

**ACTIVIDAD DE EXTRACTOS NATURALES SOBRE LA REPLICACIÓN IN
VITRO DEL VIRUS DE LA FIEBRE AMARILLA**

ROCÍO MENESES LÓPEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2007**

**ACTIVIDAD DE EXTRACTOS NATURALES SOBRE LA REPLICACIÓN IN
VITRO DEL VIRUS DE LA FIEBRE AMARILLA**

ROCÍO MENESES LÓPEZ

**Tesis de Grado como requisito para optar al título de
Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas**

Directora: **RAQUEL E. OCAZONEZ PhD.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2007**

Dedico el esfuerzo y los frutos alcanzados luego de cumplir esta meta tan importante en mi vida:

A Julián, amor que significa alegría, comprensión, apoyo y fuerza para seguir el camino que nos permita estar juntos, como siempre lo soñamos. Amor que cada día crece y se fortalece con los logros alcanzados.

A nuestro bebé, que se convierte en la fortaleza más grande de nuestras vidas, que llegará cargado de esperanza y bendiciones. Que se convierte en mi futuro y al que le entrego cada palabra escrita

A mi madre, hermanos, amigos por su apoyo y por cada momento compartido.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Raquel Ocazonez, directora de tesis por su comprensión y compromiso con la formación personal, académica y científica

Al Doctor Gerardo Muñoz, Coordinador de la Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas por su gran apoyo y confianza para mostrarme el camino que hace verdaderos sabios

A la Doctora Patricia Escobar, Directora del grupo de Quimioterapia por su apoyo y acompañamiento en la primer fase del desarrollo de la tesis

A la Doctora Elena Stashenko, Directora del consorcio CENIVAM por facilitar el desarrollo de la tesis con aceites esenciales obtenidos por su grupo de investigación

Al Doctor Luís Carlos Orozco, Profesor de Bioestadística por la disponibilidad, entusiasmo y colaboración en el análisis de datos

Al Bacteriólogo Sergio Yebrail Gómez, Coordinador del Laboratorio de Arbovirus por su confianza y apoyo incondicional en el trabajo de laboratorio y análisis de datos

A la Bacterióloga Sandra Leal, Coordinadora del Laboratorio de Quimioterapia por su apoyo y organización en el trabajo de laboratorio.

A Ángela María, estudiante de Biología por su servicio y agradable compañía en las jornadas de trabajo

A Beatriz, Auxiliar de Laboratorio por mantener las condiciones necesarias para el desarrollo de los experimentos

A Esperancita, Secretaria del Departamento de Ciencias Básicas por su colaboración en los trámites administrativos

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. OBJETIVO	4
2. MARCO TEÒRICO	5
2.1 ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE ACEITES ESENCIALES	5
2.2 MECANISMOS DE ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE ACEITES ESENCIALES	8
2.3 ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE EXTRACTOS CRUDOS Y OTROS PRODUCTOS NATURALES	9
2.4 ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE PLANTAS COLOMBIANAS	10
2.5 ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE COMPUESTOS SINTÉTICOS	11
3. METODOLOGÍA	13
3.1 PLANTAS	13
3.2 EXTRACTO DE ACEITES	14
3.3 CÉLULA	14
3.4 VIRUS	14
3.5 CUANTIFICACIÓN DEL VIRUS	14
3.6 REPLICACIÓN DEL VIRUS	15
3.7 CITOTOXICIDAD	15

3.8 EFECTO ANTIVIRAL	15
3.8.1 Tratamiento A: antes de la infección	15
3.8.2 Tratamiento B: antes y después de la infección	16
3.8.3 Tratamiento C: de la célula	16
3.9 ANALISIS DE DATOS	16
4. RESULTADOS	17
4.1 CITOTOXICIDAD	17
4.2 REPLICACIÓN DEL VIRUS	17
4.3 EFECTO ANTIVIRAL	18
4.3.1 Tratamiento A	18
5.3.2 Tratamiento B	20
5.3.3 Tratamiento C	20
5. DISCUSIÓN	23
6. CONCLUSIONES	27
BIBLIOGRAFÍA	28

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Plantas colombianas incluidas en el estudio	13
Tabla 2. Efecto tóxico sobre células Vero de extractos de aceites esenciales obtenidos de plantas colombianas	17
Tabla 3. Efecto antiviral sobre el virus de la fiebre amarilla (YF-17DD) de aceites esenciales de plantas colombianas según tratamiento y comparado con Ribavirina.	21

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Comparación de la viabilidad de cultivos de células Vero tratados con aceites esenciales de plantas colombianas y Ribavirina	18
Figura 2. Título viral (UFP/mL) diario en cultivos de células Vero infectados con virus de la fiebre amarilla (YF-17DD) en relación con el MOI	18
Figura 3. Efecto antiviral aparente sobre el virus de la fiebre amarilla (YF-17DD) por tratamiento con extracto de aceites esenciales de plantas colombianas	19
Figura 4. Efecto antiviral sobre la replicación del virus de la fiebre amarilla (YF-17DD) de extractos de aceites esenciales de plantas colombianas – Tratamiento A	20
Figura 5. Efecto antiviral sobre la replicación del virus de la fiebre amarilla (YF-17DD) de extractos de aceites esenciales de plantas colombianas – Tratamiento B	21
Figura 6. Efecto antiviral sobre la replicación del virus de la fiebre amarilla (YF-17DD) de extractos de aceites esenciales de plantas colombianas – Tratamiento C	22

TÍTULO: ACTIVIDAD DE EXTRACTOS NATURALES SOBRE LA REPLICACIÓN *IN VITRO* DEL VIRUS DE LA FIEBRE AMARILLA*

AUTORES: MENESES LÓPEZ, Rocío; OCAZONEZ JIMÉNEZ, Raquel Elvira**

PALABRAS CLAVES: plantas medicinales, aceites esenciales, antiviral, virus de la fiebre amarilla, Colombia.

RESUMEN

En este estudio se evaluó *in vitro* el efecto citotóxico y la actividad antiviral sobre el virus de la fiebre amarilla (YF-17DD) de aceites esenciales extraídos de plantas colombianas, usando el ensayo colorimétrico MTT y reducción del título viral (UFP/ml), respectivamente.

Se evaluaron tres tipos de tratamiento antiviral. A, virus tratado 24 hs a 4°C antes de la adsorción sobre células Vero. B, virus tratado antes de la adsorción y durante la replicación. C, células tratadas antes de la adsorción del virus. El título viral en el sobrenadante de los cultivos cosechado 72 hs post infección se comparó con el control.

Aceites esenciales de *Origanum vulgare*, *Lippia origanoide*, *Artemisia sp* y *Lippia alba* no fueron citotóxicos (CC_{50} : 84.8 – 97.7 $\mu\text{g/ml}$) y todos los cuatro inhibieron el virus después del tratamiento A o B. *O. vulgare* (oregano) a 11.1 $\mu\text{g/ml}$ fue el más activo con el tratamiento A (1.8 vs 14.7 $\times 10^3$ UFP/ml. $p < 0.05$) y *L. origanoides* (orégano de burro) a la misma concentración inhibió 100% con el tratamiento B (0 vs 13.3 $\times 10^3$ UFP/ml). Para todos los cuatro aceites esenciales, el tratamiento B resultó más efectivo que el A ($p < 0.001$ ANOVA). El tratamiento C con cualquiera de los cuatro aceites no tuvo efecto inhibitorio (5 vs 9.6 $\times 10^4$ UFP/ml. $p < 0.05$). Los resultados sugieren que estos extractos de hierbas contienen agentes con potencial antiviral contra el virus de la fiebre amarilla que pueden ser explorados para el desarrollo de un remedio alternativo para la FA.

* Trabajo de grado

*** Facultad de Salud. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. PhD. Director tesis

TITLE: ACTIVITY OF NATURAL EXTRACTS ON YELLOW FEVER VIRUS REPLICATION*

AUTHORS: MENESES LÓPEZ Rocío, OCAZONEZ JIMÉNEZ, Raquel Elvira**

KEY WORDS: medicinal plants, essential oil, antiviral, yellow fever virus, Colombia.

ABSTRACT

In this study was evaluated in vitro the effect cytotoxic and antiviral activity on yellow fever virus (YF-17DD) of essential oils extracted of Colombian plants using the MTT colorimetric assay and viral title (PFU/ml) reduction, respectively.

Three types of antiviral treatment were tested. A, virus treated 24 hs at 4°C before adsorption on Vero cells. B, virus treated before adsorption and during replication. C, cells treated before virus adsorption. Viral title in culture supernants harvested 72 hs post infection was compared with the control.

Essential oils of *Origanum vulgare*, *Lippia origanoide*, *Artemisia sp* y *Lippia alba* were not cytotoxic (CC₅₀: 84.8 – 97.7 µg/ml) and all of four inhibited YF virus after treatment A or B. *O. vulgare* at 11.1 µg/ml was the most active by treatment A (1.8 vs 14.7 x10³ UFP/ml. p < 0.05), and *L. origanoides* at the same concentration caused inhibition 100% by treatment B (0 vs 13.3x10³ UFP/ml). For all four essential oils, the treatment B resulted more effective than treatment A (p < 0.0,1 ANOVA). Treatment C with any one of four essential oils do not have inhibitory effect (5 vs 9.6 x 10⁴ UFP/ml. p < 0.05). These results suggest that this herbal extract has potent anti-viral agents against yellow fever virus that can be exploited for development of an alternative remedy for YF.

* Masters thesis. Medical Basic Sciences Postgraduate Programme.

*** Faculty of Health, Medical Basic Sciences Postgraduate Programme,
Director thesis.

INTRODUCCIÓN

El virus de la fiebre amarilla (VFA) pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *flavivirus*, donde se agrupan otros transmitidos por mosquitos como el del dengue (VDEN), Rocio (VR), Oeste del Nilo (VON), encefalitis de San Luis (VESL), encefalitis del Valle de Murray (VEVM) y encefalitis transmitida por garrapata (VETG) (Heinz *et al.* 2000). Los *flavivirus* tienen cápside icosaédrica y envoltura, el genoma es de ARN de hebra simple en sentido positivo que transcribe una poliproteína la cual se fragmenta en 10 polipéptidos por acción de proteasas virales y celulares. Las proteínas C, M y E se denominan estructurales, las dos primeras conforman la cápside y la matriz y la otra es el principal componente viral de la envoltura. La proteína E se considera la de mayor importancia biológica, es el receptor a través del cual el virus se fusiona con la membrana celular y el principal antígeno inductor de anticuerpos neutralizantes que intervienen en la defensa del huésped. Las restantes 7 proteínas se encuentran en la célula infectada participando en la morfogénesis del virus y se conocen como no-estructurales (NS) (Chambers, 1990).

La circulación del VFA ocurre en área selvática y urbana, en la primera el virus se transmite entre primates no humanos o entre estos y el hombre a través de la picadura de mosquitos de diversas especies *Haemagogus* y *Sabethes* en América. En la segunda, la transmisión se inicia cuando un paciente virémico infectado en la selva se desplaza hacia centros urbanos donde es picado por el mosquito *Aedes aegypti* y éste transmite el virus a un individuo susceptible (Monath, 2001). La infección con el VFA puede resultar asintomática o en infección aguda de corta duración cuya severidad varía desde leve hasta fulminante. La forma leve se caracteriza por fiebre que puede ir acompañada o no de cefalea y síntomas generalizados inespecíficos. En contraste, en la severa se presentan los síntomas clásicos que reflejan el daño hepato-renal tales como ictericia, hemorragias, vómito y postración y a estos hallazgos clínicos se le debe el nombre de Fiebre Amarilla (FA). Se estima que el 90% de los casos son de la forma leve y el 10% de la severa, de los cuales 25-80% resultan fatales (Monath, 2001).

La FA se puede prevenir por vacunación con un virus atenuado (YF 17DD) pero debido a la baja cobertura de la población, en algunas regiones los casos son permanentes y se han incrementado en los últimos 10 años. La Organización Mundial de la Salud estima que aproximadamente 200,000 pacientes se reportan cada año, de los cuales cerca de 50% mueren por falta de tratamiento antiviral oportuno y eficiente (PAHO, 2006). En Colombia, la FA selvática viene ocurriendo desde el siglo pasado con brotes cada 5 – 7 años y la urbana al parecer ha estado ausente desde 1929 cuando se informó por última vez (PAHO, 2006). Los casos se reportan con mayor frecuencia en los departamentos de Amazonas, Norte de Santander, Guaviare, Meta, Vaupés, Orinoco, Magdalena, Antioquia y Santander. En el 2003 ocurrió el último brote

con 106 casos confirmados por laboratorio de los cuales 47 murieron (PAHO, 2004).

No existe un medicamento licenciado para el tratamiento de pacientes con FA y esto hace difícil disminuir el riesgo de daño hepático y alteraciones multiorgánicas que se presentan en casos severos. El manejo es sintomático con aporte de líquidos, fármacos vasopresores, oxígeno, soporte nutricional, corrección de acidosis metabólica y soporte renal, que en más del 50% no es suficiente para mejorar el estado del paciente (Monath, 2001). Se han evaluado compuestos sintéticos como la ribavirina, análogos de ésta e interferón. La ribavirina es un análogo de nucleósido de amplio espectro que actúa en etapas intracelulares del ciclo de replicación del VFA y lo mismo se ha visto con otros virus ARN como influenza, sincitial respiratorio (VSR), hepatitis C (VHC) y VDEN (Huggins, 1989). *In vitro* la ribavirina disminuye por lo menos 50% del título viral en cultivos infectados con el VFA en presencia de 30 – 45 µg/ml (Leyssen, 2006; Crance, 2003; Leyssen, 2001; Huggins, 1989). Sin embargo, al evaluar la actividad del compuesto *in vivo* los resultados varían de acuerdo al animal siendo inactiva en monos *Rhesus* (Huggins, 1989) y al contrario en hamster (Julander & Morrey, 2007; Sbrana, 2004). En pacientes con FA el tratamiento con ribavirina ha resultado de baja eficacia además de efectos secundarios debidos a la toxicidad y esto ha impedido ser licenciada para uso médico rutinario. Esta dificultad motivó la fabricación de derivados del compuesto como el viramidine que ha resultado con actividad en ensayos *in vitro* pero no se ha demostrado eficacia aceptable *in vivo* (Julander & Furuta, 2007; Julander & Morrey, 2007; Ojwang, 2005; Tolou, 1996). El interferón es otro compuesto que se ha evaluado como antiviral y los resultados demuestran mayor actividad en modelo animal, pero su uso en humanos no ha sido aprobado y es restringido por sus múltiples efectos secundarios (Julander & Morrey, 2007).

La disponibilidad de medicamentos para el tratamiento de casos severos de la FA es una necesidad para evitar fatalidades durante los brotes. Los inconvenientes con los antivirales de uso actual y la dificultad para encontrar nuevos, han obligado de manera permanente a la búsqueda de compuestos derivados de plantas con actividad antiviral. El uso de brebajes o emplastes de origen natural para aliviar o prevenir diversas enfermedades humanas, es una práctica milenaria a la cual están recurriendo con mayor frecuencia habitantes de las ciudades más desarrolladas. De los miles de productos que las plantas son capaces de sintetizar centenares se han evaluado *in vitro* e *in vivo* contra una variedad de virus causantes de enfermedades en humanos (Martin, 2003; Jassim & Naji, 2003). Se ha reportado que el consumo diario de brebajes a base de hierbas chinas disminuyó la carga viral en pacientes con SIDA (Kusum, 2004), el extracto de *Phyllanthus* disminuyó la concentración de antígeno de superficie y normalizó los niveles séricos de transaminasas en individuos con hepatitis B (Dhiman, 2005) y el tratamiento de infecciones humanas herpéticas con ácido glicirricico (*Glycyrrhiza*) ha resultado esperanzador para disminuir la latencia propia de estos virus (Curreli, 2005).

A diferencia de otros un número muy limitado de productos extraídos de plantas han sido evaluados contra el VFA. Algunos han mostrado efecto inhibitorio de la replicación *in vitro*, muy pocos han sido evaluados *in vivo* y resultados en modelo murino mostraron que los extractos fueron activos cuando se inocularon simultáneamente con el virus disminuyendo los síntomas y la carga viral (Ono, 2003). Colombia posee mas de 51,220 especies de plantas medicinales entre ellas *Conyza sp.* (Tacehsa), *Ambrosia artemisioides* (marco), *Eupatorium glutinosum* (matico), *Goupia glabra* (jodna) e *Iryanthera tricornis* (jaka), que han sido usadas por siglos para calmar dolencias producidas por diversos microorganismos (Bernal, 1995). Sin embargo, pocos esfuerzos se han realizado para identificar los componentes bioactivos y su potencial terapéutico.

1. OBJETIVO

Evaluar el efecto antiviral sobre el virus de la fiebre amarilla de extractos que contienen aceites esenciales obtenidos de plantas cultivadas en Colombia.

2. MARCO TEÓRICO

Actualmente se ofrecen en el mercado más de 40 medicamentos para el tratamiento del SIDA, influenza, hepatitis B, hepatitis C y Herpesvirosis pero ninguna para enfermedades causadas por *flavivirus* entre estas la fiebre amarilla (WHO, 2002). Por muchos años las plantas han sido ampliamente usadas en la medicina natural para tratar enfermedades infecciosas, razón por la cual ha sido centro de atención para muchos laboratorios de la industria farmacéutica. Los compuestos activos de la mitad de los medicamentos disponibles se han obtenido de plantas y es posible que se puedan obtener otros más eficaces de amplio espectro de más de 50,000 especies. Las plantas tienen una capacidad inagotable de sintetizar proteínas, azúcares, metabolitos secundarios y aceites esenciales responsables de su actividad biológica (Jassim & Najj, 2003).

2.1 ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE ACEITES ESENCIALES.

Los aceites esenciales son mezclas de componentes de bajo peso molecular que incluye terpenos (diterpenos, triterpenos, tetraterpenos, hemiterpenos y sesquiterpenos) y homólogos de fenil-propanoides. Se cree que los terpenos son activos contra bacterias, parásitos, hongos y virus por diferentes mecanismos, pero a nivel general interactúan con la membrana de células patógenas disolviendo la bicapa lipídica con subsiguiente pérdida de constituyentes intracelulares. Aceites esenciales de frutas, hojas, semillas, corteza y raíces de muchas plantas han sido ampliamente usados en medicina tradicional con propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias y antirreumáticas (Reichling, 2006; Moreira, 2005; Gulluce, 2003; Cox, 2000).

No existe información documentada de actividad antiviral de aceites esenciales sobre el VFA y es muy escasa con otros miembros de la familia. García y col. encontraron que aceites de plantas argentinas como *Heterothalamus alienus* y *Buddleja cordobensis* fueron activos contra virus DEN-2 (CI_{50} = 60-150 ppm) aunque menos comparado con virus envueltos de otras familias (García, 2003). Lo mismo se demostró con aceites de *Peptis odorata*, *Gaillardia megapotamica*, *Heterothalamus alienus* y *Buddleja cordobensis*, pero la concentración inhibitoria fue muy cercana a la citotóxica (Duschatzky, 2005).

Un sin número de publicaciones demostrando actividad antiviral de aceites esenciales contra virus envueltos de otras familias diferentes a la Flaviviridae están disponibles, en especial contra virus Herpes Simplex 1 (VHS-1) y 2 (VHS-2). Aceites obtenidos de *Hypericum mysorense*, *Hypericum hookerianum* y *Usnea complanta* inhibieron 100% la productividad del VHS-1 por interacción directa con la partícula viral. *Minthostachys verticillata* mostró el mismo efecto a concentraciones no citotóxicas (Vijayan, 2004; Primo, 2001). El aceite conocido como *Sandalwood* obtenido de *Santalum album* inhibió el virus de manera dosis dependiente y con efecto

más pronunciado contra el VHS-1 (Tenencia & Courreges 1999). *Melissa officinalis* ha sido usada como tratamiento tópico para heridas en piel y administrado por vía oral para el tratamiento de síntomas respiratorios. Al evaluar la actividad *in vitro* de aceites esenciales de esa planta contra el VHS-1 y 2 se encontró que fue similar a la del aciclovir, el medicamento de uso actual (Allahverdiyev, 2004). *Mentha piperita* o Hierbabuena es una de las especies con mayor distribución geográfica y utilidad en la industria culinaria. Sus propiedades biológicas llamaron la atención por el uso en medicina tradicional para el tratamiento externo de lesiones en piel producidas por hongos, virus o bacterias. *In vitro* aceite de *peppermint* inactivó VHS dependiente de la concentración y el efecto aumentó con el tiempo de incubación (Schuhmacher, 2003). Inhibición de la replicación *in Vitro* del VHS entre 57.9 y 98.2% se ha reportado con aceite del árbol de té australiano (*Melaleuca alternifolia*) de uso popular como preservante antimicrobial en productos cosméticos y el extraído de *eucalyptus* (Schnitzler, 2001). Lo mismo con el de plantas aromáticas argentinas como *Eupatorium patens*, *Artemisia douglasiana*, *Aloysia gratissima*, *Tessaria absinthioides* (CI₅₀ = 65-125 ppm) (Duschatzky, 2005; García, 2003) y el de *Leptospermum scoparium* conocido en Nueva Zelanda con el nombre de manuka (CI₅₀ = 0.96-0.58 µg/mL dependiendo del serotipo) (Reichling, 2005).

Aceites esenciales de *Hypericum perforatum* han sido activos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el VHC. Esta planta posee actividad biológica de amplio espectro contra agentes de enfermedades infecciosas y también ha mostrado actividad en el mantenimiento de las funciones metabólicas (Lavie, 1995). Extractos de plantas cultivadas en Argentina como *Lippia junelliana* y *Lippia turbinata*, tuvieron efecto inhibitorio sobre el virus Junín, un Arenavirus que causa la fiebre hemorrágica Argentina (García, 2003). El aceite de la semilla de *Nigella sativa* disminuyó la enfermedad por Citomegalovirus en ratones infectados experimentalmente y al parecer fue por fortalecimiento del sistema inmune más que por acción directa sobre el virus (Salem, 2000).

El propósito de estudiar la actividad antiviral *in vitro* de productos naturales es identificar el componente activo responsable del efecto biológico, para establecer estrategias de manufacturación según la enfermedad a tratar. Muy pocos compuestos derivados de aceites esenciales han sido identificados y purificados. Se ha estudiado el efecto antiviral de terpenoides y flavonoides, el primero es el principal componente de la *Artemisa* una planta de amplio uso para el tratamiento de la malaria. El mayor potencial antiviral descubierto en terpenoides y sus derivados se ha visto sobre virus que causan infecciones crónicas latentes las cuales con frecuencia resultan en cáncer. El ácido glicirrínico, extraído de las raíces de *Glycyrrhiza sp.* (licorine), inhibe la latencia del virus del Epstein Barr, el agente del linfoma de Burkitt y otras neoplasias, herpesvirus del sarcoma de Kaposi y el VHC que está asociado a cáncer hepático (Curreli, 2005; Lin, 2003; Liu, 2003). El ácido glicirrínico y otros como el ácido morónico, ursólico y maslínico (*Deum japonicum*, *Rhus javanica*) poseen potente actividad inhibitoria contra otros virus como el VIH, VHS y el

Coronavirus de la neumonía atípica (SARS) (Raulin, 2005; Jasmin, 2003). El isborneol, un monoterpeneo y componente de varios aceites esenciales mostró actividad dual contra el VHS-1. Esto es, inactivó significativamente el virus antes de la infección e inhibió completamente la replicación en cultivo celular a concentraciones no citotóxicas (Armaka, 1999). En el caso de *Origanum acutiens*, el efecto antiviral se relaciona con el alto contenido de carvacrol, un componente que posee actividades antioxidantes (Sokmen, 2004; Gulluce, 2003; Barrata, 1998). *Scutellaria baicalensis* es una planta usada en la medicina tradicional china para tratar diversas enfermedades infecciosas. El gran interés por entender el mecanismo de acción de los aceites originados de esta planta llevo a Li y col. a purificar e identificar el baicalin, un flavonoide, como el componente bioactivo. Cuando se usó contra el VIH inhibió la infección viral no solo en cultivo de líneas celulares transformadas sino que los resultados se corroboraron en cultivo primario de mononucleares de sangre periférica periféricos (Li, 1993). Varios reportes han demostrado el efecto inhibitorio de ciertos flavonoides sobre la proteasa, integrasa y transcriptasa reversa del VIH (Critchfield, 1996). Recientemente, de *Pithecellobium clypearia* se aislaron dos flavonoides que inactivaron varios virus envueltos como el VSR ($CI_{50} = 5 - 10 \mu\text{M}/\text{mL}$), influenza A ($CI_{50} = 15.7 - 13 \mu\text{M}/\text{mL}$), Coxsackie B3 ($CI_{50} = 12.5 - 25 \mu\text{M}/\text{mL}$) y VHS-1 ($CI_{50} = 5 - 10 \mu\text{M}/\text{mL}$) (Li, 2006). De *Kaempferia parviflora* se extrajeron el 5-hydroxy-7-methoxyflavone, 5,7-dimethoxyflavone y 5-hydroxy-3,7-dimethoxyflavone, los dos primeros inactivaron la proteasa del VIH ($CI_{50} = 19 \mu\text{M}$) y el último la del VHC (Sookkongwaree, 2006). De *Phyllanthus urinaria* se aisló el ácido *ellagico* que bloqueó efectivamente la síntesis del antígeno e del VHB ($CI_{50} = 0.07 \mu\text{M}/\text{mL}$), un indicador de replicación viral activa y permanente, pero no la del antígeno S ni la ADN polimerasa (Shin, 2005).

Teniendo en cuenta que se han reportado más de 10 especies de plantas productoras de aceites esenciales con actividad biológica y que existe componentes activos purificados de las mismas, se han explorado nuevas herramientas con el objetivo de aumentar el efecto antiviral. En años recientes los liposomas han sido extensamente estudiados como un instrumento de transporte que aumenta la seguridad y la actividad de muchas drogas. El uso de los liposomas se basa en la capacidad de transportar medicamentos a través de la membrana lipídica para transferir el componente bioactivo dentro de la célula infectada. Además, la incorporación en liposomas aumenta la estabilidad del aceite esencial y pueden ser administrados por varias vías de acuerdo al tipo y severidad de la infección (Uchegbu, 1998). Aceite esencial extraído de *Artemisia arborescens* contenido dentro de diferentes preparaciones de liposomas aumento la actividad antiviral contra el VHS-1 a pesar que el principal efecto de este aceite se da durante la etapa de adsorción. Los resultados claramente indican que el uso de liposomas permite mantener estable el aceite en el medio externo y aumenta la distribución del mismo (Sinico, 2005).

2.2 MECANISMOS DE ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE ACEITES ESENCIALES

La mayor actividad antiviral *in vitro* de los aceites esenciales se ha reportado con virus ADN o ARN con envoltura y que son tratados por varias horas antes de adicionarse a la célula. Varios autores concuerdan en que los aceites esenciales pueden interactuar con la envoltura viral por su naturaleza lipoproteica enmascarando proteínas que actúan como receptores en el reconocimiento de la célula huésped o induciendo un cambio conformacional en estas que impide la adsorción o entrada del virus a través de la membrana celular (Cox, 2000). Este mecanismo ha sido demostrado con aceites esenciales de *Santolina insulares* que solo fue activo contra los dos serotipos del VHS antes de la infección celular pero no previno la penetración viral ni la infección por tratamiento previo de la célula (De Logu, 2006). La interacción directa del aceite con la estructura viral se puede explicar por la presencia de flavones en altas concentraciones. Los flavonoides fortalecen el efecto antiviral inducido por el factor de necrosis tumoral y se les ha identificado actividad sinérgica con el aciclovir en el tratamiento del VHS; es decir, la administración simultánea del compuesto natural y sintético previene la adsorción de HSV-1, la penetración y la síntesis de proteínas virales (Hayashi, 1997).

Por otra parte, se cree que los aceites esenciales pueden atravesar la membrana de la célula huésped y por lo mismo se ha postulado que eventos posteriores a la adsorción del virus pueden estar involucrados en el efecto antiviral. Componentes de algunos aceites pueden interrumpir etapas de replicación intracelular por interacción con la expresión de proteínas, replicación del material genético o en ensamble de nuevas partículas virales. La actividad antiviral a este nivel se infiere para aceites esenciales que disminuyen la productividad de virus tratados durante la replicación en cultivo celular (Duschatzky, 2005). Con el aceite de *Sandalwood* el efecto antiviral solo pudo ser detectado cuando se adicionó a los cultivos infectados y no por exposición directa del virus. Se concluyó que el aceite inhibió la replicación y no la adsorción del virus a la membrana celular (Benencia, 1999). Esta propiedad se ha sugerido como alternativa de tratamiento de infecciones herpéticas por cepas virales resistentes al aciclovir, ya que aislados de pacientes que no respondieron al tratamiento al medicamento fueron inhibidos *in vitro* por el aceite (Schnitzler, 2007; Benencia, 1999).

Se ha visto que células infectadas y tratadas con el ácido glizirrínico incrementan la síntesis de la proteína p53 un regulador del ciclo celular resultando en inhibición de la proliferación celular que conlleva a la formación de tumor. Este terpenoide puede simultáneamente potenciar la acción antiviral del interferón, una citocina del sistema inmune de defensa del huésped (Curreli, 2005; Lin, 2003; Liu, 2003).

La mayoría de flavonoides inactivan proteasas o polimerasas virales bloqueando la replicación del genoma y/o síntesis proteica. No obstante,

algunos tienen baja selectividad pudiendo inhibir ARN y ADN polimerasas celulares (Jassim & Naji, 2003).

2.3 ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE EXTRACTOS CRUDOS Y OTROS PRODUCTOS NATURALES

Extractos crudos obtenidos a partir de diversas plantas también han mostrado actividad antiviral por mecanismos similares a los descritos para los aceites esenciales y en muchos casos porque comparten composición y características químicas. En extractos de plantas cultivadas en países de todos los continentes se detectó actividad antiviral contra virus con envoltura, entre estos los *flavivirus*. Son conocidas las propiedades anti-inflamatorias, anti-piréticas, hipoglicemiantes y anti-microbianas de *Azadirachta indica* (Sai, 2000; Udeinya, 1993) y extractos acuosos de esta planta pueden inhibir la replicación in vitro del virus DEN-2. La inhibición viral dependió de la dosis y el mayor efecto se obtuvo a concentración no citotóxica. Aún más, cuando el extracto se administró a ratones infectados con el virus se observó disminución de los síntomas y de las alteraciones patológicas (Parida, 2002). Extractos crudos de *Gymnogongrus griffithsiae* y *Cryptonemia crenulata* también fueron activos contra VDEN principalmente el serotipo 2 y ninguna de las fracciones mostró efecto citotóxico sobre células Vero (Talarico, 2005). De igual forma, tratamiento con polisulfatos de *Meristiella gelidium* redujo el título viral del mismo serotipo del virus a concentraciones no citotóxicas (Tischer, 2006) y presencia durante la adsorción viral de extracto acuoso de *Schizymenia binderi* resultó en fuerte actividad antiviral (Matsuhira, 2005). Se sugirió que la adsorción viral es el principal blanco de acción de polisulfatos y polisacáridos, principal componente de los extractos de esas plantas, ya que pueden interactuar con proteínas virales involucradas en la unión al receptor sobre la membrana de la célula huésped. Sin embargo, no se descarta que puedan tener poder inhibitorio sobre la replicación inmediatamente después de la adsorción (Tischer, 2006; Matsuhira, 2005; Talarico, 2005;).

Los polisacáridos y dentro de ellos los galactomananos son compuestos de los extractos de plantas que han mostrado la mayor actividad antiviral. Dicha actividad se ha relacionado con la presencia de grupos sulfatos cargados negativamente los cuales pueden inhibir la adsorción del virus a la célula huésped bloqueando la interacción entre la glicoproteína viral y los glicosaminoglicanos presentes en la superficie de la célula huésped. No obstante, estudios con el VIH sugieren que la inhibición también puede ocurrir después de la internalización viral (Gonzalez, 1987). Actividad antiviral de polisacáridos se ha reportado contra el VFA y VDEN, siendo 100 veces más activos contra el primero (Ono, 2003). La castanospermine es un alcaloide derivado de *Castanospermum australae* que actúa como inhibidor de la enzima glucosidasa y reduce la infección in vitro de VDEN y en menor proporción el VFA. Estudios de mecanismo de acción sugieren que puede interrumpir el procesamiento y maduración de proteínas virales en el retículo endoplásmico. Al parecer actúan modificando azúcares en las proteínas virales y esto resulta

en bloqueo de la secreción y posterior ensamblaje de la partícula viral (Whitby, 2005).

Extractos etanólicos originados de *Schefflera heptaphylla* y *Youngia japonica* mostraron actividad contra el VSR en etapas tempranas y tardías de la replicación, sugiriendo inactivación por acción directa sobre la envoltura viral e inhibición la formación de sincitios por interacción del compuesto con la proteína F del virus (Li, 2007; Ooi, 2006). Extractos metanólicos de *Acokantera schimperi* y *Euclea schimperi* cultivadas en Etiopia mostraron actividad antiviral contra virus Coxsackie e Influenza con igual eficacia, justificando el uso tradicional en el tratamiento de lesiones de piel de etiología viral (Gebre-Mariam, 2006).

Resveratrol, un compuesto encontrado en varias plantas inhibió la replicación del VHS-1 y 2 (Docherty, 1999). La reducción de título viral no se debió a interacción con la partícula viral ya que el mayor efecto se obtuvo al tratar el cultivo en la primera hora post infección. Se ha sugerido un amplio espectro de funciones biológicas del compuesto que pudieran explicar el efecto adverso sobre la proteína kinasa del virus. Esto resulta en la disminución de la expresión de proteínas tempranas necesarias para la replicación o reactivación de la latencia característica de los *herpesvirus*.

Extractos naturales de tipo polisacáridos han mostrado buena actividad luego de tratamiento de animales de laboratorio infectados con el VFA, VDEN y de la influenza. Extractos de *Mimosa scabrella* y *Leucaena leucophala* protegieron de los síntomas a 87 – 96% de los animales que se inocularon con VFA y VDEN (Ono, 2003). La administración de extractos de *Aphanothece halophytica* disminuyó el edema pulmonar y congestión en animales infectados con virus de la influenza. Administración oral del extracto aumentó la capacidad de los macrófagos para liberar citoquinas demostrando efecto inmunomodulatorio (Zheng, 2006).

2.4 ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE PLANTAS COLOMBIANAS

Los productos naturales son importantes en la medicina tradicional Colombiana y se cree que por lo menos 51,220 especies son usadas en el tratamiento de diversas dolencias (Cracraft & Grifo, 1999). Sin embargo, muy poca información documentada existe sobre la actividad antiviral y pocos reportes la confirman en modelos *in vitro* y ninguno *in vivo*. López y col. evaluaron la actividad antiviral sobre el virus de la poliomeilitis y VHS de extractos obtenidos a partir de 24 especies de plantas cultivadas en diferentes regiones y usadas para tratar infecciones cutáneas. No se detecto actividad contra poliovirus y muy pocas plantas fueron activas contra VHS. El extracto con mayor efecto antiviral fue el obtenido de *Byrsonina verbaseifolia* ya que solo se requirió 2.5 µg/ml para disminuir 50% el título viral. Otras especies como *Vismia macrophylla*, *Durala hirsuta*, *Iryanthera megistophylla* y *Myrteola nummulai* fueron activas a concentración superior de 5 µg/ml sin producir efecto tóxico sobre el cultivo celular (Lopez, 2001).

En otro estudio se evaluó la actividad anti-herpética y anti-cancérgena de 47 extractos obtenidos a partir de 10 especies de plantas pertenecientes al género *Euphorbia* (*E*) usadas en medicina tradicional para el tratamiento de úlceras en piel, cáncer y otras enfermedades. *E. tirucalli* y *E. cotinifolia* mostraron la mayor actividad contra VHS-2, seguido por *E. cestrifolia*, *E. heterophylla* y *E. cyatophora*. Para corroborar que la actividad antiviral no se debiera a la acción tóxica sobre el cultivo celular se realizaron ensayos de citotoxicidad y se calculó el índice de selectividad. *E. tirucalli* y *E. cotinifolia* mostraron los mayores índices de selectividad y al compararlos con ribavirina se concluyó que estos extractos mostraron actividad aceptable (Betancur-Galvis, 2002).

2.5 ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE COMPUESTOS SINTÉTICOS

La ribavirina es un análogo sintético de la guanosina que ha mostrado tener actividad contra el VFA y un gran número de virus RNA como el de Influenza, VSR, Fiebre de Lassa y Hantavirus (Leyssen, 2001). Actualmente es utilizada en aerosol para el tratamiento de infección respiratoria por VSR y oralmente en combinación con IFN-alfa como terapia contra infecciones crónicas por el VHC (Ishii, 2006). La actividad de ribavirina contra VFA reportada en diferentes estudios es variable. Poco o ningún efecto ha sido demostrado cuando se usó para tratamiento profiláctico en monos rhesus (Huggins, 1989) pero ha sido efectivo en ratones infectados cuando se administró por vía intraperitoneal (Sbrana, 2004). Su actividad *in vitro* ha mostrado resultados variables con actividades de EC₅₀ (concentración requerida para reducir 50% del efecto citopático) de 20 a 50 µg/ml (Leyssen, 2001; Crance, 2003; Ojwang, 2005).

La ribavirina es fosforilada por kinasas intracelulares y siendo así un potente inhibidor de la enzima monofosfato dehidrogenasa (IMPDH; EC 1.1.1.205) que convierte el IMP en xantina monofosfato (XMP), una etapa importante en la síntesis de novo de guanosina trifosfato (GTP). La disminución de XMP resulta en disminución de los depósitos del nucleótido guanosina inhibiendo la síntesis de DNA y RNA e inhibiendo indirectamente al virus ya que las enzimas virales competirán desventajosamente con las enzimas celulares (Markland, 2000).

Derivados de la ribavirina como el 5-monofosfato interfiere directamente con la síntesis de RNA polimerasa NS5 de los *flavivirus*, una 2-O-metiltransferasa (NS5MTaseDV) capaz de unirse a la molécula GTP del cap del RNA viral. Existe evidencia que la ribavirina 5-trifosfato inhibe la NS5MTaseDV compitiendo con el GTP (Benarroch, 2004). Ojwang y col. evaluaron la actividad antiviral sobre varios *flavivirus*, entre ellos VFA y VDENV, de un derivado de la ribavirina conocido como ZX-2401. El compuesto fue activo contra el VFA 3 veces comparado con la ribavirina e inhibió 100% la replicación del VDENV con mínimo de toxicidad celular. Sin embargo, no existen reportes que confirmen los resultados y el potencial antiviral del compuesto (Ojwang, 2005).

El ácido micofenólico (MPA) es el compuesto activo formado después de la administración del mofetil micofenolato. El MPA es un inhibidor enzimático no-nucleotídico y al igual que la ribavirina bloquea la síntesis de XMP disminuyendo las reservas de guanosina intracelular. Este medicamento ha sido utilizado como inmunosupresor en la prevención en rechazo de órganos transplantados (Lipsky, 1996). Ensayos in vitro han demostrado que tratamiento con MPA inhibe la infección de células con varios virus DNA y RNA por un mecanismo aun desconocido. El MPA bloqueó el efecto citopático del VFA en células de mono (Neyts, 1998) y disminuyó en 99% la infección por VDEN y la cantidad de virus secretado hasta un millón de veces (Diamond, 2002).

3. METODOLOGÍA

3.1 PLANTAS

Se incluyeron 10 especies aromáticas cultivadas en los departamentos de Santander, Nariño y Antioquia. La selección se realizó teniendo en cuenta que la planta perteneciera a familias con actividad antiviral reportada por otros autores, además del uso tradicional informado por personas de la comunidad. La Tabla 1 presenta detalles de las plantas.

Tabla 1. Plantas colombianas incluidas en el estudio

Nombre		Tejido usado	Uso (s) popular
Científico	En América		
<i>Artemisia sp</i>	Ajenjo, abrotano	Hoja	Contusiones, calambres musculares.
<i>Conyza sp.</i>	Carnicera	Todos	Síntomas respiratorios, gastritis, enfermedad gastrointestinal
<i>Cordia cylindrostachya</i>	Guascanegra	Hoja y fruto	Síntomas estomacales
<i>Lepechinia schiedeana</i>	Salvia negra	Todos	Antipirético, síntomas gastrointestinales
<i>Lippia alba</i>	Valeriana Hierva maestro	Todos	Expectorante, resfriado, diarrea.
<i>Lippia citriodora</i>	Hierbaluisa Verbena olorosa	Todos	Analgésico, anti-inflamatorio, enfermedad gastrointestinal
<i>Lippia origanoides</i>	Orégano de burro	Hoja y flor	Dolor de estómago, infección urinaria.
<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	Todos	Síntomas respiratorios, astenia.
<i>Rosmarinus oficínalis</i>	Romero	Todos	Anemia, epilepsia.
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomillo	Todos	Resfriados, enfermedad gastrointestinal

3.2 EXTRACTOS DE ACEITES

Fueron obtenidos en el Laboratorio de cromatografía, Escuela de Química, UIS, como uno de los productos del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM). Para la extracción se usó la Hidrodestilación asistida por radiación de microondas para unos e Hidrodestilación industrial para otros (Registro CENIVAM, comunicación personal). Las suspensiones fueron remitidas al CINTROP como un preparado líquido en frascos individuales. En el laboratorio se usaron alícuotas de 50 μ l almacenadas en frascos ámbar a temperatura ambiente como solución stock para los ensayos de citotoxicidad y actividad antiviral. A cada aceite, la Coordinadora del Laboratorio de Quimioterapia le asignó un código con el que se identificó durante el desarrollo de los ensayos y el análisis de datos. El nombre de la planta correspondiente al código se conoció después del análisis de los datos obtenidos en los experimentos.

3.3 CÉLULA

Se usó la línea epitelial Vero (riñón de mono verde africano) obtenida del Laboratorio de Arbovirus, CINTROP, UIS. Las células fueron mantenidas a 37°C. en atmósfera con 5% de CO₂ en frascos plásticos de 75 cm² con medio mínimo esencial 199 (M-199, Sigma-Aldrich) con 10% de suero bovino fetal.

3.4 VIRUS

Cepa vacunal YF 17DD donada por la Secretaria Departamental de Santander. Este virus se usó por su bajo riesgo biológico y porque se replica fácilmente en las condiciones del laboratorio. El mantenimiento se realizó en cultivo celular de la siguiente forma: monocapas de células Vero en caja de 25 cm² de 48 h de crecimiento en medio M199 - SBF 10% fueron infectadas con el virus e incubadas por 3 días a 37°C; CO₂ 5%. Al término, el medio se colectó y fue usado para infectar una nueva monocapa celular y el procedimiento se realizó tres veces consecutivas. El sobrenadante del cuarto cultivo se colectó y se distribuyó en tubos eppendorf que fueron almacenados a -70°C hasta la posterior cuantificación de título viral como se describe adelante.

3.5 CUANTIFICACIÓN DEL VIRUS

Por el método de plaqueo siguiendo el procedimiento rutinario del laboratorio (Ocazionez, 2006). Brevemente, 200 μ l de diluciones seriadas (10^{-1} hasta 10^{-6}) de sobrenadantes de los cultivos se adicionaron a monocapas de células Vero cultivadas en cajas de 24 pozos por 1 h a 37°C y al término el virus no adsorbido fue retirado mediante lavados con tampón fosfato (PBS). Las células fueron cubiertas con medio de plaqueo (62.5% de M-199; 6% de SBF; 31.5% de carboxi-metil-celulosa) e incubadas 6 días a 37°C; CO₂ 5%. cuando se fijaron con formol y se colorearon con cristal violeta para visualizar las placas virales. La concentración de virus o título viral expresado en unidades formadoras de

placa por ml (UFP / ml) se calculó así: promedio de placas en el pozo x dilución mayor a la que se contaron x 10 (conversión a ml).

3.6 REPLICACIÓN DEL VIRUS

Monocapas de células Vero en cajas de 24 pozos fueron contaminadas a diferente multiplicidad de infección o proporción virus:célula (MOI 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 0.5 y 1) por 1 h a 37°C. Luego de lavados con PBS se adicionó el medio de cultivo (M-199; SBF 2%) y las cajas se incubaron a 37°C; CO₂ 5%. Diariamente durante 5 días post infección se recolectó el sobrenadante para determinar el título viral por plaqueo. Los datos (UFP / ml) fueron graficados contra días de infección para determinar el MOI que en el menor tiempo produjo en el mayor título viral. Estas condiciones fueron las usadas en los ensayos de actividad antiviral.

3.7 CITOTOXICIDAD

Antes de realizar los ensayos de actividad antiviral se determinó el efecto citotóxico de los extractos de aceites. Células Vero cultivadas en cajas de 96 pozos por 24 h a 37°C en medio M-199; SBF 10% fueron tratadas o no con concentraciones crecientes (3.7, 11.1, 33.3 y 100 µg/mL) de cada extracto diluido en di-metil-sulfoxido y medio. Se incluyó ribavirina (1-beta-D-ribofuranosyl-1H-1,2,4-triazole-3-carboximide; SIGMA) como antiviral de referencia. A las 72 h de exposición a los compuestos se determinó la viabilidad celular usando el método de MTT o [3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5-tetrazolium diphenylbromide] con algunas modificaciones (Hussain, 1993). Brevemente, las células se incubaron con 10 µl de MTT (5 mg/ml) por 4 h a 37°C cuando el sobrenadante se removió y se adicionó 100 µl de DMSO a cada pozo para solubilizar los cristales de formazan. Inmediatamente las cajas fueron agitadas vigorosamente y la intensidad del color se determinó por espectrofotometría a 580 nm. Cuanto mayor el valor de la densidad óptica mayor la viabilidad del cultivo. El efecto citotóxico o CC₅₀ se expresó como la concentración mínima del compuesto que disminuyó 50% la viabilidad celular con respecto al control (células sin tratamiento) calculada por regresión lineal usando el programa xl-fit. Cada compuesto se evaluó por triplicado en tres experimentos independientes. Los extractos de aceites con valores de CC₅₀ < 80 µg/ml se consideraron tóxicos para células de mamífero y no fueron incluidos en los ensayos antivirales.

3.8 EFECTO ANTIVIRAL

Cada aceite se evaluó por duplicado simultáneamente con los otros y en algunos casos con ribavirina en 2 experimentos independientes. Se usaron los siguientes protocolos de tratamiento:

3.8.1 Tratamiento A o antes de la infección. El virus se incubó 24 h a 4°C con variadas concentraciones del extracto (3.7, 11.1, 33.3 y 100 µg/mL) o con

medio de cultivo y la mezcla se usó para infectar células Vero como se describió arriba.

3.8.2 Tratamiento B o antes y después de la infección. El virus incubado previamente con el extracto como se describió en el tratamiento A se adicionó a monocapas de células Vero que se mantuvieron en medio M-199; SBF 2% suplementado con las concentraciones de extracto o ribavirina descritas arriba. El segundo se incluyó solamente en este procedimiento debido a que el medicamento actúa en etapas posteriores a la infección celular (Leyssen, 2001).

3.8.3 Tratamiento C o de la célula. El extracto a las concentraciones descritas arriba se adicionó a monocapas de células Vero crecidas en cajas de 24 pozos que se incubaron 24 h a 37°C; CO₂ 5%. Al término los cultivos se lavaron con PBS y se infectaron con el virus.

Independiente del tratamiento, las cajas de cultivos infectados con el virus se incubaron 48 h a 37°C; CO₂ 5%. cuando se cosechó el sobrenadante y almacenó a -70°C hasta completar todos los experimentos, para luego procesarlos por plaqueo para conocer el título viral como se describió arriba. Se consideró actividad antiviral cuando se detectó disminución significativa del título viral (UFP/mL) en el cultivo tratado con respecto al no tratado.

3.9 ANÁLISIS DE DATOS

La exploración visual mediante un histograma permitió considerar una distribución normal de los datos. La actividad antiviral se determinó teniendo en cuenta la relación de protocolo de tratamiento, tipo de aceite y concentración en la reducción del título viral mediante análisis multivariado. El título viral promedio de los tratamientos se compararon entre si y con el control sin tratamiento por ANOVA de 1 y 2 vías. Se usaron los paquetes estadísticos STATA 8.0 y SSPS 13.0.

4. RESULTADOS

4.1 CITOTOXICIDAD

De diez extractos evaluados seis fueron tóxicos para células transformadas de mamífero (línea Vero) con valores de CC_{50} entre 16 – 47 $\mu\text{g/ml}$. El de mayor actividad fue de *Conyza sp.* seguido por *L. citrodora*, *C. cylindrostachya*, *R. officinalis*, *L. shiedeana* y *T. vulgaris*. Los otros cuatro mostraron valores de $CC_{50} > 80 \mu\text{g/ml}$ y por lo mismo se consideraron no citotóxicos, el de menor actividad fue *O. vulgare*, seguido por *Artemisia sp.*, *L. origanoides* y *L. alba* (Tabla 2). Cuando la actividad citotóxica en términos de porcentaje de viabilidad de los extractos menos activos se comparó con la ribavirina, con ninguno se observó diferencia a concentración de 3.3, 11.1 y 33 $\mu\text{g/ml}$. No obstante, todos resultaron más citotóxicos que la ribavirina a 100 $\mu\text{g/ml}$ a excepción *O. vulgare* (Figura 1). En los ensayos de actividad antiviral se incluyeron los extractos de aceites no citotóxicos.

Tabla 2. Efecto tóxico sobre células Vero de extractos de aceites esenciales obtenidos de plantas colombianas.

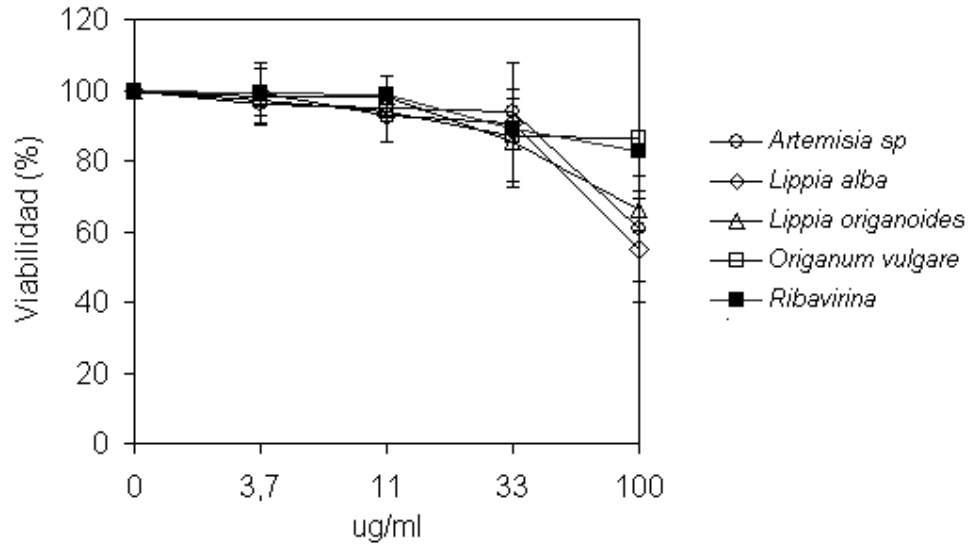
Planta	$CC_{50} (\mu\text{g} / \text{ml})^{\ddagger}$			Promedio
	Exp.1	Exp.2	Exp.3	
<i>Conyza sp</i>	11.5	20.5	*	16 ± 6.3
<i>Lippia citrodora</i>	24.3	23.1	*	23.7 ± 0.8
<i>Cordia cylindrostachya</i>	29.6	26.2	25.4	27.9 ± 2.4
<i>Rosmarinus officinalis</i>	35.1	24.8	32.8	30.8 ± 5.4
<i>Lepechinia schiedeana</i>	28.1	57.5	37.5	41 ± 14.9
<i>Thymus vulgaris</i>	48.1	46.3	*	47.2 ± 1.2
<i>Lippia alba</i>	70.3	> 100	84.1	84.8 ± 14.8
<i>Lippia origanoides</i>	100	93.3	100	97.7 ± 3.8
<i>Artemisia sp</i>	> 100	*	95.7	97.9 ± 2.9
<i>Origanum vulgare</i>	> 100	> 100	95.1	98.3 ± 2.8

*: no determinado. †: concentración que disminuyó 50% la viabilidad celular (ver detalles en metodología). $CC_{50} \leq 80 \mu\text{g/ml}$ citotoxicidad significativa. Exp.: experimento.

4.2 REPLICACIÓN DEL VIRUS

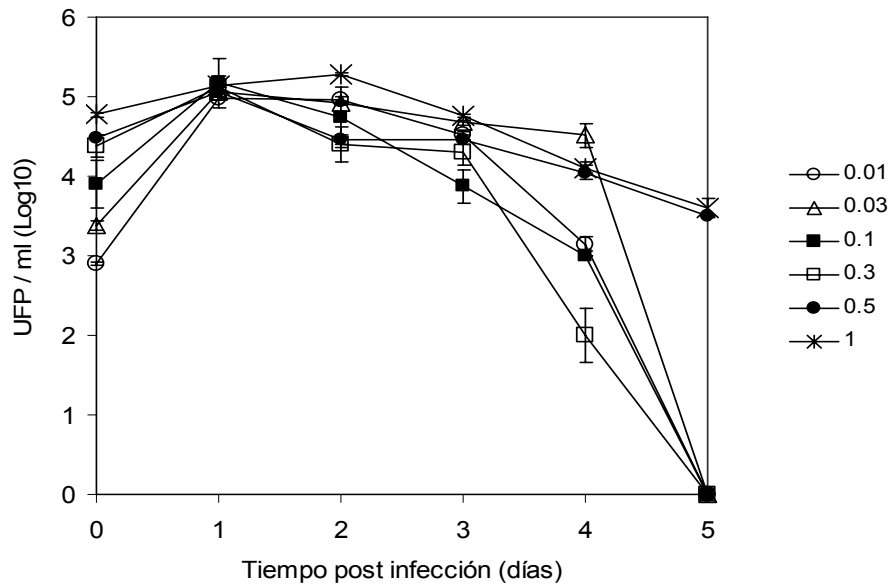
El título viral (UFP/ml) de los cultivos infectados con el virus en ausencia de extracto de aceites o ribavirina dependió del MOI y del tiempo de incubación. Con cualquier MOI el título viral se incrementó 24 h después de la infección y la mayor productividad se obtuvo a las 24. Sin embargo, con MOI de 1 se consiguió el mayor título viral (1.9×10^5 UFP / mL) 2 días después de la infección y la productividad viral se mantuvo hasta el día 5 lo que no sucedió con $\text{MOI} \leq 0.5$. Cuando se usó MOI entre 0.01 - 0.3 el título viral disminuyó a partir del 3º. día llegando a 0 en el 5º (Figura 2). Teniendo en cuenta estos resultados, los ensayos de actividad antiviral se hicieron con MOI de 1 cosechando el sobrenadante 48 h post infección.

Figura 1. Comparación de la viabilidad de cultivos de células Vero tratados con aceites esenciales de plantas colombianas y Ribavirina



* % Viabilidad (MTT) = DO no tratado / DO tratado x 100. Promedio de tres experimentos independientes

Figura 2. Título viral (UFP/mL) diario en cultivos de células Vero infectados con virus de la fiebre amarilla (YF-17DD) en relación con el MOI

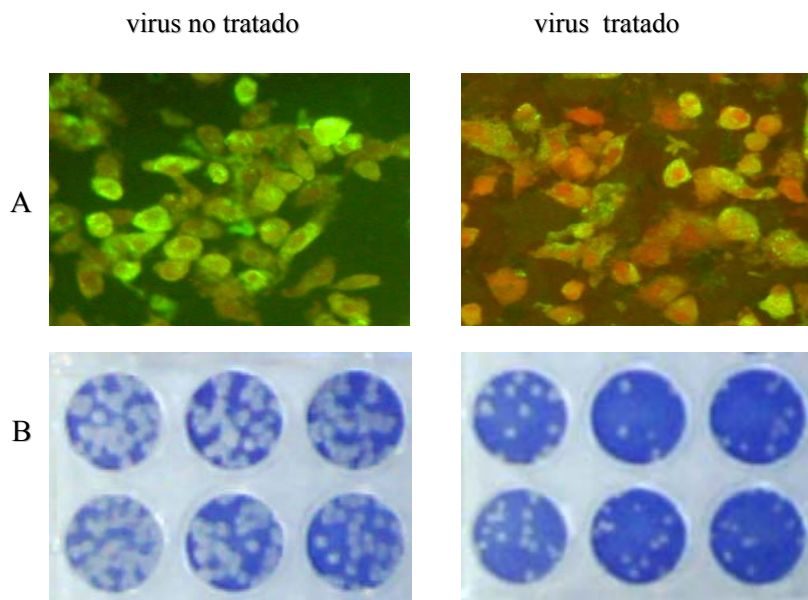


*Promedio de dos experimentos independientes, los valores se encuentran en escala logarítmica (Log₁₀).

4.3 EFECTO ANTIVIRAL

El efecto antiviral fue aparente al observar disminución notoria de proteína viral intracelular por inmunofluorescencia con anticuerpo policlonal y del número de placas virales cuando el sobrenadante del cultivo se procesó para cuantificación del virus por plaqueo (Figura 3).

Figura 3. Efecto antiviral aparente sobre el virus de la fiebre amarilla (YF-17DD) por tratamiento con extracto de aceites esenciales de plantas colombianas.



A: resultado de la inmunofluorescencia para detectar proteína viral intracelular, rojo es ausencia de infección viral. B: disminución del número de placas de infección (puntos claros).

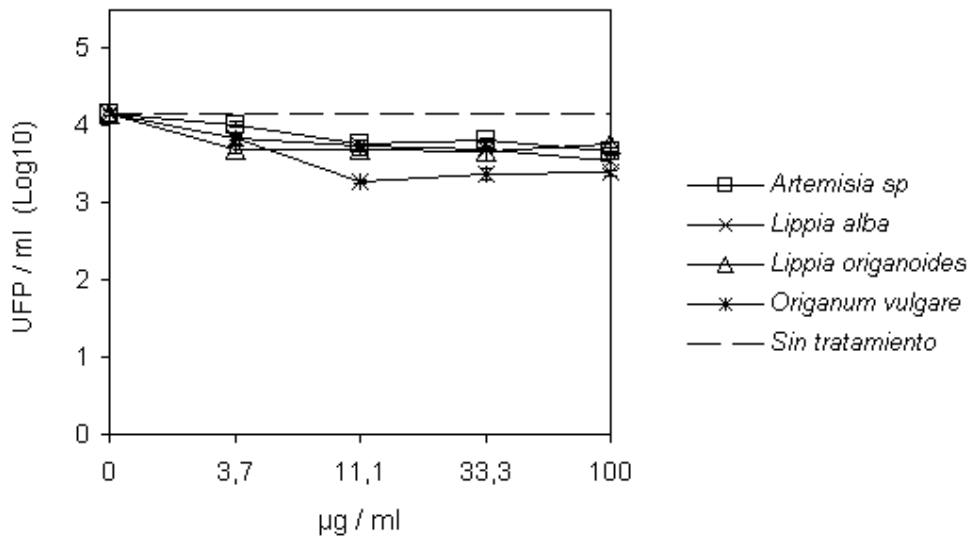
4.3.1 Tratamiento A. La incubación del virus con cualquier extracto antes de la infección celular resultó en disminución significativa del título viral a concentración $\geq 11.1 \mu\text{ml}$ ($P < 0.05$), desde 3 hasta 7.4 veces según el tipo de planta. No hubo incremento del efecto antiviral en relación con la concentración del extracto con ninguno de ellos ($P > ,0.05$ regresión múltiple). La mayor actividad antiviral se observó con *O. vulgare* a concentración de $11.1 \mu\text{ml}$ con reducción del título viral de 13.9×10^3 (control) hasta 1.8×10^3 UFP/ml, seguido por *L. origanoides*, *L. alba* y *Artemisia sp*, de 5.5 a 3.2×10^3 UFP/ml (Figura 4).

4.3.2 Tratamiento B. La adición del extracto o ribavirina al sobrenadante de cultivos infectados con el virus previamente expuesto al aceite incrementó significativamente el efecto antiviral dependiendo de la dosis ($P < 0.005$, regresión múltiple). El mayor efecto se observó con *L. origanoides* seguido por *O. vulgare*, *L. alba* y *Artemisia sp*. El tratamiento con *L. origanoides* a concentración de $11.1 \mu\text{g/ml}$ disminuyó el título viral por debajo del límite de detección del ensayo de plaqueo ya que placas de infección no se obtuvieron del sobrenadante de los cultivos tratados. *Artemisia sp*, *L. alba* y *O. vulgare*

necesitaron la mayor concentración (100 µg/mL) para producir el mismo efecto que *L. origanoides*. (Figura 5). Al comparar el efecto antiviral de los extractos de aceites con el de ribavirina, los de *O. vulgare* y *L. origanoides* fueron más activos, con reducción de 2,600 y 5.1 veces el título viral, respectivamente ($P < 0.0001$, ANOVA) y con los otros no hubo diferencias (Tabla 3).

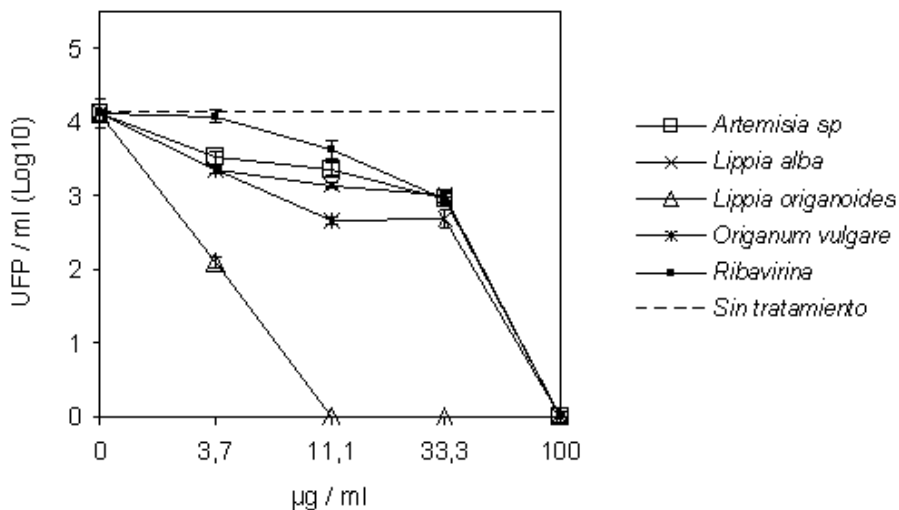
4.3.3 Tratamiento C. La exposición de células Vero a cualquier concentración del extracto de aceite antes de la infección con el virus no produjo disminución significativa del título viral 48 h después: 9.6 a 5×10^4 UFP/ml comparado con $10,9 \times 10^4$ del control ($P > 0.05$, regresión múltiple) (Figura 6). Este resultado respalda el efecto antiviral de los extractos de aceites descrito arriba.

Figura 4. Efecto antiviral sobre la replicación del virus de la fiebre amarilla (YF-17DD) de extractos de aceites esenciales de plantas colombianas – Tratamiento A.



* Ver detalles del tratamiento en metodología. Los datos representan el promedio de dos experimentos independiente. $P < 0.05$ (regresión múltiple, $F = 59.19$, $R^2 = 0.84$) al comparar entre sí el título viral con cada concentración del compuesto con respecto al control.

Figura 5. Efecto antiviral sobre la replicación del virus de la fiebre amarilla (YF-17DD) de extractos de aceites esenciales de plantas colombianas – Tratamiento B.



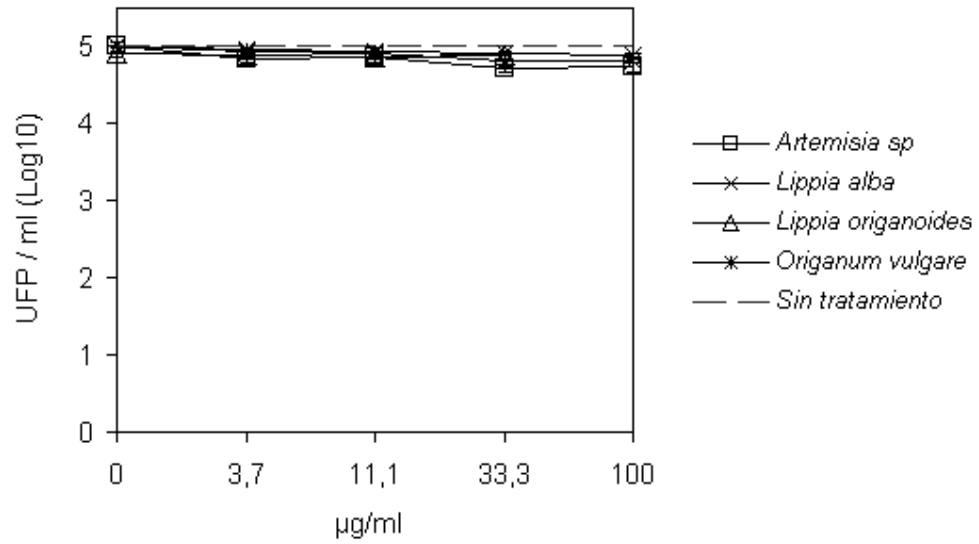
* Ver detalles del tratamiento en metodología. Los datos representan el promedio de dos experimentos independiente. $P < 0.05$ (regresión múltiple, $F = 59.19$, $R^2 = 0.84$) al comparar entre sí el título viral con cada concentración del compuesto con respecto al control.

Tabla 3. Efecto antiviral sobre el virus de la fiebre amarilla (YF-17DD) de aceites esenciales de plantas colombianas según tratamiento y comparado con Ribavirina.

Compuesto*	Título viral (UFP/mL) x 10 ³ / Factor [†]	
	Tratamiento A	Tratamiento B [‡]
Extracto de: <i>Artemisia sp</i>	6.0 / 4.7	2.1 / 6.0
<i>L. alba</i>	5.6 / 4.4	1.4 / 9.0
<i>L. organoides</i>	4.6 / 3.0	0 / 13 300
<i>O. vulgare</i>	1.8 / 7.4	0.4 / 29.5
Ribavirina	-	2.6 / 5.1
Ninguno	13.9 x 10 ³ / -	13.3 / -

*: 11.1 µg/mL. †: Título sin tratamiento / título del tratado. Los datos representan el promedio de dos experimentos independientes por tratamiento (detalles en metodología). ‡: $p > 0.05$ (ANOVA, $F < 0.05$) *Artemisia sp.* o *L. alba* vs Ribavirina, pero no con los otros

Figura 6. Efecto antiviral sobre la replicación del virus de la fiebre amarilla (YF-17DD) de extractos de aceites esenciales de plantas colombianas – Tratamiento C.



* Ver detalles del tratamiento en metodología. Los datos representan el promedio de dos experimentos independiente. $P > 0.05$ (regresión múltiple, $F = 59.19$, $R^2 = 0.84$) al comparar entre sí el título viral con cada concentración del compuesto con respecto al control.

5. DISCUSIÓN

Existen numerosas publicaciones que describen el efecto antiviral *in vitro* de productos naturales usados en medicina tradicional. Sin embargo, los resultados son difíciles de comparar debido al uso de diversas metodologías que evalúan compuestos de diferente naturaleza con múltiples criterios para definir la actividad antiviral. En este estudio se demostró actividad antiviral de aceites esenciales extraídos de plantas colombianas sobre la cepa vacunal del VFA (YF-17DD). No se pudo conocer si este efecto podría variar con el virus silvestre ya que aislados primarios de pacientes no fueron disponibles. Es altamente probable que el resultado sea igual por lo menos en lo que se refiere a la interacción del extracto con la envoltura externa del virus, ya que al comparar la glicoproteína E de ambas cepas los cambios que se observan no son significativos (Schlesinger, 1984).

Cuando el VFA se expuso al extracto antes de la adsorción a la monocapa celular (tratamiento A), el título viral en el cultivo disminuyó significativamente hasta 8 veces con respecto al control (Figura 4). Evidencias de efecto antiviral sobre el mismo virus por aceites esenciales no han sido documentadas, pero sí para otro miembro del género *flavivirus*. García y col. observaron efecto leve en la infectividad del VDEN cuando se trató con aceite de *Artemisia douglasiana* con disminución en 50% del título viral en presencia de 60 µg/ml (García, 2003). Mayor actividad antiviral se han reportado con otros virus envueltos como el virus Junin y el VHS. Con el primero, la incubación con *Lippia turbinata*, *Buddleja cordobensis* y *Heterothalamus alienus* causó disminución en 50% de título viral con 14, 39 y 44.2 µg/ml, respectivamente (García, 2003; Duschatzky, 2005) El VHS ha mostrado sensibilidad al tratamiento con *Cymbopogon citratus* y *Malaleuca alternifolia* entre otros (Minami, 2003).

Mayor efecto antiviral se observó cuando la replicación del virus previamente tratado se llevó a cabo en presencia en el medio de cultivo de bajas concentraciones de cada uno de los extractos (tratamiento B) (Figura 5). Efecto similar se demostró para *Salvia fruticosa*, el tratamiento durante 24 horas con 0.06% del aceite inhibió 100% la replicación del VHS (Armaka, 1999). Hasta el momento no se ha reportado disminución de la replicación viral al tratarse cultivos infectados con *flavivirus*.

El tratamiento de la célula con los extractos evaluados no tuvo impacto en la productividad de los cultivos infectados con el virus, esto es, el título viral en el sobrenadante no se diferenció con el control (Figura 6). Este resultado concuerda con la baja citotoxicidad detectada en los ensayos (Tabla 2) y lo mismo ha sido reportado por otros cuando tratan la célula antes de la infección con el virus (Li, 2005; Kuo, 2002). Este resultado soporta el concepto que los aceites evaluados en el estudio tuvieron acción directa sobre el virus en términos de interacción con la envoltura viral e inhibición de las etapas de replicación dentro del interior de la célula.

De todos los aceites analizados el de *Origanum. vulgare* (oregano) fue el más activo antes de la adsorción del virus y el de *Lippia origanoides* (orégano de burro) durante la replicación. Este es el primer reporte que demuestra efecto antiviral de las dos plantas. Los extractos de *O. vulgare* se habían identificado previamente como anti-oxidante, inhibidor de lipoxigenasa, anti-hiperglicemiante, anti-carcinógeno, bactericida, antifúngico y antiparasitario (Kulisic, 2007; Koukoulitsa, 2007; Santoro, 2007; Oukoulitsa, 2006). Sokmen y col. evaluaron la actividad frente al VHS de aceites esenciales y extractos metanólicos extraídos de otra especie de la planta (*O. acutidens*) sin encontrar actividad significativa a pesar que el virus también posee envoltura (Sokmen, 2004). No existe documentación acerca de la actividad antiviral de *L. origanoides* pero las especies *junelliana*, *turbinata* y *alba* han sido activos contra al VHS (Andrighetti-Frohner, 2005; García, 2003).

Los extractos de *Artemisia* y *L. alba* fueron los menos activos sobre el VFA por cualquiera de los tratamientos evaluados (Figura 4,5). Efecto moderado (reducción del 50%) ha sido reportado por otros autores para *Artemisia* cuando VDEN, Junin y VHS que se trataron con 60, 250 y 83 µg/ml (García, 2003). No hay reportes de actividad contra VFA u otros *flavivirus* con aceites esenciales obtenidos de *Lippia alba*, pero se demostró inhibición 50% de la replicación del VHS por tratamiento con extractos metanólicos originados de la misma planta (Andrighetti-Frohner, 2005).

El mecanismo de acción antiviral de los aceites esenciales no está claro y aunque en este estudio no se realizaron experimentos para evaluarlos, los resultados constituyen evidencia de algunos. No obstante, el análisis es limitado considerando que no se cuenta con información acerca de los componentes químicos de ninguno de los extractos. La disminución de la productividad de los cultivos por exposición directa del virus al aceite podría explicarse por interacción del mismo con la envoltura viral inactivando o enmascarando moléculas necesarias para la adsorción o internalización en célula hospedera. García et al reportó inactivación del virus Junin al observar disminución de más del 80% de infectividad por tratamiento durante una hora y media con 250 µg/ml de *Lippia junelliana*, menor efecto fue obtenido de la misma forma para VDEN con *Artemisia douglasiana* (García, 2003). En otro estudio, Duschatzky y col no pudieron demostrar que tratamiento con 100 µg/ml de *Buddleja cordobensis* y *Heterothalamus alienus* disminuyera la unión a células del virus Junin usando marcación con S^{35} a pesar de observar disminución del título viral. Los autores propusieron que la interacción del virus con el aceite afectó moléculas que controlan la internalización y no la adsorción viral (Duschatzky, 2005).

Como se muestra en la Tabla 3, el extracto de *Lippia origanoides* fue el más activo principalmente cuando se adicionó al cultivo (tratamiento B). Bajo esa circunstancia, se podría asumir que el extracto actúa en eventos intracelulares de la replicación viral, inhibiendo enzimas necesarias para replicación del genoma o procesos de la morfogénesis como la glicosilación de proteínas y el ensamblaje. Un hallazgo que soporta este supuesto es que cuando el virus se

expuso directamente al aceite la disminución del título viral fue 3 veces comparado con 13300 veces cuando se adicionó al sobrenadante del cultivo. Hasta el momento se ha reportado efecto a este nivel para isoborneol, un componente del aceite esencial de *Salvia fruticosa*. Armaka y col demostraron que tratamiento con 0.06% de isoborneol completamente inhibió la aparición de la proteína glicosilada gB del VHS en células infectadas y tratadas durante 24 horas (Armaka, 1999). Por otra parte, Allahverdiyev y col sugirieron que la actividad de *Melissa officinalis* sobre el VHS se podría asociar a inhibición de la síntesis de proteínas aunque dicha hipótesis no ha sido confirmada (Allahverdiyev, 2004).

Un hallazgo que merece resaltarse es que la actividad antiviral de dos de los cuatro aceites resultó mejor comparada con la ribavirina en especial por tratamiento B con *Lippia origanoides* a bajas concentraciones (Tabla 3). Esto sugiere que el aceite esencial puede tener mayor potencial inhibitorio bloqueando varias etapas de la síntesis viral. Esta propiedad lo coloca como un buen candidato que podría igualmente inhibir otros virus RNA con o sin envoltura. Es necesario primero evaluar la actividad antiviral de cada componente del aceite, teniendo en cuenta que el sinergismo con otros compuestos puede aumentar la actividad contra el virus (Allahverdiyev, 2004).

La evaluación de la actividad antiviral *in vitro* tiene limitaciones y los resultados pueden variar dependiendo de las condiciones del ensayo. En este estudio se usaron células transformadas de riñón de mono (Vero) que no son el huésped natural para el virus. No obstante, la susceptibilidad de estas células a la infección del VFA es ampliamente conocida y demostrada, razón por la que se usan de rutina en laboratorios donde se investigan *flavivirus* (Chen, 1996b). No obstante, es necesario confirmar si el efecto antiviral se observa con cultivos primarios de macrófagos, la célula blanco en el infectado, ya que el virus puede interactuar de manera distinta sobre la membrana celular por la presencia de receptores diferentes. Otro parámetro que determina el resultado de los ensayos *in vitro* es la proporción de virus con respecto al número de células en el cultivo que se emplea para infectar. Cuando se usan concentraciones muy bajas se favorece el efecto antiviral porque la productividad del cultivo puede ser muy poca para detectarla haciendo mas notoria la diferencia con el control. En este trabajo se usó la proporción mayor (MOI = 1) que aseguró la mayor producción de virus y aún bajo estas condiciones se detectó actividad antiviral. No obstante, se observó inactivación del virus solamente por la incubación a 4°C durante las 24 horas de exposición con el aceite. En la preparación incubada bajo estas condiciones y no tratada se disminuyó 10 veces el título viral (resultado no mostrado).

De los 10 extractos incluidos en el estudio *Conyza sp*, *Cordia cylindrostachya*, *Lepechinia schiedeana*, *Lippia citrodora*, *Rosmarinus oficinalis* y *Thymus vulgaris* fueron tóxicos para células inmortalizadas de mamífero. Estos resultados sugieren que algunos de los componentes de los extractos pueden tener actividad antitumoral. Este efecto ha sido reportado con líneas celulares originadas de tejido tumoral como K-562, HL-60 y S180 luego del tratamiento

con *Youngia japonica*, una planta que pertenece a la misma familia de *Conyza sp.* como la incluida en el estudio (Ooi, 2006). Galvis y col evaluaron la actividad biológica de extractos obtenidos a partir de diferentes especies de *Euphorbia* cultivadas en Colombia. Seis extractos de cuatro plantas mostraron actividad anti tumoral demostrada en células HEP-2 y CHO en mayor magnitud con extracto de *E. cotinifolia* (Betancur-Galvis, 2002).

Los resultados de este estudio confirman la actividad antiviral de productos naturales y por primera vez se identifican plantas cultivadas en Colombia que pueden ser fuente de medicamentos contra la FA. Para que la contribución a la búsqueda de antivirales sea mayor es necesario continuar con los estudios evaluando in vitro los componentes del extracto de aceites y confirmando el resultado en ratones BALB/c el modelo animal que se usa para investigación con *flavivirus*.

6. CONCLUSIONES

Aceites esenciales extraídos de plantas Colombianas como *Artemisia sp*, *Lippia alba*, *Lippia organoides* y *Origanum vulgare* contienen compuestos que inhibieron significativamente la replicación in vitro del virus de la fiebre amarilla que pueden ser explorados para la fabricación de un medicamento

El extracto de aceites esenciales de la planta Colombiana *Lippia organoides* conocida popularmente como orégano de burro inhibe la replicación del VFA de manera más eficaz que la Ribavirina probablemente por bloqueo de más de una de las etapas del ciclo.

Aceites esenciales extraídos de plantas Colombianas como *Conyza sp*, *Cordia cylindrostachya*, *Lepechinia schiedeana*, *Lippia citrodora*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* inhibieron la viabilidad de células transformadas de mamífero, siendo potenciales candidatos para explorar la actividad contra tumores y cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

Andrighetti-Frohner CR, Sincero TC, da Silva AC, Savi LA, Gaido CM, Bettega JM y col. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. *Fitoterapia* 2005; 76:374-378

Allahverdiyev A, Duran N, Ozguven M, Koltas S. Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes simplex virus type-2. *Phytomedicine* 2004; 11:657-661

Armaka M, Papanikolau M, Sivropoulou A, Arsenakis A. Antiviral properties of isoborneol, a potent inhibitor of herpes simplex virus type 1. *Antiviral research* 1999; 43:79-92

Barrata, MDS, Dorman HJK, Dean SG, Figueiredo AC, Barroso JG, Ruberto G. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *Journal of Essential Oil Research* 1998; 69:618-627

Benarroch D, Egloff MP, Mulard L, Guerreiro C, Romette JL, Canard B. A structural basis for the inhibition of the NS5 dengue virus mRNA 2'-O-methyltransferase domain by ribavirin 5'-triphosphate. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279:35638-35643

Benencia F, Courreges MC. Antiviral activity of sandalwood oil against herpes simplex viruses-1 and -2. *Phytomedicine* 1999; 6:119-123

Bernal H, Correa J. *Especies Vegetales Promisorias de los Países del Convenio Andrés Bello*. Tomo VII, Secretaria Ejecutiva del Convenio Andrés Bello, Talleres de Editora Guadalupe Ltda, Bogotá, 440 pp

Betancur-Galvis LA, Morales GE, Forero JE, Roldan J. Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the *Euphorbia* genus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2002; 97:541-546

Chambers J, Hahn C, Galler R, et al. *Flavivirus* genome organization, expression and replication. *Annual Review of Microbiology* 1990; 44:649-688

Chen Y, Maguire T, and Marks, RM. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *Journal of Virology* 1996b; 70:8765-8772

Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca aternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 2000; 88:170-175

Cracraft J, Grifo FT. The living planet in crisis. In: Teachings of an Indian Sage from the Colombian Amazon. Themis Books, Foxhole, Dartington, Devon 1996; p267

Crance JM, Scaramozzino N, Jouan A, Garin D. Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. Antiviral Research 2003; 58:73-79

Critchfield JW, Butera ST, Folks TM. Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. AIDS Research and Human Retroviruses 1996; 12:39-46

Curreli F, Friedman-Kien A, Flore O. Glycyrrhizic acid alters Kaposi sarcoma-associated herpesvirus latency, triggering p53-mediated apoptosis in transformed B lymphocytes. The Journal of Clinical Investigation 2005; 115:642-652

De Logu A, Loy G, Pellerano ML, Bonsignore L, Schivo ML. Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by *Santolina insularis* essential oil. Antiviral Research 2000; 48:177-185

Dhiman R, Chawla Y. Herbal medicines for liver diseases. Digestive Diseases and Sciences 2005; 50:1807-1812

Diamond MS, Zachariah M, Harris E. Mycophenolic acid inhibits dengue virus infection by preventing replication of viral RNA. Virology 2002; 304:211-221

Docherty JJ, Fu MM, Stiffler BS, Limperos RJ, Pokabla CM, DeLucia AL. Resveratrol inhibition of herpes simplex virus replication. Antiviral Research 1999; 43:145-155

Duschatzky CB, Possetto ML, Talarico LB, Garcia CC, Michis F, et al. Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants. Antiviral Chemistry and Chemotherapy 2005; 16:247-251

Garcia CC, Talarico L, Almeida N, Colombres S, Duschatzky C, Damonte EB. Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis, Argentina. Phytotherapy Research 2003; 17:1073-1075

Gebre-Mariam T, Neubert R, Schmidt PC, Wutzler P, Schmidtke M. Antiviral activities of some Ethiopian medicinal plants used for the treatment of dermatological disorders. Journal of Ethnopharmacology 2006; 104:182-187

Gonzalez ME, Alarcón B, Carrasco L. Polysaccharides as antiviral agents: antiviral activity of carragean. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1987; 31:1388-1393

Gulluce M, Sokmen J, Dafarera D, Agar G, Ozkan H, et al. The in vitro antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and metanol extracts of herbal parts and callus cultures of hortensis L.J.Agric. Food Chemistry 2003; 51: 3958-3965

Hayashi K, Hayashi T, Otsuka H, Takeda Y. Antiviral activity of 5,6,7-trimethoxyflavone and its potentiation of the antiherpes activity of acyclovir. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 1997; 39:821-824

Heinz FX, Collett MS, Purcell RH, Gould EA, Howard CR & Houghton M. Family Flaviviridae. In: Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (eds MH Van Regenmortel, CM Fauquet, DH Bishop, EB Carstens, MK Estes, SM Lemon et al.) 2000. Academic Press, San Diego, Calif, pp. 859-878.

Huggins JW. Prospects for treatment of viral hemorrhagic fevers with ribavirin, a broad spectrum antiviral drug. Reviews of Infection Diseases 1989; 11:S750-S761

Hussain R.F, Nouri A.M.E, Oliver R.T.D. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. Journal of Immunology Methods. 1993; 160: 89 – 96

Ishii K, Sumino Y, Shinohara M, Higami K, Matsumaru K, Fujita Y, et al. Early immune-mediated response to ribavirin combined with INF in patients with chronic hepatitis C. Hepatology research 2006; 34:15-22

Jassim SA, Naji MA. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. Journal of Applied Microbiology 2003; 95:412-427

Julander JG, Furuta Y, Shafer K, Sidwell RW. Activity of T-1106 in a hamster model of yellow Fever virus infection. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2007; 51:1962-1966

Julander JG, Morrey JD, Blatt LM, Shafer K, Sidwell RW. Comparison of the inhibitory effects of interferon alfacon-1 and ribavirin on yellow fever virus infection in a hamster model. Antiviral Research 2007; 73:140-146

Koukoulitsa C, Hadjipavlou-Litina D, Geromichalos GD, Skaltsa H. Inhibitory effect on soybean lipoxygenase and docking studies of some secondary metabolites, isolated from *Origanum vulgare* L. ssp. hirtum. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry 2007; 22:99-104

Kulisic T, Krisko A, Dragovic-Uzelac V, Milos M, Pifat G. The effects of essential oils and aqueous tea infusions of oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. hirtum), thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) on the copper-induced oxidation of human low-density lipoproteins. International Journal of Food Sciences and Nutrition 2007; 58:87-93

Kusum M, Klinbuayaem V, Bunjob M, et al. Preliminary efficacy and safety of oral suspension SH, combination of five chinese medicinal herbs, in people living with HIV/AIDS ; the phase I/II. Journal of the Medical Association of Thailand 2004; 87:1065-1070

Kuo YC, Lin LC, Tsai WJ, Chou CJ, Hung SH, Ho YH. Samarangenin B from *Limonium sinense* suppresses herpes simplex virus type 1 replication in vero cells by regulation of viral macromolecular synthesis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2002; 46:2854-2864

Lavie G, Mazur Y, Lavie D, Meruelo D. The antiviral chemical and biological properties of hypericin a compound with a broad spectrum of biological activities. Medicinal Research Reviews 1995; 15:111-1119

Leyssen P, De Clercq E, Neyts J. The anti-yellow fever virus activity of ribavirin is independent of error-prone replication. Molecular Pharmacology 2006; 69:1461-1467

Leyssen P, Van Lommel A, Drosten C, Schmitz H, De Clercq E, Neyts J.. A Novel Model for the Study of the Therapy of *Flavivirus* Infections Using the Modoc Virus. Virology 2001; 279:27-37

Li BQ, Fu T, Yan YD, Baylor NW, Ruscetti FW, Kung HF. Inhibition of HIV infection by baicalin, a flavonoid compound purified from Chinese herbal medicine. Cellular and Molecular Biology Research 1993; 39: 119-124

Li Y, But P, Ooi V. Antiviral activity and mode of action of caffeylquinic acids from *Schefflera heptaphylla* L Frodin. Antiviral Research 2005; 68:1-9

Li Y, Jiang R, Ooi LS, But PP, Ooi VE. Antiviral triterpenoids from the medicinal plant *Schefflera heptaphylla*. Phytotherapy Research 2007; 21:466-470

Li Y, Leung KT, Yao F, et al. Antiviral flavans from the leaves of *Pithecellobium. clypearia*. Journal of Natural Products 2006; 69:833-835

Lin JC. Mechanism of action of glycyrrhizic acid in inhibition of Epstein-Barr virus replication in vitro. Antiviral Research 2003; 59:41-47

Lipsky JJ. Mycophenolate mofetil. Lancet 1996; 348:1357-1359

Liu J, Manheimer E, Tsutani K, et al. Medicinal herbs for hepatitis C virus infection: a Cochrane hepatobiliary systematic review of randomized trials. The American Journal of Gastroenterology 2003; 98:538-544

Lopez A, Hudson JB, Towers GH. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 2001; 77:189-196

Markland W, McQuaid TJ, Jain J, Kwong AD. Broad-spectrum antiviral activity of the IMP dehydrogenase inhibitor VX-497: a comparison with ribavirin and demonstration of antiviral additivity with alpha interferon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000; 44:859-866

Martin K, Ernst E. Antiviral agents from plants and herbs: a systematic review. *Antiviral Therapy* 2003; 8:77-90

Matsuhira B, Conte AF, Damonte EB, Kolender AA, Matulewicz MC, et al. Structural analysis and antiviral activity of a sulfated galactan from the red seaweed *Schizymenia binderi* (Gigartinales, Rhodophyta). *Carbohydrate Research* 2005; 340:2392-2402

Minami M, Kita M, Nakaya T, Yamamoto T, Kuriyama H, Imanishi J. The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication in vitro. *Microbiology and Immunology* 2003; 47:681-684

Monath TP. Flavivirus. In: Fields BN, Knipe DM, eds. *Virology* New York: Raven 1990: 763:814

Monath TP. Yellow fever: an update. *The Lancet Infectious Diseases* 2001; 1: 11-20

Moreira MR, Ponce AG, del Valle CE, Roura SI. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Food Science and Technology* 2005; 38:565-570

Neyts J, De Clercq E. Mycophenolate mofetil strongly potentiates the anti-herpesvirus activity of acyclovir. *Antiviral Research* 1998; 40:53-56

Ocazonez RE, Cortes FM, Villar LA, Gomez SY. Temporal distribution of dengue virus serotypes in Colombian endemic area and dengue incidence. Re-introduction of dengue-3 associated to mild febrile illness and primary infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2006; 101:725-731

Ojwang JO, Ali S, Smee DF, Morrey JD, Shimasaki CD, Sidwell RW. Broad-spectrum inhibitor of viruses in the Flaviviridae family. *Antiviral Research* 2005; 68:49-55

Ono L, Wollinger W, Rocco IM, Coimbra TL, Gorin PA, Sierakowski MR. In vitro and in vivo antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). *Antiviral Research* 2003; 60:201-208

Ooi LS, Wang H, He Z, Ooi VE. Antiviral activities of purified compounds from *Youngia japonica* (L.) DC (Asteraceae, Compositae). *Journal of Ethnopharmacology* 2006; 106:187-191

Organización Panamericana de la Salud (PAHO). Yellow fever situation in Africa and South America, 2005. Weekly Epidemiological Record August 2006, No. 33, 18

Organización Panamericana de la Salud (PAHO). Región de las Américas. Brote de Fiebre Amarilla selvática (FAS) en Colombia. Boletín 2 (3): Enero 22, 2004

Oukoulitsa C, Zika C, Hadjipavlou-Litina D, Demopoulos VJ, Skaltsa H. Inhibitory effect of polar oregano extracts on aldose reductase and soybean lipoxygenase in vitro. *Phytotherapy Research* 2006; 20:605-606

Parida MM, Upadhyay C, Pandya G, Jana AM. Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on dengue virus type-2 replication. *Journal of Ethnopharmacology* 2002; 79:273-278

Primo V, Rovera M, Zanon S, Oliva M, Demo M, et al. Determination of the antibacterial and antiviral activity of the essential oil from *Minthostachys verticillata*. *Revista Argentina de Microbiología* 2001; 33:113-117

Raulin J. Development in lipid drugs. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 2005; 5:489-498

Reichling J, Koch C, Stahl-Biskup E, et al. Virucidal activity of a beta-triketone-rich essential oil of *Leptospermum scoparium* (manuka oil) against HSV-1 and HSV-2 in cell culture. *Planta Medica* 2005; 71:1123-1127

Reichling J, Suschke U, Schneele J, Geiss HK. Antibacterial activity and irritation potential of selected essential oil components structure activity relationship. *Natural Products Communications* 2006; 1:1003-1012

Sai Ram M, Ilavazhagan G, Sharma SK, Dhanraj SA, Zares B, Parida MM, Jan AM, Davendra K, Selvamurthy W. Antimicrobial activity of new vaginal contraceptive NIM. 76 from neem (*Azadirachta indica*). *Journal of Ethnopharmacology* 2000; 1:377-382

Salem M, Hossain M. Protective effect of black seed oil from *Nigella sativa* against murine cytomegalovirus infection. *International Journal of Immunopharmacology* 2000; 22:729-740

Santoro GF, das Gracias Cardoso M, Guimaraes LG, Salgado AP, Menna-Barreto RF, Soares MJ. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitology Research* 2007; 100:783-790

Sbrana E, Xiao SY, Guzman H, Ye M, Travassos da Rosa AP, Tesh RB. Efficacy of post-exposure treatment of yellow fever with ribavirin in a hamster

model of the disease. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2004; 71:306-312.

Schlesinger J, Walsh E, Brandriss M. Analysis of 17D yellow fever virus envelope protein epitopes using monoclonal antibodies. The Journal of General Virology 1984; 65:1637-1644

Schnitzler P, Koch C, Reichling J. Susceptibility of drug-resistant clinical herpes simplex virus type 1 strains to essential oils of ginger, thyme, hyssop, and sandalwood. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2007; 51:1859-1862

Schnitzler P, Schon K, Reichling J. Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture. Pharmazie 2001; 56:343-347.

Schuhmacher A, Reichling J, Schnitzler P. Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. Phytomedicine 2003; 10:504-510

S.F-Tischer P, Talarico LB , Nosedá MD ,Guimaraes SM, Damonte EB, Duarte ME.. Chemical structure and antiviral activity of carrageenans from *Meristiella gelidium* against herpes simplex and dengue virus. Carbohydrate Polymers 2006; In press.

Shin MS, Kang EH, Lee YI. A flavonoid from medicinal plants blocks hepatitis B virus-e antigen secretion in HBV-infected hepatocytes. Antiviral Research 2005; 67:163-168.

Sinico C, De Logu A, Lai F, Valenti D, Manconi M, et al. Liposomal incorporation of *Artemisia arborescens* L. essential oil and in vitro antiviral activity. European Journal of Pharmceutics and Biopharmaceutics 2005; 59:161-168

Sokmen M, Serkedjieva J, Daferera D, Gulluce M, Polissiou M, et al. In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2004 ;52:3309-3312

Sookkongwaree K, Geitmann M, Roengsumran S, et al. Inhibition of viral proteases by Zingiberaceae extracts and flavones isolated from *Kaempferia parviflora*. Pharmazie 2006; 61:717-721

Talarico LB, Pujol CA, Zibetti RG, Faria PC, Nosedá MD, et al. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. Antiviral Research 2005; 66:103-110

Tolou H, Puggelli H, Tock F, Durand JP. Partial inhibition of yellow fever virus replication in vitro with different phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides. *Acta of Virology* 1996; 40:73-79.

Uchegbu IF, Vyas SP. Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 1998; 172:33-70

Udeinya IJ. Antimalarial activity of Nigerian neem leaves. *Transactions of the Tropical Medicine and Hygiene* 1993; 87: 471

Vijayan P, Raghu C, Ashok G, Dhanaraj SA, Suresh B. Antiviral activity of medicinal plants of Nilgiris. *The Indian Journal Medical Research* 2004; 120:24-29

Whitby K, Pierson TC, Geiss B, Lane K, Engle M, Zhou Y, et al. Castanospermine, a potent inhibitor of dengue virus infection in vitro and in vivo. *Journal of Virology* 2005; 79:8698-8706

WHO. The world health report 2002: Reducing risks, promoting healthy life, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2002.

Zheng W, Chen C, Cheng Q, Wang Y, Chu C. Oral administration of exopolysaccharide from *Aphanothece halophytica* (Chroococcales) significantly inhibits influenza virus (H1N1)-induced pneumonia in mice. *International Immunopharmacology* 2006; 6:1093-1099