlace y posiciones de acoplamiento de terpenos de los AE con el complejo proteico E3-E2-E1 del CHIKV. Los aminoácidos que interactúan se muestran como palos negros; las interacciones de enlace de hidrógeno se representan como líneas punteadas verdes y las interacciones hidrofóbicas se representan como líneas punteadas rojas. Compuestos en un bolsillo del dominio II de E1: 1, α -cadinol; 2, α -guaiano; 3: epi- α -murolol; 4: epi- α -cadinol; 5, γ -cadineno. Compuestos en un bolsillo del conector β -ribbon de E2: 6, α -eudesmol; 7, óxido de cariofileno; 8, patchoulol; 9, germacreno D-4-ol; 10, α -humuleno; 11, *trans*- β -cariofileno; 12, α -bulneseno; 13, germacreno D; 14, δ -cadineno; 15, α -muroleno.

Tabla 7. Compuestos AE con la menor energía de unión con el complejo glicoproteico E1-E2-E3 del CHIKV.

Compuesto	Estructura	Proteína	Residuos de aminoácidos. Puentes H en negrita	Kcal/mol
α -Cadinol		E1, dominio II	Asn39, Thr42, Pro133, Pro134, Lys241 , Leu244	-6.70 ± 0.2
α -Eudesmol		E2, conector de cinta β	Pro133 , Val135, Ile136, Lys140, Phe141	-6.70 ± 0.3

Tabla 7. continuación

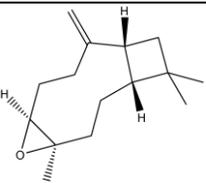
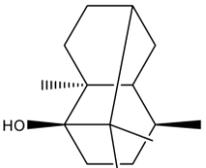
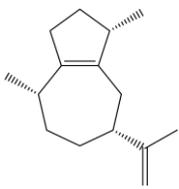
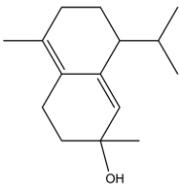
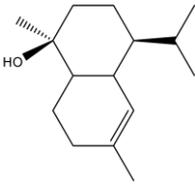
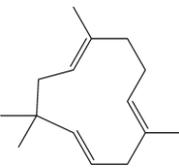
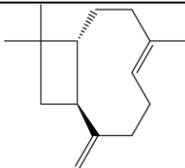
Cariofileno óxido		E2, conector de cinta β	Arg104 , Pro133, Val135, Ile136, Lys40, Phe141	-6.50 ± 0.31
Patchoulol		E2, conector de cinta β	Pro133, Ile136, Lys140, Phe141, Asp43	-6.45 ± 0.2
α -Guaieno		E1, dominio II	Pro134, Lys241, Tyr242, Lys245	-6.38 ± 0.2
Germacreno D-4-ol		E2, conector de cinta β	Thr42, Pro134, Lys241, Leu244, Lys245, Asn39	-6.38 ± 0.2
<i>epi</i> - α -Murolol		E1, dominio II	Pro134, Lys241, Leu244, Lys245	-6.37 ± 0.2
α -Humuleno		E2, conector de cinta β	Ile136, Phe141	-6.37 ± 0.3

Tabla 7. continuación

<i>trans</i> - β - Cariofileno		E2, conector de cinta β	Ile136, Phe141, Arg144	-6.32 \pm 0.1
---	---	----------------------------------	---------------------------	-----------------

5. DISCUSSION

Existe suficiente evidencia científica demostrando los efectos adversos para la salud humana y el medio ambiente del uso de desinfectantes virucidas que contienen 70% o más de OH (Dhama et al., 2021; Jing et al., 2020; Mahmood et al., 2020). Por lo tanto, la investigación de la actividad desinfectante de productos naturales que reemplacen el OH se está convirtiendo en una necesidad. En el presente estudio se evaluó la actividad desinfectante virucida de soluciones que contenían una mezcla de siete AE combinada o no con una mezcla de tres OH contra los virus DENV-2 y CHIKV representantes de virus con envoltura patógenos para humanos.

Los resultados presentados demuestran la actividad desinfectante virucida de soluciones de AE con reducida cantidad de OH y soluciones sin OH. La solución con 12% AE combinada con 10% OH redujo 100% ($> 4,0 \log_{10} \text{TCID}_{50}$) la infectividad de ambos virus después de 1 min de exposición. Además, soluciones que contenían AE sin OH también mostraron acción desinfectante. Soluciones que contenían 12% y 3% de AE redujeron 100% la infectividad de ambos virus después de 10 min y 30 min de exposición, respectivamente. Estos hallazgos van en línea con hallazgos de otros estudios. Se ha reportado que soluciones de OH combinadas con otros ingredientes poseen actividad desinfectante (Boyce, 2018). Por ejemplo, Bailey et al. (2021) encontraron que una solución AE-5% disuelta en etanol 95% resultó más efectiva que la solución sin AE para desinfectar superficies contaminadas con

bacteriófago Phi 6. Romeo et al. (2022) reportaron que una solución de AE-3% combinada con OH presentó actividad desinfectante contra coronavirus sustitutos del SARS-CoV-2 (FCoVII y HCoV-OC43) después de 5 minutos de exposición.

La actividad desinfectante de las soluciones incluidas en el estudio se evaluó sobre los virus DENV-2 y CHIKV, los cuales difieren en el contenido de proteína viral y lípidos celulares de la envoltura (Hitakarun et al., 2022; Sousa et al., 2021). Los resultados indicaron que el DENV-2 resultó más sensible a la acción de las soluciones que el CHIKV. Diferencias en la estructura de la envoltura podrían explicar en parte la variación en la sensibilidad de los virus a las soluciones. El DENV-2 se ensambla y adquiere la envoltura de la membrana del retículo endoplasmático, la envoltura contiene 90 dímeros de la proteína E acoplados con la proteína M en la interfaz del dímero (Zhang et al., 2013). Mientras que, el CHIKV se ensambla y adquiere la envoltura de la membrana citoplasmática con un contenido distinto de lípidos y además la envoltura posee un complejo de glicoproteínas (E1-E3) organizados en trímeros para formar 80 picos denominados espigas (Vaney et al., 2013). La eficacia del desinfectante dependiendo de la especie del virus con envoltura ha sido demostrada en otros estudios. El CHIKV mostró mayor resistencia al tratamiento por 30 segundos con desinfectante a base de OH comparado con los virus del Ébola, Zika y el coronavirus MERS (Franz et al., 2018). Virus del Ébola y virus de la hepatitis C (HCV) mostraron mayor resistencia que coronavirus (BCoV, SARS-CoV, MERS-CoV) y virus del Zika al tratamiento por 30 segundos con desinfectante a base de OH (Siddharta et al., 2017).

Como se mencionó en el marco teórico, los virus con envoltura penetran la célula hospedera en una vesícula endocítica seguido de fusión de la envoltura con la membrana endosomal. La fusión conduce a la liberación del ARN viral en el citoplasma e inició de la síntesis de partículas virales. Por lo tanto, alteraciones de la envoltura inducidas por un agente

virucida alteran la infectividad del virus al bloquear su ingreso a la célula (Mercer et al., 2020; Palombi et al., 2021; Pattnaik & Chakraborty, 2020). La actividad desinfectante observada con las soluciones que contenían únicamente AE (12% y 3%) fue esperada. Esto dado que existe evidencia científica suficiente demostrando que los AE por su naturaleza lipofílica pueden penetrar en la envoltura vírica y provocar su desintegración. Además, los AE pueden alterar la morfología de la partícula viral mediante interacciones entre sus constituyentes químicos y las proteínas de la envoltura y la capsida (Ma & Yao, 2020a; Wani et al., 2021). Las soluciones de AE mencionadas fueron efectivas en 10 y 30 min de exposición. No se realizaron experimentos con soluciones con mayor concentración de AE las cuales podrían tener actividad en tiempo de exposición menor que 10 min. Esto debido a que concentraciones mayores de AE resultan tóxicas para la célula Vero, lo cual afectaba la confiabilidad de los resultados del ensayo de actividad desinfectante. Además, se ha reportado que soluciones con alto contenido de AE pueden llegar a ser tóxicas para el ser humano y causar irritación en piel (Singh et al., 2020).

La acción virucida de los AE ha sido atribuida a sus componentes químicos (Ma & Yao, 2020b; Reichling, 2021; Wani et al., 2021). Un estudio reciente realizado por investigadores del grupo CROM-MASS (UIS), demostró que una combinación de ciertos monoterpenos oxigenados con ciertos sesquiterpenos hidrocarbonados se asoció a una fuerte actividad virucida de AE contra DENV-2. Esta actividad correspondió con afinidad de enlace entre los terpenos y la proteína E del virus (Silva-Trujillo et al. 2022). En el presente estudio se realizó un análisis *in silico* para predecir las interacciones entre los 42 compuestos de la mezcla de AE y la proteína de la envoltura de DENV-2 (E). Se encontró que 29 terpenos, especialmente sesquiterpenos hidrocarbonados y monoterpenos hidrocarbonados, poseen afinidad de enlace con la proteína E y se acomodaron en el bolsillo del β OG. Moléculas que

se acomodan en β OG bloquean el cambio conformacional de la proteína que es indispensable para la fusión envoltura / membrana endosomal y la subsiguiente liberación del ARN que inicia la síntesis viral (Naresh et al., 2022). El análisis *in silico* también predijo afinidad de enlace entre 17 terpenos y la espiga E1-E3 del CHIKV, especialmente sesquiterpenos hidrocarbonados. Algunos terpenos se acomodaron en el bucle hidrofóbico de la proteína E1 responsable de la fusión envoltura / membrana endosomal (Mangala Prasad et al., 2022). Otros terpenos se unieron a un bolsillo en el conector β -ribbon de la proteína E2, el cual tiene un rol crucial durante el ingreso del virus al interior de la célula al contribuir al cambio conformacional en la proteína E1 (Mangala Prasad et al., 2022). Según los valores de energías de enlace, los compuestos del AE mostraron mejores afinidades con DENV-2 en comparación con CHIKV lo que podría explicar en parte las diferencias de sensibilidad a las soluciones incluidas en los ensayos de desinfección virucida.

La actividad antiviral *in silico* de componentes de AE contra DENV-2 ha sido recientemente reportada por investigadores del CROM-MASS (Silva-Trujillo et. al. 2022) y los resultados de este estudio van en línea. Varios estudios demuestran actividad *in silico* de una variedad de terpenos contra virus con envoltura (Ma & Yao, 2020b; Wani et al., 2021), aunque estudios con CHIKV no se encontraron en las bases consultadas. Por ejemplo, carvacol y timol mostraron afinidad de enlace con la proteína de la espícula de SARS-CoV-2, interactuando específicamente con aminoácidos el dominio S1 RBD (Kulkarni et al., 2020). γ -Terpineno y terpinen-4-ol presentaron alta afinidad de enlace con la proteína de la espícula (S) del SARS-CoV2 (Romeo et al., 2022); pachuli mostró fuerte interacción en el sitio activo de la neuraminidasa de la envoltura del virus de la influenza (Wu et al., 2012).

Los resultados demuestran que la solución de AE-12% presentó actividad desinfectante contra los dos virus en 10 min de exposición. Cuando esta solución se combinó

con 10%-OH la actividad se evidenció al minuto de exposición, sugiriendo una actividad sinérgica entre el AE y OH. El resultado fue esperado. Se ha reportado que los alcoholes pueden modificar las propiedades de la envoltura viral ocasionando desintegración de la bicapa lipídica y dislocación de la proteína asociada(Das et al., 2021). Además, el etanol ocasiona permeación de la membrana lo cual es ampliamente usado en la administración de fármacos, antisépticos y desinfectante (Prausnitz & Langer, 2008). Por lo tanto, esta propiedad de los OH de facilitar la penetración de moléculas por membranas biológicas puede favorecer la interacción de componentes de los AE con la envoltura viral y así potenciar su actividad virucida.

6. CONCLUSIONES

Los AE poseen actividad antiviral demostrada en distintos modelos experimentales y por lo mismo podrían servir como ingredientes de desinfectantes virucidas. En este estudio se presenta evidencia científica del potencial uso de los AE como desinfectantes. Una solución que contiene 12% de una mezcla de siete AE y 10% de una mezcla de OH (etanol, isopropanol y glicerol) es altamente eficaz para inactivar virus con envoltura como DENV-2 y CHIKV en solo un minuto de exposición. Por lo tanto, podría usarse en entornos donde se requiere una desinfección rápida y podría ser eficaz contra otros virus con envoltura de estructura similar al DENV y CHIKV. Soluciones a base de AE al 12% sin OH también pudieron inactivar virus aunque en un tiempo de exposición mayor que cinco minutos. Estos hallazgos destacan la importancia de la presencia de alcoholes en la solución desinfectante para lograr una desinfección eficaz en un tiempo más corto.

Los sesquiterpenos hidrocarbonados presentes en la mezcla de AE mostraron afinidades de unión con las proteínas de la envoltura del DENV-2 y el CHIKV. Estos resultados sugieren que estos tipos de terpenos podrían actuar como inhibidores de la adsorción del virus y de su entrada en la célula huésped. Este estudio proporciona evidencia de que los AE, especialmente cuando se combinan con alcoholes, tienen un potencial significativo como desinfectantes para controlar la transmisión de virus envueltos. Se requieren más investigaciones para comprender completamente los mecanismos de acción de los AE y para evaluar su eficacia en otros virus con envoltura. Este estudio destaca la necesidad de desarrollar desinfectantes seguros y respetuosos con el medio ambiente para minimizar los efectos adversos asociados al uso inapropiado de desinfectantes de base de OH. Los resultados obtenidos proporcionan un primer paso en la definición de la utilidad potencial de los AE como desinfectantes para controlar la transmisión de virus con envoltura patógenos para humanos.

7. DIVULGACION DE LOS RESULTADOS

Publicación en revista homologada A1:

Parra-Acevedo, V., Ocazonez, R. E., Stashenko, E. E., Silva-Trujillo, L., & Rondón-Villarreal, P. (2023). Comparative virucidal activities of essential oils and alcohol-based solutions against enveloped virus surrogates: in vitro and in silico analyses. *Molecules*, 28(10), 1-14.

Trabajo en congreso internacional:

X Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales organizado por el Centro de Investigaciones Tropicales (CITRO) de la Universidad Veracruzana en cooperación con la Sociedad Latinoamericana de Plantas Medicinales. Realizado en Xalapa, Veracruz, México.

Reconocimiento a mejor póster con el trabajo titulado: Estudio del potencial de aceites esenciales como ingredientes desinfectantes contra virus envueltos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abraham, R., Hauer, D., McPherson, R. L., Utt, A., Kirby, I. T., Cohen, M. S., Merits, A., Leung, A. K. L., & Griffin, D. E. (2018). ADP-ribosyl-binding and hydrolase activities of the alphavirus nsP3 macrodomain are critical for initiation of virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(44), 10457–10466.
- Aktepe, T. E., Pham, H., & Mackenzie, J. M. (2015). Differential utilization of ceramide during replication of the flaviviruses West Nile and dengue virus. *Virology*, 484, 241-250.
- Amorati, R., Foti, M. C., & Valgimigli, L. (2013). Antioxidant Activity of Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(46), 10835–10847.
- Asadollahi, A., Khoobdel, M., Zahraei-Ramazani, A., Azarmi, S., & Mosawi, S. H. (2019). Effectiveness of plant-based repellents against different Anopheles species: a systematic review. *Malaria Journal*, 18(1), 1–20.
- Aziz, Z. A. A., Ahmad, A., Setapar, S. H. M., Karakucuk, A., Azim, M. M., Lokhat, D., Rafatullah, Mohd., Ganash, M., Kamal, M. A., & Ashraf, G. M. (2018). Essential oils: extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential - A Review. *Current Drug Metabolism*, 19(13), 1100–1110.
- Bailey ES, Curcic M, Biros J, Erdogmuş H, Bac N, & Sacco A. (2021). Essential oil disinfectant efficacy against SARS-CoV-2 microbial surrogates. *Frontiers in Public Health*, 9, 1–6.
- Barro, R. J., Ursúa, J. F., & Weng, J. (2020). The Coronavirus and the great influenza pandemic: lessons from the “spanish flu” for the coronavirus’s potential effects on mortality and economic activity. *NBER Working Paper*, 1–25.
- Battini, L., Fidalgo, D. M., Álvarez, D. E., & Bollini, M. (2021). Discovery of a potent and selective chikungunya virus envelope protein inhibitor through computer-aided drug design. *ACS Infectious Diseases*, 7(6), 1503–1518.
- Begum, F., Das, S., Mukherjee, D., & Ray, U. (2019). Hijacking the host immune cells by dengue virus: molecular interplay of receptors and dengue virus envelope. *Microorganisms*, 7(9), 1–16.
- Bolouri, P., Salami, R., Kouhi, S., Kordi, M., Asgari Lajayer, B., Hadian, J., & Astatkie, T. (2022). Applications of essential oils and plant extracts in different industries. *In Molecules* 27(24),1-17.
- Boyce, J. M. (2018). Alcohols as surface disinfectants in healthcare settings. *In Infection Control and Hospital Epidemiology*, 39(3), 323–328.

- Bushman, F. D., McCormick, K., & Sherrill-Mix, S. (2019). Virus structures constrain transmission modes. *Nature Microbiology*, 4(11), 1778–1780.
- Carreño, M. F., Jiménez-Silva, C. L., Rey-Caro, L. A., Conde-Ocazonez, S. A., Flechas-Alarcón, M. C., Velandia, S. A., & Ocazonez, R. E. (2019). Dengue in Santander State, Colombia: fluctuations in the prevalence of virus serotypes are linked to dengue incidence and genetic diversity of the circulating viruses. *Tropical Medicine and International Health*, 24(12), 1400–1410.
- Catella, C., Camero, M., Lucente, M. S., Fracchiolla, G., Sblano, S., Tempesta, M., Martella, V., Buonavoglia, C., & Lanave, G. (2021). Virucidal and antiviral effects of *Thymus vulgaris* essential oil on feline coronavirus. *Research in Veterinary Science*, 137, 44–47.
- Chen, Y., & Kirchmair, J. (2020). Cheminformatics in natural product-based drug discovery. *In Molecular Informatics*, 39, 1-17.
- Cho, T. J., Park, S. M., Yu, H., Seo, G. H., Kim, H. W., Kim, S. A., & Rhee, M. S. (2020). Recent advances in the application of antibacterial complexes using essential oils. *In Molecules*, 25(7), 1-22.
- Cook, B. W. M., Cutts, T. A., Nikiforuk, A. M., Leung, A., Kobasa, D., & Theriault, S. S. (2016). The disinfección characteristics of Ébola virus outbreak variants. *Scientific Reports*, 6, 1–9.
- Çağrı Şakalar, & Murat Ertürk. (2023). Inactivation of airborne SARS-CoV-2 by thyme volatile oil vapor phase. *Journal of Virological Methods*, 1–5.
- Cruz-Oliveira, C., Freire, J. M., Conceição, T. M., Higa, L. M., Castanho, M. A. R. B., & Da Poian, A. T. (2015). Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *In FEMS Microbiology Reviews*, 39, 155–170.
- Cunha, M. S., Costa, P. A. G., Correa, I. A., de Souza, M. R. M., Calil, P. T., da Silva, G. P. D., Costa, S. M., Fonseca, V. W. P., & da Costa, L. J. (2020). Chikungunya virus: an emergent arbovirus to the south American continent and a continuous threat to the world. *In Frontiers in Microbiology*, 11, 1–20.
- Das, S., Meinel, M. K., Wu, Z., & Müller-Plathe, F. (2021). The role of the envelope protein in the stability of a Coronavirus model membrane against an ethanolic disinfectant. *Journal of Chemical Physics*, 154(24), 1-20.
- de Medeiros Barbosa, I., da Costa Medeiros, J. A., de Oliveira, K. Á. R., Gomes-Neto, N. J., Tavares, J. F., Magnani, M., & de Souza, E. L. (2016). Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* in leafy vegetables. *Food Control*, 59, 468–477.

- Dhama, K., Patel, S. K., Kumar, R., Masand, R., Rana, J., Yatoo, M. I., Tiwari, R., Sharun, K., Mohapatra, R. K., Natesan, S., Dhawan, M., Ahmad, T., Emran, T. Bin, Malik, Y. S., & Harapan, H. (2021). The role of disinfectants and sanitizers during COVID-19 pandemic: advantages and deleterious effects on humans and the environment. *Environmental Science and Pollution Research International*, 28(26), 34211–34228.
- Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. *Medicines*, 3(4), 1-16.
- Eggers, M., Schwebke, I., Suchomel, M., Fotheringham, V., Gebel, J., Meyer, B., Morace, G., Roedger, H. J., Roques, C., Visa, P., & Steinhauer, K. (2021). The European tiered approach for virucidal efficacy testing – Rationale for rapidly selecting disinfectants against emerging and re-emerging viral diseases. *In Eurosurveillance*, 26. 1–7.
- Erdoğan Orhan, I., Özçelik, B., Kartal, M., & Kan, Y. (2012). Antimicrobial and antiviral effects of essential oils from selected Umbelliferae and Labiatae plants and individual essential oil components. *Turkish Journal of Biology*, 36(3), 239–246.
- Fields, W., & Kielian, M. (2013). A Key Interaction between the Alphavirus envelope proteins responsible for initial dimer dissociation during fusion. *Journal of Virology*, 87(7), 3774–3781.
- Franz, S., Friesland, M., Passos, V., Todt, D., Simmons, G., Goffinet, C., & Steinmann, E. (2018). Susceptibility of Chikungunya virus to inactivation by heat and commercially and world Health organization-recommended biocides. *Journal of Infectious Diseases*, 218(9), 1507–1510.
- Fadilah, N. Q., Jittmittraphap, A., Leungwutiwong, P., Pripdeevech, P., Dhanushka, D., Mahidol, C., Ruchirawat, S., & Kittakoop, P. (2022). Virucidal activity of essential oils from *Citrus x aurantium* l. against influenza a virus H1N1: limonene as a potential household disinfectant against virus. *Natural Product Communications*, 17, 1–7.
- Ghildiyal, R., & Gabrani, R. (2020). Antiviral therapeutics for chikungunya virus. *In expert opinion on therapeutic patents*, 30, 467–480.
- Gómez, L. A., Stashenko, E., & Ocazonez, R. E. (2013). Comparative study on in vitro activities of citral, limonene and essential oils from *Lippia citriodora* and *L. alba* on yellow fever Virus. *Natural Product Communications.*, 8(2), 249–252.
- Gormley, N. J., Bronstein, A. C., Rasimas, J. J., Pao, M., Wratney, A. T., Sun, J., Austin, H. A., & Suffredini, A. F. (2012). The rising incidence of intentional ingestion of ethanol-containing hand sanitizers. *Critical care medicine*, 40(1), 290–294.

- Hitakarun, A., Williamson, M. K., Yimpring, N., Sornjai, W., Wikan, N., Arthur, C. J., Pompon, J., Davidson, A. D., & Smith, D. R. (2022). Cell type variability in the incorporation of lipids in the dengue virus virion. *Viruses*, 14(11), 1-17.
- Hulkower, R. L., Casanova, L. M., Rutala, W. A., Weber, D. J., & Sobsey, M. D. (2011). Inactivation of surrogate coronaviruses on hard surfaces by health care germicides. *American journal of infection control*, 39(5), 401–407.
- Jing, J. L. J., Yi, T. P., Bose, R. J. C., McCarthy, J. R., Tharmalingam, N., & Madheswaran, T. (2020). Hand sanitizers: A review on formulation aspects, adverse effects, and regulations. *In international journal of environmental research and public health* 17(9), 1-17
- Kampf, G. (2018). Efficacy of ethanol against viruses in hand disinfection. In *Journal of Hospital Infection* 98(4), 331-338.
- Kowalczyk, A., Przychodna, M., Sopata, S., Bodalska, A., & Fecka, I. (2020). Thymol and thyme essential oil—new insights into selected therapeutic applications. In *Molecules*, 25(18), 1-17.
- Kulkarni, S. A., Nagarajan, S. K., Ramesh, V., Palaniyandi, V., Selvam, S. P., & Madhavan, T. (2020). Computational evaluation of major components from plant essential oils as potent inhibitors of SARS-CoV-2 spike protein. *Journal of Molecular Structure*, 1221, 1–11.
- Lai, W. L., Chuang, H. S., Lee, M. H., Wei, C. L., Lin, C. F., & Tsai, Y. C. (2012). Inhibition of herpes simplex virus type 1 by thymol-related monoterpenoids. *Planta Medica*, 78(15), 1636–1638.
- Leung, N. H. L. (2021). Transmissibility and transmission of respiratory viruses. *Nature Reviews. Microbiology*, 19(8), 528-545.
- Li, Y., Lai, Y., Wang, Y., Liu, N., Zhang, F., & Xu, P. (2016). 1, 8-cineol protect against influenza-virus-induced pneumonia in mice. *Inflammation*, 39(4), 1582–1592.
- Lin, Q., Lim, J. Y. C., Xue, K., Yew, P. Y. M., Owh, C., Chee, P. L., & Loh, X. J. (2020). Sanitizing agents for virus inactivation and disinfection. *View*, 1(2), 1–26.
- Ma, L., & Yao, L. (2020). Antiviral effects of plant-derived essential oils and their components: an updated review. *Molecules*, 25(11), 1-13.
- Mahmood, A., Eqan, M., Pervez, S., Alghamdi, H. A., Tabinda, A. B., Yasar, A., Brindhadevi, K., & Pugazhendhi, A. (2020). COVID-19 and frequent use of hand sanitizers; human health and environmental hazards by exposure pathways. *The Science of the Total Environment*, 742, 1-7
- Malet, H., Coutard, B., Jamal, S., Dutartre, H., Papageorgiou, N., Neuvonen, M., Ahola, T., Forrester, N., Gould, E. A., Lafitte, D., Ferron, F., Lescar, J., Gorbalenya, A.

- E., de Lamballerie, X., & Canard, B. (2009). The crystal structures of Chikungunya and Venezuelan equine encephalitis virus nsP3 macro domains define a conserved adenosine binding pocket. *Journal of Virology*, 83(13), 6534–6545.
- Mangala Prasad, V., Blijleven, J. S., Smit, J. M., & Lee, K. K. (2022). Visualization of conformational changes and membrane remodeling leading to genome delivery by viral class-II fusion machinery. *Nature Communications*, 13(1), 1-14.
- Manion, C. R., & Widder, R. M. (2017). Essentials of essential oils. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 74(9), 153–162.
- Martín-González, N., Vieira Gonçalves, L., Condezo, G. N., San Martín, C., Rubiano, M., Fallis, I., Rubino, J. R., Ijaz, M. K., Maillard, J. Y., & De Pablo, P. J. (2020). Virucidal action mechanism of alcohol and divalent cations against human adenovirus. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 1–9.
- Martini, M., Gazzaniga, V., Bragazzi, N. L., & Barberis, I. (2019). The Spanish Influenza Pandemic: A lesson from history 100 years after 1918. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 60(1), 64-67.
- Maurya, A., Prasad, J., Das, S., & Dwivedy, A. K. (2021). Essential oils and their application in food safety. *In Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 1-5.
- Mediouni, S., Jablonski, J. A., Tsuda, S., Barsamian, A., Kessing, C., Richard, A., Biswas, A., Toledo, F., Andrade, V. M., Even, Y., Stevenson, M., Tellinghuisen, T., Choe, H., Cameron, M., Bannister, T. D., & Valente, S. T. (2020). Oregano oil and its principal component, carvacrol, inhibit HIV-1 fusion into target cells. *Journal of Virology*, 94(15), 1-21.
- Meneses, R., Ocazonez, R. E., Martínez, J. R., & Stashenko, E. E. (2009). Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication *in vitro*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8, 1–6.
- Mercer, J., Lee, J. E., Saphire, E. O., & Freeman, S. A. (2020). SnapShot: enveloped virus entry. *Cell*, 182(3), 186-186.
- Morris, G. M., Ruth, H., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791.
- Mouatcho, J. C., Tzortzakis, N., Soundy, P., & Sivakumar, D. (2017). Bio-sanitation treatment using essential oils against E. coli O157:H7 on fresh lettuce. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 45(3), 165–174.

- Naresh, P., Selvaraj, A., Shyam Sundar, P., Murugesan, S., Sathianarayanan, S., Namboori P. K., K., & Jubie, S. (2022). Targeting a conserved pocket (n-octyl- β -D-glucoside) on the dengue virus envelope protein by small bioactive molecule inhibitors. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(11), 4866–4878.
- Nasar, S., Rashid, N., & Iftikhar, S. (2019). Dengue proteins with their role in pathogenesis, and strategies for developing an effective anti-dengue treatment: a review. *Journal of Medical Virology*, 92(8), 941–955.
- Navaratnarajah, C. K., Warriar, R., & Kuhn, R. J. (2008). Assembly of viruses: enveloped particles. In *Encyclopedia of Virology*, 193–200.
- Ocazonez, R. E., Meneses, R., Torres, F. Á., & Stashenko, E. (2010). Virucidal activity of Colombian Lippia essential oils on dengue virus replication *in vitro*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(3), 304–309.
- Otter, J. A., Donskey, C., Yezli, S., Douthwaite, S., Goldenberg, S. D., & Weber, D. J. (2016). Transmission of SARS and MERS coronaviruses and influenza virus in healthcare settings: The possible role of dry surface contamination. In *Journal of Hospital Infection*, 92(3), 235-250.
- Pajaro-Castro, N., Stashenko, E., Flechas, C., Ocazonez, R., & Olivero-Verbel, Jesús. (2015). Potential interaction of components from essential oils with dengue virus proteins. 14, 141-155.
- Palombi, N., Brai, A., Gerace, M., Di Maria, S., Orofino, F., & Corelli, F. (2021). Viral envelope membrane: a special entry pathway and a promising drug target. *Current Medicinal Chemistry*, 28(34), 6957–6976.
- Pattnaik, G. P., & Chakraborty, H. (2020). Entry inhibitors: efficient means to block viral infection. *The Journal of Membrane Biology*, 253(5), 425-444.
- Pyankov, O. V., Usachev, E. V., Pyankova, O., & Agranovski, I. E. (2012). Inactivation of airborne influenza virus by tea tree and eucalyptus oils. *Aerosol Science and Technology*, 46(12), 1295–1302.
- Perricone, M., Arace, E., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2015). Bioactivity of essential oils: A review on their interaction with food components. In *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-7.
- Prausnitz, M. R., & Langer, R. (2008). Transdermal drug delivery. In *Nature Biotechnology*, 26 (11), 1261–1268.
- Querido, M. M., Aguiar, L., Neves, P., Pereira, C. C., & Teixeira, J. P. (2019). Self-disinfecting surfaces and infection control. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 178, 8–21.

- Rabenau, H. F., Kampf, G., Cinatl, J., & Doerr, H. W. (2005). Efficacy of various disinfectants against SARS coronavirus. *Journal of Hospital Infection*, 61(2), 107–111.
- Rabenau, H. F., Schwebke, I., Blümel, J., Eggers, M., Glebe, D., Rapp, I., Sauerbrei, A., Steinmann, E., Steinmann, J., Willkommen, H., & Wutzler, P. (2020). Guideline for testing chemical disinfectants regarding their virucidal activity within the field of human medicine. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 63(5), 645–655.
- Ramakrishnan, M. A. (2016). Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World Journal of Virology*, 5(2), 86.
- Reichling, J. (2021). Antiviral and virucidal properties of essential oils and isolated compounds - a scientific approach. *In Planta Medica*, 88, 587–603.
- Rey, F. A., & Lok, S. M. (2018). Common features of enveloped viruses and implications for immunogen design for next-generation vaccines. *Cell*, 172(6), 1319-1334.
- Rodenhuis, I. A., Wilschut, J., & Smit, J. M. (2010). Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 67(16), 2773–2786.
- Romeo, A., Iacovelli, F., Scagnolari, C., Scordio, M., Frasca, F., Condò, R., Ammendola, S., Gaziano, R., Anselmi, M., Divizia, M., & Falconi, M. (2022). Potential use of tea tree oil as a disinfectant agent against coronaviruses: a combined experimental and simulation study. *Molecules* (Basel, Switzerland), 27(12), 1-19
- Saifulazmi, N. F., Rohani, E. R., Harun, S., Bunawan, H., Hamezah, H. S., Nor Muhammad, N. A., Azizan, K. A., Ahmed, Q. U., Fakurazi, S., Mediani, A., & Sarian, M. N. (2022). A review with updated perspectives on the antiviral potentials of traditional medicinal plants and their prospects in antiviral therapy. *Life* (Basel, Switzerland), 12(8), 1-38
- Salomone, A., Bozzo, A., di Corcia, D., Gerace, E., & Vincenti, M. (2018). Occupational exposure to alcohol-based hand sanitizers: the diagnostic role of alcohol biomarkers in hair. *Journal of Analytical Toxicology*, 42(3), 157–162.
- Schnierle, B. S. (2019). Cellular attachment and entry factors for chikungunya virus. *In Viruses*, 11, 1-9.
- Schnitzler, P. (2019). Essential oils for the treatment of Herpes Simplex virus infections. *Chemotherapy*, 64(1), 1–7.

- Schnitzler, P., Schuhmacher, A., Astani, A., & Reichling, J. (2008). *Melissa officinalis* oil affects infectivity of enveloped herpesviruses. *Phytomedicine*, 15(9), 734–740.
- Sengun, I. Y., Senturk, S., Gul, S., & Kilic, G. (2021). Potential of essential oil combinations for surface and air disinfection. *Letters in Applied Microbiology*, 72(5), 526-534.
- Sharma, N., Murali, A., Singh, S. K., & Giri, R. (2017). Epigallocatechin gallate, an active green tea compound inhibits the Zika virus entry into host cells via binding the envelope protein. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 1046–1054.
- Siddharta, A., Pfaender, S., Vielle, N. J., Dijkman, R., Friesland, M., Becker, B., Yang, J., Engelmann, M., Todt, D., Windisch, M. P., Brill, F. H., Steinmann, J., Steinmann, J., Becker, S., Alves, M. P., Pietschmann, T., Eickmann, M., Thiel, V., & Steinmann, E. (2017). Virucidal activity of world health organization-recommended formulations against enveloped viruses, including Zika, Ebola, and emerging Coronaviruses. *Journal of Infectious Diseases*, 215(6), 902–906.
- Silva-Trujillo, L., Quintero-Rueda, E., Stashenko, E. E., Conde-Ocazonez, S., Rondón-Villarreal, P., & Ocazonez, R. E. (2022). Essential oils from Colombian plants: antiviral potential against dengue virus based on chemical composition, *In Vitro* and *In Silico* Analyses. *Molecules*, 27(20), 1-22.
- Singh, sunita, Chaurasia, P. K., Bharati, S., & Golla, U. R. (2022). A mini-review on the safety profile of essential oils. *MOJ Biology and Medicine*, 7(1), 33–36.
- Sousa, I. P., Carvalho, C. A. M., & Gomes, A. M. O. (2021). Current understanding of the role of cholesterol in the life cycle of Alphaviruses. *In Viruses* 13 (1), 1-12.
- Suchomel, M., Eggers, M., Maier, S., Kramer, A., Dancer, S. J., & Pittet, D. (2020). Evaluation of world health organization-recommended hand hygiene formulations. *Emerging Infectious Diseases*, 26(9), 2064-2068.
- Tomlinson, S., Malmstrom, R., & Watowich, S. (2012). New approaches to structure-based discovery of dengue protease inhibitors. *Infectious Disorders - Drug Targets*, 9(3), 327–343.
- Trujillo-Correa, A. I., Quintero-Gil, D. C., Diaz-Castillo, F., Quiñones, W., Robledo, S. M., & Martinez-Gutierrez, M. (2019). *In vitro* and *in silico* anti-dengue activity of compounds obtained from *Psidium guajava* through bioprospecting. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 1-16.
- Valero-Rello, A., & Sanjuán, R. (2022). Enveloped viruses show increased propensity to cross-species transmission and zoonosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(50), 1-5.

- Vaney, M. C., Duquerroy, S., & Rey, F. A. (2013). Alphavirus structure: activation for entry at the target cell surface. *Current Opinion in Virology*, 3(2), 151–158.
- Velandia, S. A., Flechas, M. C., Stashenko, E. E., & Ocazonez, R. E. (2016). Proposal to select essential oils from Colombian plants for research based on its cytotoxicity. *Vitae*, 23(1), 19–29.
- Verma, J., Subbarao, N., & Rajala, M. S. (2020). Envelope proteins as antiviral drug target. *Journal of Drug Targeting*, 28(10), 1046–1052.
- Wang, C., Wang, Z., Wang, G., Lau, J. Y. N., Zhang, K., & Li, W. (2021). COVID-19 in early 2021: current status and looking forward. *In Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6, 1–14.
- Wani, A. R., Yadav, K., Khursheed, A., & Rather, M. A. (2021). An updated and comprehensive review of the antiviral potential of essential oils and their chemical constituents with special focus on their mechanism of action against various influenza and coronaviruses. *In Microbial Pathogenesis*, 152, 1–14.
- Weaver, S. C., & Lecuit, M. (2015). Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. *New England Journal of Medicine*, 372(13), 1231–1239.
- Wichit, S., Gumpangseth, N., Hamel, R., Yainoy, S., Arikitt, S., Punsawad, C., & Missé, D. (2021). Chikungunya and zika viruses: Co-circulation and the interplay between viral proteins and host factors. *In Pathogens* 10(4), 1–27.
- Wu, Q., Wang, W., Dai, X., Wang, Z., Shen, Z., Ying, H., & Yu, C. (2012). Chemical compositions and anti-influenza activities of essential oils from *Mosla dianthera*. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(2), 668–671.
- Xiling, G., Yin, C., Ling, W., Xiaosong, W., Jingjing, F., Fang, L., Xiaoyan, Z., Yiyue, G., Ying, C., Lunbiao, C., Liubo, Z., Hong, S., & Yan, X. (2021). *In vitro* inactivation of SARS-CoV-2 by commonly used disinfection products and methods. *Scientific Reports*, 11(1), 1-9.
- Yao, L. (2012). In silico search for drug targets of natural compounds. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(9), 1632-1639.
- Yap, P. S. X., Yusoff, K., Lim, S. H. E., Chong, C. M., & Lai, K. S. (2021). Membrane disruption properties of essential oils—a double-edged sword *Processes*, 9(4), 1-11.
- Zhang, X., Ge, P., Yu, X., Brannan, J. M., Bi, G., Zhang, Q., Schein, S., & Hong Zhou, Z. (2013). CryoEM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(1), 105–110.

Zonetti, L. F. C., Coutinho, M. C., & de Araujo, A. S. (2018). Molecular aspects of the dengue virus infection process: a review. *Protein & Peptide Letters*, 25(8), 712–719.

APENDICES

Tabla suplementaria 1. Valores de energías de unión AutoDock Vina de los compuestos identificados en la mezcla AE y las proteínas de la envoltura.

Clase	Compound	DENV-2		CHIKV
		E	prM/M	E1-E2-E3
Sesquiterpenos hidrocarbonados	δ -Cadineno	-8,61 \pm 0,8	-5,47 \pm 0,1	-6,25 \pm 0,1
	α -Guaieno	-8,55 \pm 1,0	-5,29 \pm 0,1	-6,38 \pm 0,2
	γ -Cadineno	-8,22 \pm 1,0	-5,26 \pm 0,2	-6,22 \pm 0,1
	α -Bulneseno	-8,12 \pm 0,9	-5,37 \pm 0,2	-6,26 \pm 0,2
	Germacreno D	-7,03 \pm 1,1	-5,40 \pm 0,1	-6,25 \pm 0,2
	β -Elemeno	-6,49 \pm 0,9	-4,85 \pm 0,5	-5,92 \pm 0,2
	<i>trans</i> - β -Cariofileno	-6,48 \pm 0,5	-5,36 \pm 0,2	-6,32 \pm 0,1
	α -Muroleno	-5,91 \pm 0,5	-5,26 \pm 0,3	-6,18 \pm 0,2
	γ -Muroleno	-5,91 \pm 0,3	-5,26 \pm 0,3	-6,18 \pm 0,2
	α -Humuleno	-5,90 \pm 0,5	-5,29 \pm 0,3	-6,37 \pm 0,3
Sesquiterpenos Oxigenados	<i>epi</i> - α -Murolol	-8,10 \pm 1,0	-5,42 \pm 0,1	-6,37 \pm 0,2
	Farnesol	-6,57 \pm 0,6	-5,33 \pm 0,2	-6,01 \pm 0,2
	α -Cadinol	-6,54 \pm 0,5	-5,28 \pm 0,2	-6,70 \pm 0,2
	α -Eudesmol	-6,50 \pm 0,6	-5,47 \pm 0,1	-6,70 \pm 0,3
	Elemol	-6,49 \pm 0,9	-5,02 \pm 0,2	-5,90 \pm 0,2
	Germacreno D-4-ol	-5,80 \pm 0,6	-5,41 \pm 0,1	-6,38 \pm 0,2
	<i>epi</i> - α -Cadinol	-5,75 \pm 0,6	-5,18 \pm 0,1	-6,29 \pm 0,2
	<i>trans</i> -Nerolidol	-5,70 \pm 0,5	-4,62 \pm 0,2	-5,34 \pm 0,3
	Patchulol	-5,67 \pm 0,2	-4,97 \pm 0,1	-6,45 \pm 0,2
	Óxido de cariofileno	-5,90 \pm 0,5	-5,25 \pm 0,1	-6,50 \pm 0,3
Monoterpenos hidrocarbonados	Limoneno	-7,22 \pm 0,2	-4,60 \pm 0,4	-5,16 \pm 0,1
	γ -Terpineno	-7,18 \pm 0,4	-4,95 \pm 0,4	-5,29 \pm 0,1
	<i>p</i> -Cimeno	-7,16 \pm 0,5	-4,89 \pm 0,3	-5,34 \pm 0,1
	<i>trans</i> - β -Ocimeno	-6,47 \pm 0,3	-4,62 \pm 0,1	-4,81 \pm 0,1
	β -Mirceno	-5,98 \pm 0,6	-4,08 \pm 0,2	-4,72 \pm 0,2
	α -Pineno	-5,02 \pm 0,3	-4,24 \pm 0,1	-5,13 \pm 0,1
Compuestos fenólicos	Carvacrol	-7,32 \pm 0,3	-5,29 \pm 0,4	-5,49 \pm 0,1
	Timol	-7,03 \pm 0,4	-5,31 \pm 0,3	-5,48 \pm 0,1
	Eugenol	-6,54 \pm 0,5	-5,16 \pm 0,4	-5,46 \pm 0,3
Monoterpenos Oxigenados	Isopulegol	-6,70 \pm 0,6	-4,85 \pm 0,2	-5,19 \pm 0,1
	Acetato de citronelilo	-6,32 \pm 0,4	-4,81 \pm 0,2	-5,40 \pm 0,2
	Acetato de geranilo	-6,30 \pm 0,5	-5,23 \pm 0,2	-5,71 \pm 0,2
	Neral	-6,25 \pm 0,5	-4,10 \pm 0,2	-4,86 \pm 0,2
	Geranial	-6,20 \pm 0,4	-4,28 \pm 0,2	-4,95 \pm 0,2

Tabla suplementaria 1. Valores de energías de unión AutoDock Vina de los compuestos identificados en la mezcla AE y las proteínas de la envoltura.

	Citronelol	-6,07 ± 0,3	-4,51 ± 0,2	-5,01 ± 0,1
	Hexanoato de nerilo	-5,98 ± 0,4	-5,24 ± 0,2	-5,71 ± 0,3
	Geraniol	-5,91 ± 0,5	-4,65 ± 0,2	-5,18 ± 0,1
	Citronelal	-5,75 ± 0,5	-4,03 ± 0,3	-4,72 ± 0,2
	Linalool	-5,72 ± 0,5	-4,31 ± 0,2	-4,91 ± 0,1
	1,8-Cineol	-4,77 ± 0,2	-4,24 ± 0,2	-5,16 ± 0,2
Otros compuestos oxigenados	<i>n</i> -Decanal	-5,47 ± 0,3	-5,47 ± 0,3	-4,56 ± 0,1
	6-Methyl-5-hepten-2-ona	-5,51 ± 0,2	-4,31 ± 0,2	-4,43 ± 0,2